

Université de Montréal

**Développement d'un nouveau modèle de criblage tridimensionnel pour la
découverte de médicaments épigénétiques contre le cancer du poumon**

Par Gabrielle Mc Innes

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Pharmacologie option générale

Novembre 2019

© Gabrielle McInnes, 2019

Identification des membres du Jury

Président :

Jean-Philippe Graton

Membre du Jury :

Frédéric-Antoine Mallette

Directeur :

Noël Raynal

RÉSUMÉ

La découverte de médicaments en oncologie repose encore majoritairement sur les criblages pharmacologiques à haut débit. Cependant, les modèles traditionnels de culture cellulaire en deux dimensions (2D) ne reflètent pas les conditions physiopathologiques des tumeurs solides *in situ*. Au laboratoire, notre hypothèse est que le manque de représentativité des cellules en culture 2D par rapport aux tumeurs *in situ* lors des essais de criblage pharmacologique *in vitro* est responsable du faible taux de succès des petites molécules lors d'essais cliniques. Pour pallier ce problème, nous avons développé une méthode de culture à long-terme en trois dimensions (3D) avec des cellules d'adénocarcinome du poumon qui permet le maintien des cellules en sphéroïdes jusqu'à 38 jours. Les cellules s'adaptent rapidement à la culture 3D en diminuant leur taille et en ralentissant significativement leur métabolisme. Au niveau épigénétique, l'expression du complexe KAT3A/KAT3B et de BRG1 est significativement diminuée, et ce de manière temps-dépendante. À l'inverse, l'expression de HDAC6 est augmentée lors du passage en 3D. Finalement, nous avons vérifié si les changements épigénétiques induits par la culture 3D influençaient significativement la réponse aux médicaments. Ainsi, nous avons traité les cellules en 2D et après 10 ou 24 jours en 3D avec une pharmacothèque de 154 médicaments épigénétiques. 60% des médicaments ont démontré une activité anticancéreuse significative sur les cellules en 2D, contrairement à 9% sur les sphéroïdes de 10 jours. Avec les sphéroïdes de 24 jours, uniquement 1 médicament, le MS023, un inhibiteur des arginines méthyltransférases (PRMT) de type I, a été efficace. L'augmentation de la sensibilité au MS023 concorde avec une augmentation de la méthylation des arginines dans les sphéroïdes. En conclusion, mon projet démontre que la culture 3D modifie l'épigénome des cellules cancéreuses du poumon de manière temps-dépendante et que ces changements sensibilisent les cellules à une inhibition des PRMT de type I. L'étude des sphéroïdes nous permet d'améliorer notre compréhension de la biologie tumorale et des processus de découverte de médicaments ce qui pourrait pallier le faible taux de succès associé aux modèles 2D classique.

Mots clés : Épigénétique, pharmacologie, cancer du poumon, découverte de médicaments, Modèle tri-dimensionnel, criblage à haut débit.

ABSTRACT

Small molecule development in oncology mainly involves high-throughput drug screenings and preclinical validation studies using cancer cells grown in two-dimension (2D). However, classical cell culture methods poorly reflect tumor biology and cell epigenome. Here, our objective is to develop a 3D model that displays key epigenetic features of solid tumors in order to identify new actionable targets. First, we determined culture conditions for long-term expansion of adenocarcinoma spheroids to allow cell adaptation and the occurrence of specific epigenetic features triggered by 3D condition. Our results demonstrate that cells cultivated in 3D spheroids exhibit significant phenotypic and epigenetic changes as compared to 2D monolayers. Notably, we observed numerous expression changes of key epigenetic regulators, all taken place at a different time-point of the 3D cell culture. We observed a decrease in the expression of the KAT3A/KAT3B complex as well as BRG1. HDAC6 expression also increased in 3D. Then, we asked whether epigenetic changes triggered by 3D culture would modify drug sensitivity. We performed a screening of 154 epigenetic drugs on cancer cells cultivated in 2D and in 3D at two different time points. 60% of epigenetic drugs showed significant anticancer activity against 2D monolayers. Interestingly, A549 cells in 3D spheroids became gradually resistant over time. Against 3D spheroids cultivated for 10 days, only 9% of epigenetic drugs in the drug library showed anticancer activity. Against 3D spheroids cultivated for 24 days, only a single epigenetic compound called MS023, a selective agent against type I PRMTs, reduced cell viability significantly. This sensitivity is correlated with an increase of arginine methylation observed within spheroids.

Taken together, we show that 3D spheroids trigger a time-dependent epigenetic context that increases lung cancer cells sensitivity to type I PRMT inhibition. 3D spheroids of well-characterized cancer cell lines will improve our understanding of tumor biology and drug discovery and can overcome the high false discovery rate associated with 2D classical models.

Keywords: Epigenetics, Lung Cancer, Pharmacology, Drug discovery, 3-dimensional Models, High Throughput Screening

LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DE FIGURES	8
ABRÉVIATIONS	10
REMERCIEMENTS	12
DÉDICACE	13
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	14
1. INTRODUCTION	15
1.1 ÉPIGÉNÉTIQUE	15
1.1.1 Méthylation de l'ADN.....	17
1.1.2 Modifications post-traductionnelles des histones	21
1.1.2.1 Acétylation des histones.....	22
1.1.2.1.1 Histones acétyltransférases.....	23
1.1.2.1.2 Histones désacétylases	24
1.1.2.2 Méthylation des histones	25
1.1.2.2.1 Méthylation des lysines.....	26
Les méthyltransférases de lysines	26
Les lysines déméthylases.....	28
1.1.2.2.1 Méthylation des arginines	29
Les arginines méthyltransférases.....	29
Les arginines déméthylases	32
1.1.3 Dérégulation de l'épigénétique en cancer	33
1.1.3.1 Méthylation de l'ADN	33
1.1.3.2 Modifications des histones et variants	35
1.1.4 Les médicaments épigénétiques	37
1.1.4.1 Médicaments non-spécifiques.....	37
1.1.4.1.1 Inhibiteurs de DNMT	37
1.1.4.1.2 Inhibiteurs de HDAC	38
1.1.4.1.3 Médicaments interagissant avec les enzymes qui transmettent le signal épigénétique	38
1.1.4.2 Médicaments spécifiques.....	39
1.1.4.3 Combinaisons de médicaments épigénétiques.....	40
1.1.4.3.1 DNMTi et HDACi	40
1.1.4.3.2 DNMTi ou HDACi et chimiothérapie classique	41
1.1.4.3.3 Combinaison de médicaments épigénétiques et immunothérapie.....	42
1.2 LE CANCER DU POUMON	43
1.2.1 Cancer du poumon non à petites cellules	44
1.2.2 Traitement des adénocarcinomes	46
1.2.3 Dérégulation épigénétique des CPNPC.....	48
1.2.3.1 Hyperméthylation de l'ADN	48
1.2.3.2 Modifications post-traductionnelles	49
1.3 LIMITATIONS DES MODÈLES 2-DIMENSIONS IN VITRO.....	50
1.3.1 Le microenvironnement	50
1.3.2 Le métabolisme	51
1.3.2.1 Croissance rapide et isolée.....	51
1.3.2.2 Disponibilité des nutriments	51
1.3.3 Altération génétique et du transcriptome	52
1.4 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	54
CHAPITRE 2 : ARTICLE	55
2. ARTICLE	56
2.1 ABSTRACT	58
2.2 INTRODUCTION.....	60

2.3 METHODS AND MATERIALS	61
2.4 RESULTS	66
2.5 CONCLUSION	72
2.6 REFERENCES	75
2.7 FIGURE LEGENDS	77
2.8 FIGURES.....	82
2.9 SUPPLEMENTARY FILE 1	91
CHAPITRE 3: DISCUSSION.....	94
3. DISCUSSION	95
3.1 Explication de l'effet anti-cancéreux des inhibiteurs de PRMT.	96
3.2 Caractérisation globale du profil épigénétique des sphéroïdes.....	98
3.3 Réponse aux médicaments non-épigénétiques	101
3.4 Analyse de la structure et de la composition des sphéroïdes par microscopie.....	101
3.5 Analyse de l'état TEM des sphéroïdes.....	103
3.6 Analyse de la composition en cellules souches cancéreuses des sphéroïdes.	104
3.7 Amélioration du modèle 3D	105
Ajout d'une composante de co-culture au modèle.	105
Dérivation d'autres lignées cellulaires en 3D.	107
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	108
Conclusion et retour sur les objectifs	108
Perspectives futures	111
RÉFÉRENCES	114

Liste des tableaux

Tableau 1. Les histones acétyltransférases (KAT) et leurs substrats histones.....	23
Tableau 2. Les histones désacétylases, leur localisation et cofacteur.....	25
Tableau 3. Les histones méthyltransférases et leur substrats histones.....	27
Tableau 4. Les histones déméthylases et leurs substrats.....	29
Tableau 5. Les protéines arginines méthyltransférases et leur substrats histones...	31

Liste de figures

Figure 1. Structure d'un nucléosome	16
Figure 2. Structure globale du génome et principaux processus de l'épigénétique...	17
Figure 3. Méthylation d'une cytosine	19
Figure 4. Acétylation et dé-acétylation des histones.	22
Figure 5. Méthylation des histones.	27
Figure 6. La méthylation des arginines.....	31
Figure 7. L'implication de la méthylation de l'ADN dans les processus épigénétiques contribuant au cancer.	34
Figure 8. Représentation des différents stades du cancer du poumon non à petites cellules.	45

Article

Figure 1. 3D culture induces a rapid decrease in proliferation of A549 lung cancer cells.....	83
Figure 2. A549 lung spheroid reduced proliferation rate is associated with a rapid cell size reduction	84
Figure 3. 3D culture induced expression level changes of key epigenetic regulators.....	85
Figure 4. Lung spheroids do not display an EMT phenotype.....	86
Figure 5. Lung spheroids are sensitive to type I PRMT inhibition	87

Figure 6. A549 spheroids sensitivity to type I PRMT inhibition is type specific.....**88**

Figure supplémentaire 1. Phenotypic characterization of long-term spheroid culture..**89**

Figure supplémentaire 2. Epigenetic regulators expression and acetylation levels remaining unchanged in long-term spheroids.....**90**

Abréviations

2D	2-dimensions
3D	3-dimensions
5hmC	Cytosine hydroxyméthylée
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BET	Bromodomaine
C	Cytosine
CIMP	Phénotype de méthylation des îlots CpG
CPNPC	Cancer du poumon non à petites cellules
CPPC	Cancer du poumon à petites cellules
DNMT	ADN méthyltransférase
DNMTi	Inhibiteurs des DNMT
FDA	Food and drug administration
G	Guanine
GST	Gène suppresseur de tumeur
HDAC	Histone désacétylase
HDACi	Inhibiteurs des HDAC

HMT	Histone méthyltransférase
iBET	Inhibiteurs des BET
JHDM	JmjC domain-containing histone demethylase protein
JmjC	Jumonji C
K	Lysine
KAT	Lysine acétyltransférase
KDM	Lysine déméthylase
KMT	Lysine méthyltransférase
m5c	Cytosine méthylée
MTP	Modifications post-transcriptionnelles
pb	Paires de bases
PRMT	Protéine arginine méthyltransférase
R	Arginine
SAM	S-adénosylméthionine
TEM	Transition épithéliale-mésenchymateuse
TET	Ten-Eleven-Translocation

Remerciements

Merci à mon directeur de recherche, Noël Raynal, de la confiance et de la liberté dont j'ai pu bénéficier afin de mener mon projet de recherche à terme. Merci à Elodie pour le soutien et pour les nombreux fous rires. Merci à Cynthia et Marie-Lyn d'avoir été mon échappatoire et mon filet de sauvetage quand j'en ai eu le plus besoin. Finalement, un merci tout spécial à mes parents et Louis, pour leur support inconditionnel durant les 2 dernières années.

Dédicace

À Capucine...

Chapitre 1: Introduction

1. Introduction

1.1 Épigénétique

L'épigénétique est la modulation transmissible de l'expression des gènes, indépendamment d'une modification de l'ADN. Le préfixe « épi » provient du terme Grec qui signifie « au-dessus » de la génétique. Les altérations épigénétiques de l'expression des gènes passent donc plusieurs autres processus, qui seront abordés ci-dessous, mais sans jamais modifier la séquence nucléotidique (ADN). C'est une modification du phénotype sans changement au niveau du génotype [1]. Les processus épigénétiques dictent l'expression des gènes et sont transmissibles de la cellule mère aux cellules filles. La modification épigénétique de l'expression des gènes passe par le changement d'état de la chromatine, qui est la structure soutenant l'information génétique dans les cellules eucaryotes. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome (figure 1), contenant les brins d'ADN entourés autour de protéines appelées histones. Il existe 5 types d'histones, soit l'histone H1, H2a, H2b, H3 et H4. Un nucléosome est composé d'un octamère d'histones, plus précisément 2 copies des histones H2a, H2b, H3 et H4, auquel s'enroule 147 paires de bases (pb) d'ADN. L'histone H1 (linker), ne faisant pas partie de la structure du nucléosome, maintient en place l'ADN enroulé ainsi que la structure globale de la chromatine [1, 2].

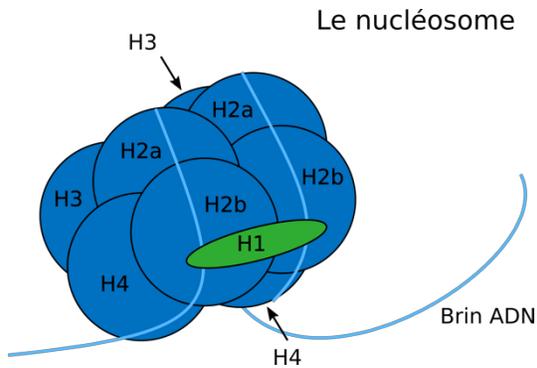


Figure 1. Structure d'un nucléosome. Le nucléosome est un octamère composé de quatre paires d'histones H2a, H2b, H3 et H4. Un brin d'ADN de 147 pb s'enroule autour de l'octamère et est maintenu en place par l'histone H1.

Une chromatine décondensée et ouverte, nommée euchromatine, est favorable à l'expression des gènes tandis qu'une chromatine dense et regroupée, appelée hétérochromatine, ne permet pas aux facteurs de transcription de s'y lier et donc restreint l'activation transcriptomique. 3 types d'enzymes agissent de concert afin de réguler les mécanismes épigénétiques : les *writers*, *erasers* et *readers* (figure 2). Les *writers* apposent les marques sur l'ADN ou les histones tandis que les *readers* interprètent ce code épigénétique. Quant à eux, les *erasers* vont retirer les marques ajoutées par les *writers* [3]. Les 2 mécanismes épigénétiques principaux sont la méthylation de l'ADN et la modification post-traductionnelle des histones (figure 2).

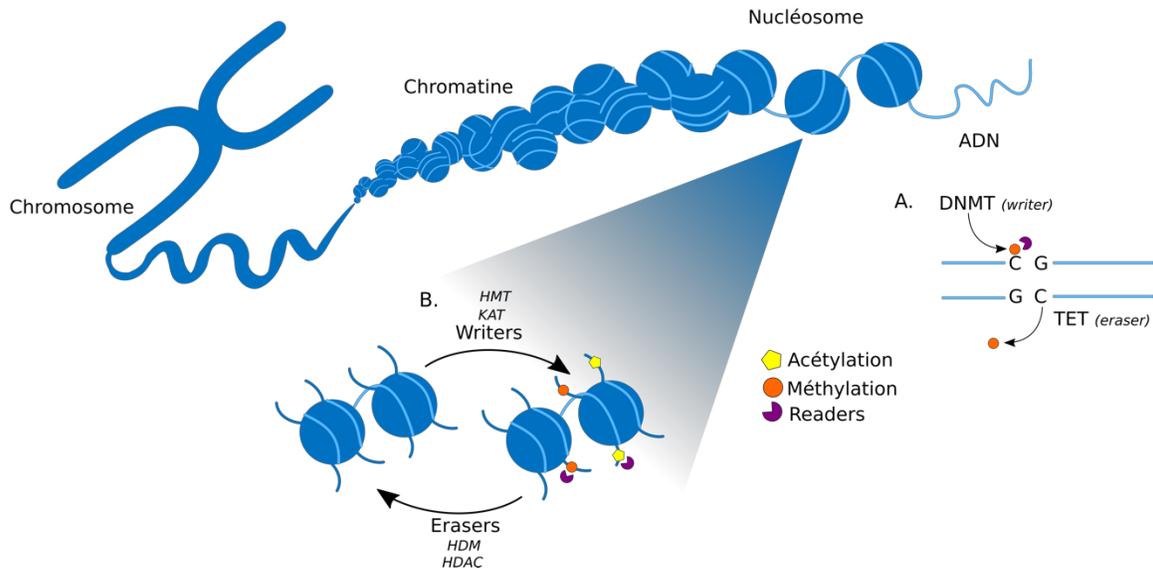


Figure 2. Structure globale du génome et les principaux processus de l'épigénétique.

Schématisation des processus de méthylation de l'ADN (A) et des modifications post-traductionnelles des histones (B) ainsi que le rôle des 3 groupes d'enzymes épigénétiques *reader*, *eraser* et *writer*.

1.1.1 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN permet l'activation ou la suppression de l'expression d'un gène par l'ajout de groupe méthyle en position 5' de la cytosine d'un dinucléotide CpG (Figure 2A). Un dinucléotide CpG est un segment d'ADN composé d'une cytosine (C) en 5' d'une guanosine (G) [4]. Le dinucléotide CpG n'est pas abondant dans le génome, cependant certaines régions sont riches en CpG, appelées îlots CpG. Les îlots CpG sont généralement situés à proximité

d'une région promotrice et constitués de plus de 200 pb avec une fréquence CG de plus de 50%[4, 5].

La méthylation induit un changement conformationnel de la chromatine et donc modifie l'interaction entre les protéines et l'ADN, résultant en l'activation ou la répression de l'expression génique [5]. D'une part, l'hyperméthylation d'un promoteur résulte en l'inactivation de l'expression du gène régulé par celui-ci. Un îlot CpG hyperméthylé peut également affecter directement l'état de chromatine lorsqu'une protéine liant les groupes méthyles se lie à celui-ci et recrute les histones désacétylases, qui vont à leur tour modifier la structure de la chromatine[5]. D'autre part, l'hyperméthylation d'un inactivateur permet l'activation de l'expression du gène [6-8]. L'ajout d'un groupe méthyle est catalysé par une famille d'enzymes nommées ADN méthyltransférases (DNMT). Les DNMT utilisent S-adénosylméthionine (SAM) comme donneur de groupement méthyle (Figure 3). Les 3 DNMT majeures sont DNMT1, DNMT3A et DNMT3B et possèdent des cibles et responsabilités distinctes au niveau du maintien du profil de méthylation et de la méthylation de novo.

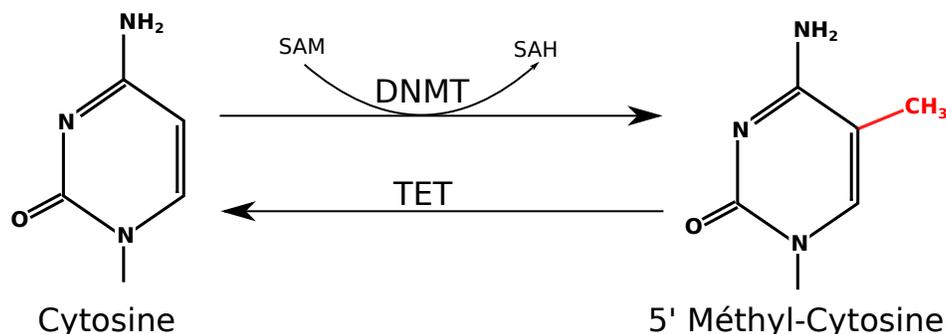


Figure 3. Méthylation d'une cytosine. Le donneur de groupement méthyle SAM est utilisé par les DNMT pour ajouter un groupement CH₃ à l'extrémité 5' d'une cytosine.

DNMT1 est majoritairement responsable du maintien de la méthylation de par une préférence pour les dinucléotides CpG hémi-méthylés [9]. Ainsi, cette enzyme complète la méthylation après une réplication de l'ADN en se fiant au brin d'ADN provenant de la cellule mère. DNMT1 possède un domaine RFT en N-terminal qui lui permet d'être recruté dans la fourche de réplication de l'ADN [10]. DNMT3A et DNMT3B, quant à elles, sont responsables de la méthylation de novo, c'est à dire l'ajout de groupement méthyle sur l'ADN non-méthylé. Ces enzymes n'ont pas de préférence pour un état de dinucléotide CpG, donc une affinité similaire pour de l'ADN hémi-méthylé et non-méthylé [11-13]. Un 3^e membre de la famille des DNMT3 est DNMT3L, qui ne possède aucune activité catalytique. Cependant, DNMT3L est essentiel lors du développement et, lorsque lié aux DNMT3a/b, augmente leur activité catalytique de 2 à 20 fois [14]. DNMT3a et DNMT3b possède un domaine PWWP en N-terminale qui est essentiel pour leur liaison à

l'ADN et un domaine PHD-like ADD essentiel pour leurs interactions protéines-protéines [10].

Les DNMTs ont plusieurs partenaires d'interaction, qui jouent un rôle autant dans leur recrutement à l'ADN que dans la régulation de leur activité [10]. Par exemple, le complexe DNMT1/PCNA/UHRF1 est requis pour le maintien de la méthylation globale suivant la réplication de l'ADN. PCNA se lie à l'ADN nouvellement synthétisé et aide au recrutement de DNMT1 [15]. L'interaction entre UHRF1 et DNMT1 est également impliquée dans son recrutement à l'ADN [16]. Une présence concomitante avec d'autres régulateurs a également été observée pour DNMT1. Notamment, le complexe HDAC1/G9a/DNMT1/PCNA/UHRF1 promeut la méthylation de l'ADN, la déacétylation des histones (via HDAC1) et la méthylation de H3K9 et H3K27 (via G9a) simultanément [17, 18].

La méthylation de novo requiert également une interaction entre les différents facteurs de remodelage de la chromatine. Par exemple, DNMT3a/b interagissent avec LSH, un membre de la famille SNF2, ce qui augmente leur capacité de liaison à l'ADN. DNMT3a a également la capacité de reconnaître les marques répressives de la chromatine H3K36me3 et H4R3me2, apposées par des régulateurs de la méthylation des histones, et complète donc ainsi l'inhibition de l'expression par l'ajout de méthylation à l'ADN [19]. Un autre exemple de l'interaction protéine-protéine qui mène à la méthylation de novo de l'hétérochromatine est initié par la

tri-méthylation de H3K9me (H3K9me3) par SUV39H1. HP1 se lie à H3K9me3 et recrute à son tour DNMT3a et DNMT3b à l'ADN [20].

La déméthylation de l'ADN s'effectue par la voie passive et active. D'une part, la déméthylation passive passe par le processus de réplication, où l'on omet de méthyler le nouveau brin d'ADN. D'autre part, les enzymes TET catalysent la conversion d'une cytosine méthylée (m5C) à une cytosine hydroxyméthylée (5hmC) par un mécanisme d'oxydation couplé à un processus de réparation de l'ADN [21, 22]. Ce processus est indépendant de la réplication de l'ADN.

1.1.2 Modifications post-traductionnelles des histones

Les octamères d'histones sont sujets à plusieurs modifications post-traductionnelles incluant la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, l'acétylation et la méthylation. Celles-ci sont des modifications covalentes sur les queues polypeptidiques N-terminales des histones et altèrent l'expression des gènes [23]. Bien que tous les types de modifications soient biologiquement importants, une attention particulière sera portée sur l'acétylation et la méthylation des histones. D'un point de vue de nomenclature, l'acétylation de la lysine 27 sur l'histone H3 s'écrit H3K27ac, tandis que la di-méthylation de la lysine 9 sur l'histone H3 s'écrit H3K9me2.

1.1.2.1 Acétylation des histones

Le processus d'acétylation/désacétylation des histones est régulé par 2 groupes d'enzymes distinctes : les histones acétyltransférases (KAT) et les histones désacétylases (HDAC) (Figure 4). L'acétylation se fait exclusivement sur les résidus lysines (K) des histones. Bien que certaines KAT ont comme substrat H2a et H2b, la grande majorité de l'acétylation a lieu sur les histones H3 et H4. Certaines KAT ont également la capacité d'acétyler des groupements non-histones [1]. Ce processus est réalisé par un transfert covalent d'un groupement acétyle provenant d'un acétyl-CoA vers un résidu lysine de la queue N-terminale des histones (Figure 4).

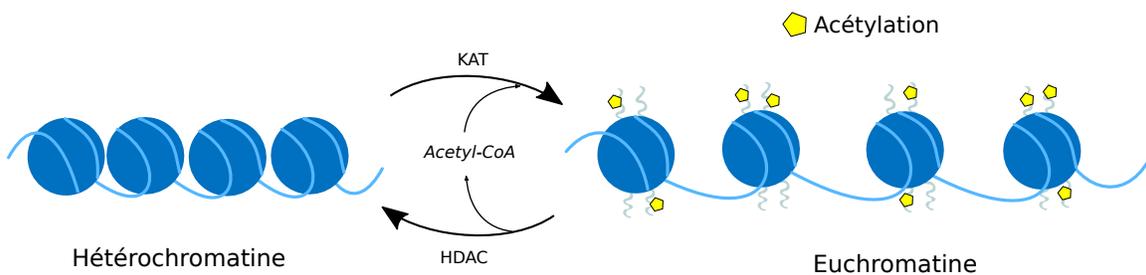


Figure 4. Acétylation et dé-acétylation des histones. Les résidus lysines situés majoritairement sur les histones H3 et H4 se font acétyler par les KAT ou dé-acétyler par les HDAC. L'ajout d'un groupement acétyle induit en changement de conformation de la chromatine vers un état ouvert, et vice-versa.

1.1.2.1.1 Histones acétyltransférases

L'acétylation des histones est généralement associée à une marque positive d'expression, puisque l'ajout d'un groupement acétyle neutralise la charge positive des lysines et mène à une décondensation de la chromatine [1]. La majorité des KAT sont localisées dans le noyau, bien que certaines soient cytoplasmiques. Les KAT peuvent être sous-divisées en plusieurs classes, mais les 3 familles principales sont les MYST, GNAT et P300/CBP [24].

Tableau 1. Les histones acétyltransférases (KAT) et leurs substrats histones [1, 24, 25]

Famille	Nom	Autre dénomination	Substrats
GNAT	KAT2A	GCN5	H3K9,14,18,36,56
	KAT2B	PCAF	H3K9,14,18,36
	KAT9	ELP3	
MYST	KAT5	TIP60	H4K5,8,12,16
	KAT6A	MOZ/MYST3	H3K9,14; H4K16
	KAT6B	MORF/MYST4	H3K9,14; H4K16
	KAT7	HBO1	H4K5,8,12,14
	KAT8	MOF/MYST1	H4K16
P300/CBP	KAT3A	CBP	H2AK5; H2BK12,15; H3K14,18,27,56; H4K5,8
	KAT3B	P300	H2AK5; H2BK12,15; H3K14,18,27,56; H4K5,8

1.1.2.1.2 Histones désacétylases

Les histones désacétylases (HDAC) sont divisées en 4 classes, en fonction de leur structure tertiaire, leur localisation cellulaire et leur cofacteur. Ce groupe d'enzyme catalyse la désacétylation des lysines sur les queues N-terminales des histones. Contrairement à leur nom, les HDAC ont pour cibles plus de 50 protéines non-histones dont des récepteurs nucléaires, des facteurs de transcriptions et des enzymes de réparation de l'ADN [26]. Les enzymes HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8 composent la classe I et sont localisées au noyau. Elles sont majoritairement responsables de la désacétylation des histones et jouent un rôle au niveau de la prolifération et la survie cellulaire [26, 27]. Les enzymes de la classe II sont elles-mêmes sous-divisées en fonction de leur localisation. HDAC4, HDAC5, HDAC7 et HDAC9 forment la classe IIA et sont présentes tant au noyau que dans le cytoplasme. HDAC6 et HDAC10 composent la classe IIb et se trouvent majoritairement dans le cytoplasme. La classe IV ne comporte qu'une seule enzyme, HDAC11, qui partage des caractéristiques au niveau de son site catalytique avec les classes I et II, et donc souvent considérée comme un hybride [26, 27]. Les sirtuines, qui forment la classe III, sont des enzymes désacétylases NAD-dépendantes qui ciblent autant les histones que d'autres protéines comme des facteurs de transcription [28, 29].

Tableau 2. Les histones désacétylases, leur localisation et cofacteur

Classe	Membres	Localisation/cofacteur
I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	Noyau / Zinc+
IIA	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9	Noyau et cytoplasme / Zinc+
IIB	HDAC6, HDAC10	Cytoplasme / Zinc+
III	Sirtuines 1 à 7	Noyau et cytoplasme/ NAD+
IV	HDAC11	Noyau et cytoplasme / Zinc+

1.1.2.2 Méthylation des histones

La méthylation des histones est un autre processus majeur à travers lequel les enzymes épigénétiques modifient l'expression génique. Cet ajout de marque permet le recrutement de protéines associées à la chromatine menant à une réponse biologique diverse (expression génique, stabilité génomique, développement du phénotype cellulaire, l'empreinte génétique, la mitose et autres) [30]. La méthylation peut avoir lieu sur les queues N-terminales des lysines ou des arginines. Contrairement au processus d'acétylation, l'ajout de groupement méthyle ne change pas la charge des lysines ni des arginines et peut être mono, di ou trivalentes. Le donneur de groupement méthyle est SAM (le même que pour la méthylation de l'ADN). L'ajout d'un groupe méthyle peut être

associé tant à l'expression qu'à l'inhibition d'un gène en fonction du résidu modifié, du nombre de groupements méthyles et de la présence ou non d'une enzyme spécifique [31-34].

1.1.2.2.1 Méthylation des lysines

Les méthyltransférases de lysines

Les méthyltransférases (HMT), ou lysines méthyltransférases (KMT) sont classées en 7 catégories (KMT1 à 7) avec leurs sous-types et substrats respectifs (histones et non-histones) [35]. Ces enzymes sont en vaste majorité des protéines contenant un domaine catalytique SET, à l'exception de KMT4 (DOT1L). L'activité de DOT1L passe par un mécanisme de méthylation du corps des histones, contrairement aux enzymes avec un domaine SET qui ciblent les queues N-terminales des histones [36].

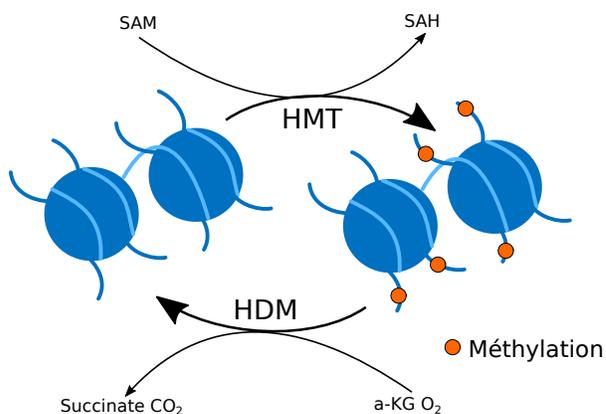


Figure 5. Méthylation des histones. Les HMT (ou KMT) utilisent le donneur de groupement méthyle SAM afin d'apposer une marque de méthylation sur les histones tandis que les HDM reversent ce processus.

Tableau 3. Les histones méthyltransférases et leurs substrats histones

Nom	Autre nom	Substrats histones
KMT1A/B	SUV39H1/2	H3K9me3
KMT1C	EHMT2 ou G9A	H3K9me1,2 H3K27me, H3K56me1
KMT1D	EHMT1 ou GLP	H3K9me1,2 H3K27me
KTM1E/F	SETDB1/ SETCB2	H3K9me3
KMT2A/B/C/D	MLL/MLL4/MLL3/MLL2	H3K4me
KMT2E	MLL5	H3K4me1,2
KMT2F/G	SETD1A/B	H3K4me

KMT2H	ASH1L	H3K4me, H3K36me
KMT3A	SETD2	H3K36me
KMT3B	NSD1	H3K36me, H4k20me
KMT3C	SMYD2	H3K4me, H3k36me2
KMT4	DOT1L	H3K79me
KMT5A	SETD8	H4K20me1
KMT5B/C	SUV420H1/2	H4K20me3
KMT6	EZH2	H3K9me, H3K27me1,2,3
KMT7	SETD7	H3K4me

Les lysines déméthylases

Les enzymes responsables du retrait des groupements méthyles sur les histones sont les lysines déméthylases (KDM). Ces enzymes sont divisées en 2 familles en fonction des domaines qu'elles possèdent. La protéine LSD1 (ou KDM1), la première KDM à avoir été découverte, est une enzyme FAD-dépendante qui compose à elle seule une des familles de KDM. Son action passe par un processus d'oxydation des amines et, contrairement aux autres KDM, elle ne possède pas de domaine jumonji C (jmjC). La deuxième famille, JHDM (JmjC domain-containing histone demethylase protein), englobe le reste de KDM connues. Cette famille contient plusieurs sous-types mais toutes ces enzymes possèdent un domaine JmjC et catalysent la déméthylation par une réaction hydroxylation dépendante de l'ion Fe(II). Contrairement à LSD1, leur mécanisme de déméthylation est compatible avec les résidus tri-méthylés [37-39].

Tableau 4. Les histones déméthylases et leurs substrats

Famille / Cofacteur	Sous-types	Membres	Substrats
LSD1/FAD+	KDM1	KDM1A	Mono, di H3K4 H3K9
		KDM1B	Mono, di H3K4
JmjC domain / Fe(II)	KDM2	KDM2A	Mono di h3K36 tri H3K4
		KDM2B	Mono di h3K36
	KDM3	KDM3A	Mono di H3K9
		KDM3B-C	Inconnu
	KDM4	KDM4A-D	Di, tri H3K9/36 H1K26
	KDM5	KDM5A-D	Di, tri H3K4
	KDM6	KDM6A-B	Di, tri H3K27
		UTY	Inconnu

1.1.2.2.1 Méthylation des arginines

Les arginines méthyltransférases

La méthylation des arginines est un des processus particulièrement étudiés en épigénétique. Ces enzymes ont également plusieurs substrats non-histones impliqués dans l'épissage des pré-ARNm, la réponse aux dommages à l'ADN, la stabilité des protéines (dont p53), la signalisation cellulaire et la mort cellulaire [40,

41]. Les enzymes responsables de la méthylation des arginines sont nommées protéines arginines méthyltransférases (PRMT) et sont divisées en 2 familles : PRMT de type I et II. Contrairement aux lysines, les arginines peuvent être mono- ou di-méthylées. La di-méthylation peut avoir lieu de façon symétrique ou asymétrique, et les PRMT sont classifiées en fonction de ce critère (Figure 6).

Des 9 enzymes connues, la majorité font partie des PRMT de type I, soit PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT6 puis PRMT8 et catalysent la di-méthylation asymétrique. PRMT5 et PRMT9 à eux seuls composent les PRMT de type II et sont responsables de la di-méthylation symétrique des arginines. PRMT7, originalement classée parmi les PRMT de type II dû à son action de di-méthylation symétrique, fait désormais groupe à part puisqu'elle est la seule enzyme responsable d'une mono-méthylation des arginines et donc maintenant considérée comme une PRMT de type III [40, 41]. Comme la méthylation des lysines, les marques déposées sur les arginines peuvent être activatrices (H4R3me2a, H3R2me2s, H3R17me2a, H3R26me2a) ou répressives (H3R2me2a, H3R8me2a, H3R8me2s, H4R3me2s) [41].

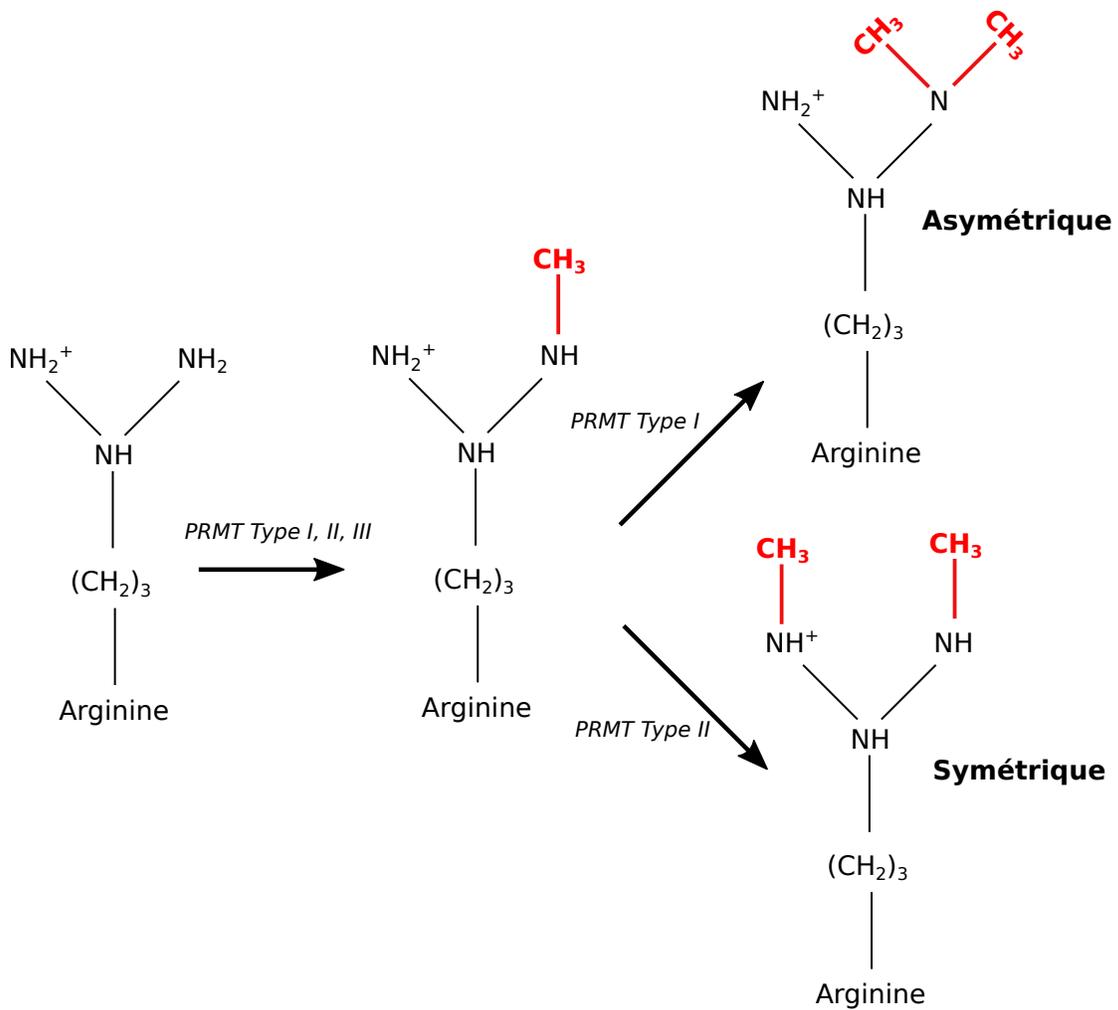


Figure 6. La méthylation des arginines. La mono-méthylation des arginines est effectuée par les PRMT de type I, II et III. La di-méthylation asymétrique est régulée par les PRMT de Type I tandis que les PRMT de type II régulent la di-méthylation asymétrique.

Tableau 5. Les protéines arginines méthyltransférases et leur substrats histones [42].

Famille	Enzyme	Substrat histones
Type I	PRMT1	H4R3
	PRMT2	Aucune activité enzymatique

	PRMT3	
	PRMT4/CARM1	H3R2, H3R17, H3R26
	PRMT6	H3R2
	PRMT8	
Type II	PRMT5	H4R3, H3R8
	PRMT9	H2A, H4
Type III	PRMT7	H2A, H4R3

Les arginines déméthylases

Bien que les KDM soient amplement caractérisées, le processus de déméthylation des arginines reste encore inconnu. Malgré que quelques études aient proposé que différentes enzymes puissent déméthyliser les arginines, une absence de consensus dans le domaine ne nous permet pas de considérer, hors de tous doutes, que ces enzymes sont des déméthylases des arginines. Notamment, Chang et collègues ont démontré en 2007, à l'aide d'essais *in silico* et *in vitro*, que JMDJ6 aurait la capacité de déméthyliser les résidus arginines sur les histones H3R2 et H4R3 [43]. Le statut de déméthylase des arginines de JMDJ6 est cependant remis en question par une publication de Webby et collègues en 2009, qui ne détecte aucune hydroxylation induite par JMDJ6 sur les résidus arginines des histones [44]. Des récentes recherches ont également démontré que JMJD1B aurait une action de déméthylation sur H4R3me2s dans les cellules hématopoïétiques et progénitrices [45].

PAD4, une enzyme de la famille des protéines déaminases (PAD), aurait également un rôle dans la déméthylation des arginines. Des études ont démontré que PAD4 a la capacité de déméthyliser les résidus arginines mono-méthylés des histones in vivo et in vitro [46]. Cependant, le statut de PAD4 comme déméthylase est controversé puisque son processus de déméthylation est en fait un processus de déimination, qui convertit les arginines mono-méthyle en citrulline, un résidu ayant des propriétés chimiques différentes des arginines non-méthylées [46, 47].

1.1.3 Dérégulation de l'épigénétique en cancer

La reprogrammation pathologique de l'épigénétique contribue au développement et à la progression de plusieurs types de cancers. L'épigénome d'une cellule cancéreuse est caractérisé par une modification du profil de méthylation de l'ADN, par des modifications post-traductionnelles des histones et par le changement d'expression d'enzymes ciblant la chromatine [48]. De ces changements, appelés épimutations, découlent une modification globale de l'expression des gènes qui mène au développement et à la progression du cancer [4, 49, 50].

1.1.3.1 Méthylation de l'ADN

La modification du profil de méthylation de l'ADN joue un rôle majeur dans le cancer où l'on observe une hyperméthylation dans des régions ciblées et une hypométhylation globale de l'ADN [51, 52].

Premièrement, l'hyperméthylation est ciblée aux îlots CpG des promoteurs, couramment ceux de gènes suppresseurs de tumeurs qui ont comme fonction la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN et l'angiogénèse [48]. Dans un état normal, ces régions sont hypométhylées donc transcriptionnellement actives, tandis que l'hyperméthylation dans les cellules cancéreuses peut être associées avec une répression génique. Ce phénomène est présent dans la majorité des types de cancers [48]. Deuxièmement, on observe également une hypométhylation globale des régions répétitives et de l'ADN non-codant induisant une instabilité génomique, une des caractéristiques du cancer [53, 54].

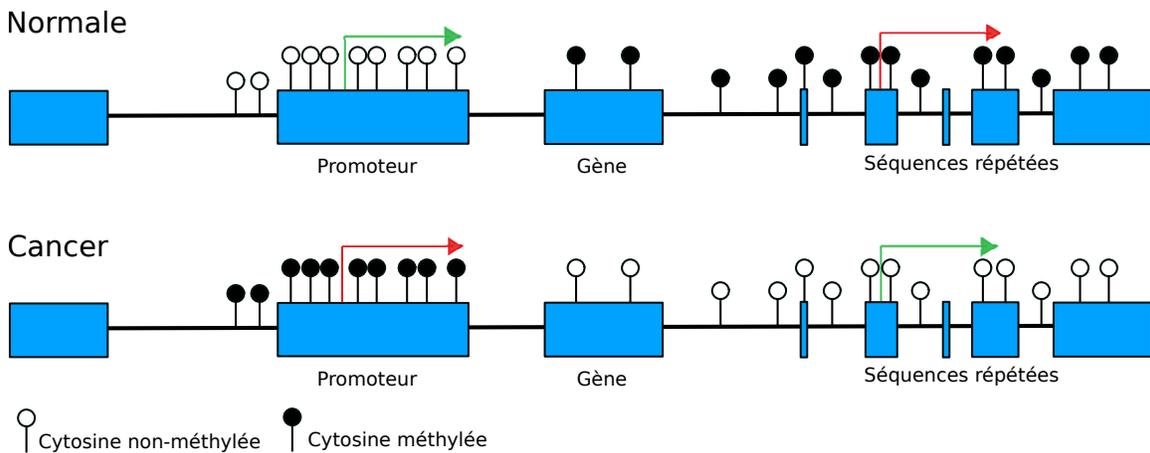


Figure 7. L'implication de la méthylation de l'ADN dans les processus épigénétiques contribuant au cancer. Dans une cellule normale (haut), le promoteur des gènes est hypométhylé et les séquences répétées sont hyperméthylées. En contexte de cancer (bas), les régions de méthylation sont inversées et l'on retrouve un promoteur hyperméthylé et des séquences répétées

hypométhylées, ce qui contribue à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et à l'instabilité génomique.

1.1.3.2 Modifications des histones et variants

Un autre processus important dans le développement du cancer est l'altération des modifications post-traductionnelles des histones causée par des variants des enzymes épigénétiques régulant ces modifications. Ces variations sont soit une mutation engendrant un gain ou perte de fonction de la protéine, ou un changement au niveau de son expression [4, 48, 49].

Premièrement, le profil d'acétylation d'une cellule cancéreuse se voit altéré par des modifications aux niveaux des enzymes responsables de sa régulation : les KAT et les HDAC. Les HDAC sont souvent surexprimées en cancer, donc sont l'objet de plusieurs recherches en développement de médicaments [55, 56]. Par exemple, un groupe de recherche a démontré que HDAC1 était surexprimé dans le cancer de la prostate réfractaire à la thérapie hormonale [55]. De plus, il y aurait une augmentation de l'expression d'HDAC2 dans le cancer de l'estomac [56]. Malgré des résultats prometteurs dans les études précliniques, les inhibiteurs d'HDAC ne démontrent peu ou pas d'efficacité lors des essais cliniques contre les tumeurs solides [57-63]. Cependant, les HDACs sont cible de plusieurs thérapies épigénétiques présentement utilisées en clinique contre les cancers du sang (HDAC inhibitors, science signaling 2016). Notamment, le Panabioostat est

utilisé en clinique pour le traitement des myélomes multiples [64]. HDAC1 et HDAC6 sont surexprimés dans les lymphomes cutanés à cellules T (LCCT) et le SAHA, un pan inhibiteur des HDACs, a été approuvé par la FDA en 2006 comme 3^e ligne de traitement contre ce type de cancer [65]. La romidepsine, un inhibiteur des HDAC de classe I, est également approuvée par la FDA pour le traitement des LCCT [66].

La formation de protéines de fusion impliquant des KAT mène à une fonction anormale de celles-ci [67]. Globalement, une désacétylation en périphérie des régions promotrices favorise la compaction de la chromatine et donc l'inhibition d'expression de gènes régulateurs, notamment les gènes suppresseurs de tumeurs. Au contraire, une augmentation d'acétylation favorise l'expression d'oncogènes. Un changement d'acétylation affecte également le recrutement de facteurs de transcription [25].

Deuxièmement, le profil de méthylation est également largement affecté dans le cancer. La dérégulation des HMT responsables de l'ajout de marques répressives sur la chromatine mène à un changement de positionnement des groupements méthyles et à l'inhibition anormale de certains gènes [68, 69]. De plus, une épimutation des KDM qui agissent en concert avec les HMT peut tout autant favoriser une expression ou une inactivation anormale des gènes. Ainsi, l'implication des KDM dans la progression tumorale est contexte-dépendante,

mais fait également de ceux-ci des cibles pharmacologiques de choix pour une approche personnalisée de la chimiothérapie [48].

1.1.4 Les médicaments épigénétiques

Bien que les modifications épigénétiques contribuent grandement à la tumorigenèse des cellules, ces changements sont réversibles et font donc des enzymes épigénétiques des cibles intéressantes pour les thérapies. Il existe 2 types de médicaments qui ciblent l'épigénome : les molécules à large spectre (médicaments non-spécifiques) et les molécules ayant une cible spécifique (thérapie ciblée) [70, 71].

1.1.4.1 Médicaments non-spécifiques

1.1.4.1.1 Inhibiteurs de DNMT

Les premiers inhibiteurs de la méthylation de l'ADN, et les plus connus, sont l'azacitidine et la décitabine, qui ont été utilisés, et restent à ce jour approuvés pour le traitement des syndromes myélodysplasiques [72, 73]. Ces molécules sont des analogues de l'acide nucléique cytidine ou 2'dexozycytidine (respectivement) où un carbone a été chimiquement remplacé par une molécule

d'azote et s'incorpore dans l'ARN ou l'ADN de cellules en division [74, 75]. La déméthylation induit la réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs et l'entrée en apoptose des cellules cancéreuses. Une monothérapie de DNMT est encore limitée à certains cancers hématologiques, puisqu'il n'a à ce jour aucun rapport d'effet anticancéreux contre des tumeurs solides [76].

1.1.4.1.2 Inhibiteurs de HDAC

Les inhibiteurs d'HDAC (HDACi) ont été découverts lors de criblage pour l'identification de nouvelles molécules ciblant les leucémies [77]. Cette classe de médicaments comprend notamment le vorinostat, le belinostat et la romidepsine, qui sont tous approuvés par la FDA pour le traitement de certains cancers hématologiques. Malgré ces approbations, les monothérapies d'HDACi ne démontrent peu ou pas d'effets contre d'autres types de tumeurs lors d'essais cliniques [57-63].

1.1.4.1.3 Médicaments interagissant avec les enzymes qui transmettent le signal épigénétique

Dans cette classe de médicaments, on retrouve majoritairement des inhibiteurs des bromodomaines (iBET). La famille des iBET origine du développement d'un inhibiteur de BRD4, un facteur de transcription dont la régulation est altérée dans

plusieurs types de cancer. Les iBET ont un effet très large sur l'épigénome des cellules traitées et ont démontré une grande efficacité lors d'études précliniques, permettant présentement leur entrée dans les premières phases d'études cliniques [78].

1.1.4.2 Médicaments spécifiques

Comme mentionné précédemment, plusieurs épimutations ont été répertoriées en cancer, ce qui en suit le développement d'inhibiteurs ciblant spécifiquement ces variants d'enzymes. Les inhibiteurs spécifiques ciblent des enzymes de toutes les familles d'enzymes épigénétiques : *erasers*, *readers* et *writers* compris.

La spécificité des épimutations à un sous-type précis de cancer et sa contribution à la tumorigenèse dans un contexte pathologique particulier font en sorte que l'activité anticancéreuse de ces inhibiteurs est hautement spécifique à un type précis de patient. Les dernières années ont vu une explosion du développement de molécules ciblant ces enzymes (revue dans [3]). La spécificité d'efficacité est grandement reflétée dans les résultats d'essais précliniques et cliniques. Par exemple, EZH2 ou KMT4 est suractivé dans plusieurs lymphomes et est la cible de plusieurs inhibiteurs en développement [79, 80]. De plus, l'inhibition de DOT1L (KMT2A) semble efficace in vitro contre les leucémies mixtes [81].

1.1.4.3 Combinaisons de médicaments épigénétiques

Bien que l'efficacité en monothérapie de certains médicaments soit prouvée, il est rare qu'un seul agent puisse traiter un cancer à lui seul. De plus, puisque les mécanismes épigénétiques sont orchestrés par plusieurs processus et qu'un cancer n'a rarement qu'une seule épimutation, il est logique d'envisager que le traitement par combinaison a de meilleures chances d'être efficace, ou du moins d'augmenter l'efficacité des médicaments administrés seuls [82].

1.1.4.3.1 DNMTi et HDACi

Premièrement, l'interaction entre les processus de méthylation de l'ADN et les modifications de la chromatine fournit une justification pour la combinaison de médicaments ciblant ces enzymes (HDACi et DNMTi). L'hyperméthylation des promoteurs et la présence aberrante de marques répressives de la chromatine sont induites par les DNMTs et les HDACs respectivement [83]. Cette reprogrammation globale de l'épigénétique permet le maintien de l'extinction des gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules cancéreuses. Les DNMTs recrutent également les HDACs pour aider à la répression transcriptionnelle des GSTs [83]. Ainsi, les HDACi inhibent l'activité de plusieurs HDAC résultant en une augmentation de l'acétylation des histones et les DNMTi induit l'hypométhylation

des promoteur des GSTs, ce qui permet une ré-expression robuste de ces gènes clés, qui induisent à leur tour la différenciation, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules cancéreuses [84].

Plusieurs études dans des modèles précliniques de leucémies et de tumeurs solides démontrent cette activité synergique entre les DNMTi et HDACi [84-87]. Par exemple, des études cliniques de phase I ont démontré que la combinaison de l'azacitidine (DNMTi) et le panobinostat (HDACi) était efficace contre les leucémies myéloïdes aiguës [88]. Le vorinostat en combinaison avec la decitabine a également démontré une bonne efficacité contre ce type de leucémie [89].

1.1.4.3.2 DNMTi ou HDACi et chimiothérapie classique

Deuxièmement, un des mécanismes de résistance proposé contre la chimiothérapie (médicament cytotoxique) serait la signalisation épigénétique sous-jacente [90]. Ainsi, en combinant des HDACi ou des DNMTi avec la chimiothérapie classique, il serait hypothétiquement possible d'augmenter son efficacité et réduire la proportion de patients résistants. Notamment, une combinaison de DNMTi avec la chimiothérapie semble avoir des effets bénéfiques contre divers types de cancers solides [91-96]. Par exemple, un traitement au SGI-110, un agent hypo-méthylant, re-sensibiliserait des cellules du cancer de l'ovaire à un traitement au cisplatine, un antinéoplasique couramment utilisé en

chimiothérapie [94]. Également, une combinaison entre la decitabine (DNMTi) et le cisplatine (antinéoplasique) serait efficace contre les cancers du poumon non à petites cellules non-opérables [91].

1.1.4.3.3 Combinaison de médicaments épigénétiques et immunothérapie

Finalement, l'immunothérapie se base sur la capacité des cellules cancéreuses à échapper à la détection du système immunitaire [97-99]. Dans des récentes études, des patients atteints de NSCLC qui avait précédemment été traités avec des DNMTi ont démontré un meilleur taux de succès lorsqu' une immunothérapie est administrée [100]. Un traitement avec de l'azacytidine, un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, sensibilise des cellules de cancer du poumon à l'inhibition des *checkpoints* immunitaires ciblant l'interaction entre PD-L1 et PD1[100]. Ceci met donc en évidence que les thérapies épigénétiques auraient le potentiel de re-sensibiliser certains types de tumeurs à la détection du système immunitaire et offre donc une justification à cette combinaison en clinique.

1.2 Le cancer du poumon

Le cancer du poumon est non seulement le cancer qui affecte le plus de personnes en Amérique, mais dans le monde. Ce cancer est le plus léthal chez l'homme et le second chez la femme, suivant directement le cancer du sein [101, 102]. Le haut taux de mortalité est notamment dû à la détection tardive et à l'échec des traitements classiques, comme la radiothérapie et la chimiothérapie, sur les tumeurs avancées. Les facteurs de risque les plus courants sont le tabagisme, la fumée secondaire, la diète et nutrition, l'alcool, le manque d'exercice physique, la pollution de l'air ou une prédisposition génétique [103].

Bien que les poumons soient un site courant pour les métastases provenant d'autres tissus, celles-ci ne sont pas considérées comme étant des cancers du poumon puisqu'elles proviennent d'un autre organe. Ces tumeurs secondaires sont tout simplement nommées par leur organe de provenance [101, 102].

Le cancer du poumon, également appelé carcinome du poumon, est dérivé des cellules épithéliales et peut être divisé en 2 types selon l'histologie : le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) est la forme la plus prévalente représentant environ 85% des cas, et le cancer du poumon à petites cellules (CPPC) qui compose le dernier 15% [101, 104]. Cette classification permet de

déterminer la prise en charge des patients et aide à établir un pronostic. Le cancer primitif du poumon peut également se propager dans d'autres organes, notamment le cerveau, le foie, les os et des glandes adrénorégulatrices [103].

1.2.1 Cancer du poumon non à petites cellules

Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) comporte 3 sous-types : l'adénocarcinome (40%), le carcinome épidermoïde du poumon (25-30%) et le carcinome à grandes cellules (10-15%). On retrouve l'adénocarcinome en périphérie du poumon, tandis que le carcinome épidermoïde du poumon prend son origine dans les cellules squameuses qui tapissent les bronches. Quant à lui, le carcinome à grandes cellules est retrouvé partout dans les poumons et se développe rapidement, ce qui rend sa détection précoce difficile [101, 103, 105].

La progression des CPNPC est divisée en 4 stades (figure 8), basée sur des observations cliniques ainsi que biologiques [106, 107].

Stade I: Une tumeur localisée de moins de 4mm qui ne s'est pas répandue dans les ganglions à proximité ni dans les autres structures du système respiratoire.

Stade II (IIa and IIb) : Une tumeur localisée de 4 à 7mm qui ne s'est répandue dans les ganglions à proximité, sans toutefois atteindre les autres structures du système respiratoire.

Stade III (IIIa and IIIb); Une tumeur localisée de plus de 7mm qui s'est propagée dans les ganglions et structures du système respiratoire.

Stade IV: Un cancer métastatique répandu dans les 2 lobes des poumons [108].

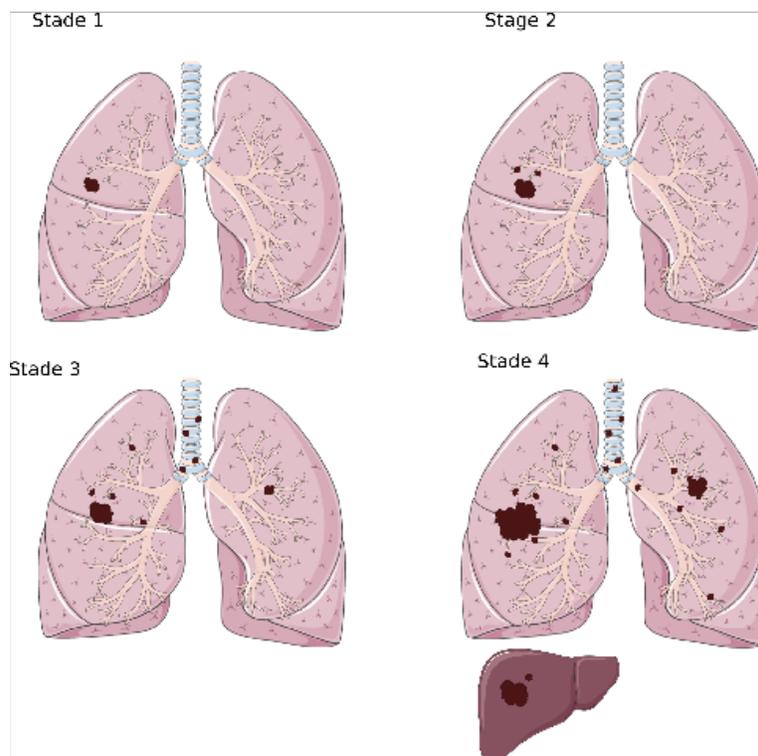


Figure 8. Représentation des différents stades du cancer du poumon non à petites cellules.

Stade 1; tumeur localisée de moins de 4 mm. Stade 2; tumeur localisée de 4 à 7 mm. Stade 3; tumeur propagée dans les ganglions et autres structures du système respiratoire. Stade 4; cancer métastatique.

1.2.2 Traitement des adénocarcinomes

Lorsqu'un cancer du poumon est détecté, le traitement est déterminé en fonction du stade de la tumeur [106].

Stade I : Dans certains cas, une simple résection chirurgicale est suffisante ; soit en enlevant le lobe où se trouve la tumeur dans son entièreté ou simplement une section du lobe. Une lobectomie est préférable, si le patient est en assez bonne santé pour la tolérer, puisqu'elle permet des meilleures chances de survie sans récurrence à long-terme [109]. Un patient peut être traité avec de la chimiothérapie adjuvante à la chirurgie si la tumeur, en fonction de sa taille et son emplacement, a de plus fortes chances de récurrence, mais une récurrence du cancer est souvent dûe à une tumeur secondaire. Une autre option est de la radiothérapie à postériori de la chirurgie pour s'assurer d'avoir éliminé toutes les cellules cancéreuses [103, 110].

Stade II : Traitement par résection chirurgicale (poumon au complet ou lobe) si les patients sont en bonne santé, ainsi que tous ganglions ayant des cellules cancéreuses. Un traitement par radiation avec ou sans chimiothérapie est fortement recommandé après la chirurgie [103].

Stade III : La décision de traitement à ce stade dépend de la taille de la tumeur, les quantités de ganglions atteints et leur localisation puis l'état de santé général du patient. Un processus standard de traitement débute avec de la radiothérapie concomitante à la chimiothérapie (chimio-radiothérapie) suivi d'une intervention chirurgicale afin d'enlever tous tissus malins restants [111]. Lorsque ce régime de traitement n'est pas possible, un cancer du poumon de stade III peut également être traité par immunothérapie (pembrolizumab) [112, 113].

Stade IV : Un cancer de stade IV est métastatique et s'est répandu dans les structures du système respiratoire. Pour ces raisons, les probabilités que le traitement soit curatif en sont très faibles. Malgré tout, plusieurs options de traitement sont disponibles afin de diminuer sa progression et améliorer la qualité de vie des patients. Une thérapie ciblée, en fonction de la signature génétique et biologique de la tumeur, est une option. Par exemple, des inhibiteurs spécifiques de certaines enzymes dérégulées sont disponible sur le marché. Les cibles les plus courantes sont les gènes ALK, EGFR, BRAF et ROS1 [114-118]. Une autre option est l'immunothérapie combinée à de la chimiothérapie [108, 119].

1.2.3 Dérégulation épigénétique des CPNPC

Le profil épigénétique des CPNPC est très diversifié et contribue non seulement à la progression de la tumeur, mais joue également un rôle dans la résistance au traitement. Les épimutations retrouvées chez les patients touchent autant les profils de méthylation de l'ADN que les modifications post-traductionnelles des histones [120].

1.2.3.1 Hyperméthylation de l'ADN

Une hyperméthylation de l'ADN est un facteur courant dans les CPNPC et induit l'inactivation de l'expression de plusieurs GST [121]. Une surexpression de DNMT1 dans les stades précoces de cancer induit l'extinction de GST importants comme RASSF1A, DAPK, MGMT et CDKN2 [122-124]. Tous ces gènes régulent des processus biologiques importants dont la dérégulation mène à la carcinogénèse. Par exemple, CDKN2 encode la protéine p16 qui joue un rôle crucial dans la régulation du cycle cellulaire et MGMT dans la réponse aux dommages à l'ADN [125]. Plus le cancer progresse vers un stade invasif, plus on observe une augmentation du niveau de méthylation de l'ADN [120]. L'inhibition de la transcription induit par une hyperméthylation globale affecte des processus

biologiques clés comme la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM), la différenciation cellulaire et le cycle cellulaire. Également, le phénotype CIMP (un profil d'hyperméthylation des îlots CpG) peut aider à la stratification par risque des patients atteints de CPNPC [126, 127].

1.2.3.2 Modifications post-traductionnelles

Plusieurs modifications post-traductionnelles aberrantes sont également impliquées dans le cancer du poumon. Par exemple, une diminution de H4K20me3 est corrélée avec la progression du cancer du poumon [128, 129]. Les enzymes qui apposent ces marques sont également dérégulées dans le cancer. Par exemple, EZH2, une méthyltransférase responsable de la méthylation de la lysine 27 sur l'histone 3 (H3K27) est fortement surexprimée chez certains types de CPNPC, ce qui empêche l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation cellulaire [130, 131]. L'amplification de SETDB1, une surexpression de KDM2A et de G9a puis la perte d'expression de BRG1 ont également été observés comme étant impliqués dans la pathogenèse [132-135].

1.3 Limitations des modèles 2-dimensions in vitro

Une grande majorité des travaux précliniques *in vitro* portant sur les cancers solides sont encore à ce jour effectués à l'aide de modèles 2-dimensions. Cependant, ce type de modèle ne fournit pas une représentation adéquate des conditions physiopathologiques des tumeurs solides chez les patients [136]. Ceci fait en sorte que malgré une efficacité démontré lors d'essais *in vitro*, la majorité des médicaments qui passe en phase clinique ne démontre plus aucune efficacité [137].

1.3.1 Le microenvironnement

Une des différences majeures entre les modèles 2D et les tumeurs solides est le manque d'interaction avec le microenvironnement. Effectivement, la composition des tumeurs *in vivo* est très hétérogène. Les tumeurs sont composées non seulement de cellules cancéreuses, mais de fibroblastes sains et cancéreux, de cellules immunitaires, des vaisseaux sanguins et de matrice extracellulaire [138]. Toutes ces composantes interagissent avec les cellules tumorales et modifient leur processus biologique, leur évolution et la réponse aux médicaments [139, 140]. Le microenvironnement tumoral est complètement absent des modèles 2D, puisque les cellules y sont cultivées en monoculture.

1.3.2 Le métabolisme

1.3.2.1 Croissance rapide et isolée

Une autre limitation des cellules cultivées dans des pétris 2D est leur croissance très rapide et isolée, comparativement aux cellules in vivo. Bien que le temps de doublement d'une population soit difficile à déterminer chez un patient, la croissance des cellules en pétris est beaucoup plus rapide que celle in situ [141, 142]. Ceci est également problématique lors d'études portant sur des molécules anti-cancéreuses dont l'action dépend du cycle cellulaire.

1.3.2.2 Disponibilité des nutriments

Les cellules tumorales, qu'elles soient in vivo ou in vitro, ont des besoins énergétiques et anaboliques élevés [143]. Les méthodes de cultures traditionnelles font en sorte que les cellules sont constamment en phase exponentielle de croissance et ne manquent jamais de nutriments. Bien que cela soit pratique au niveau expérimental, cela n'est aucunement représentatif des tumeurs solides puisque les cellules au centre de la tumeur sont souvent en manque de nutriments et d'oxygène et s'adaptent à ces conditions, un phénotype que l'on perd totalement lorsque cultivé en 2D [142, 144]. De plus, les cellules en

2D ont accès à un niveau d'oxygène artificiel de 20% beaucoup trop élevé contrairement aux tissus humains (normoxie, avec une pression partielle en oxygène de 5%) aux tumeurs humaines, qui sont caractérisées par de l'hypoxie (jusqu'à 2% seulement d'oxygène) et de la nécrose [145, 146].

1.3.3 Altération génétique et du transcriptome

Une autre problématique des modèles 2D nouvellement mise en lumière est le fait que la culture 2D est associée avec une dérive génétique. Récemment, une étude a démontré que la culture en 2D induisait une évolution clonale et des changements au niveau du génome si importants qu'ils influencent drastiquement la réponse aux médicaments [147]. Ce même groupe a également démontré que la même lignée cellulaire arborait un profil d'expression de gènes et même des mutations et variants différents d'un laboratoire à un autre [147]. De plus, une récente publication dans *Science* (Gosselin et al) démontre que le passage des cellules humaines en culture 2D altère complètement leur profil transcriptomique, et ce aussi rapidement que 4 heures après le passage de la biopsie au pétri [148]. La culture *in vitro* résulte en un changement significatif d'expression de plus de 1000 gènes, avec une augmentation de gènes impliqués dans le processus d'inflammation et de la réponse au stress [148]. De plus, leurs résultats démontrent qu'après 7 jours *in vitro*, on observe un gain de 14% de nouvelles modifications sur H3K27ac ainsi qu'une diminution de 20% des marques

H3K27ac par rapport au profil *in vivo* initial [148]. Ces analyses ont également démontré que les cellules perdaient environ 60% des modifications *super-enhancer*, avec un gain de nouvelles marques *super-enhancer* de plus de 60% [148].

Tous ces éléments modifient la biologie et le comportement des cellules cancéreuses, rendant la comparaison entre des essais *in vitro* et études cliniques quasi-impossible. Pour pallier ces lacunes, une des solutions est le développement de modèle en 3 dimensions, qui aurait le potentiel de mieux représenter la physiopathologie des tumeurs solides et donc d'optimiser la découverte de nouveaux traitements efficaces en phase préclinique [149-151]. L'hétérogénéité des tumeurs solides *in vivo* serait reproduite *in vitro* à l'aide d'un modèle 3D qui intègre une composante de co-culture avec des fibroblastes sains, des cellules du système immunitaires (NK, cytokines) et des cellules endothéliales (HUVEC).

1.4 Hypothèse et objectifs

Hypothèse

Les modèles de recherche préclinique *in vitro* les plus largement utilisés en développement de médicaments sont les modèles de culture cellulaire 2D. Cependant, ceux-ci ne sont pas représentatifs de la biologie des tumeurs solides. Ces lacunes expliqueraient également le faible taux de succès des médicaments lors du passage aux phases cliniques. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un nouveau modèle de criblage à haut débit est essentiel à l'amélioration du domaine et permettrait de représenter plus adéquatement les tumeurs solides lors d'essais précliniques.

Objectifs

- 1) Développer un nouvel outil de criblage en 3-dimensions dans le but d'être plus représentatif des tumeurs solides.
- 2) Caractériser des changements phénotypiques et épigénétiques qui se produisent au sein des sphéroïdes au fil du temps.
- 3) Valider si la réponse aux médicaments diffère des modèles 2D et, si possible, identifier de nouveaux agents épigénétiques efficaces contre ce type de cancer.

Chapitre 2 : Article

2. Article

Status: En préparation

Journal: eLife Sciences Publications

Contributions des auteurs :

J'ai conçu, effectué et analysé 85 à 90% des expériences et résultats qui se retrouvent dans ce manuscrit. J'ai rédigé 90% du manuscrit en anglais.

Les co-auteurs ont majoritairement aidé à la rédaction du manuscrit et à l'exécution des essais pharmacologiques en laboratoire.

Running Title:

3D spheroids of lung cancer exhibit time-dependent epigenetic changes with type I PRMT sensitivity.

Authors:

Gabrielle MCINNES¹⁻², Elisa CLEMENT¹⁻² and Noël J-M RAYNAL¹⁻².

¹Centre de recherche du CHU Sainte-Justine

²Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal

Funding:

This work was funded by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Fondation Charles-Bruneau.

Conflict of Interests:

The Authors declare that they have no conflict of interest relevant the above manuscript.

Acknowledgements:

The MS023, MS094, TP064, TP064N, SCG707, XYI, MS049, MS049N SGC5901 was supplied by the Structural Genomics Consortium under an Open Science Trust Agreement: <http://www.thesgc.org/click-trust> .

2.1 Abstract

Lack of efficacy of small molecules targeting cancer cell epigenome in clinical trials may be due to the lack of representation of physio-pathologically relevant biology of solid tumors in the preclinical 2D models used to identify these molecules. 2D monoculture lacks cell-cell interaction; there is no microenvironment component, an excessively rapid cell growth and disproportionate nutrient and oxygen availability. Furthermore, the epigenetic profiles of commercially available cancer cell lines are not representative of the epigenetic profiles of solid tumors found in patients. Still, the drug discovery field relies almost entirely on high throughput 2D models, rendering the identification of novel molecular target ineffective. Our goal was to create a new methodology that could enable the preclinical models to be more representative of the epigenome of solid tumors. To this extent, we developed a 3D culture protocol in 96-well plates that allowed adenocarcinoma cells to be cultured for up to 38 days. Cells within spheroids rapidly adapt to the 3D culture by lowering their doubling time and rapidly decreasing their size and viability. Furthermore, we observed a time-dependent modulation in the expression profile of key markers like the KAT2A / KAT3B complex and KAT7 being downregulated after 17 days in 3D. BRG1, LSD1 and Tubulin were also found significantly downregulated, while HDAC6 expression rapidly increased within spheroids. While the global

acetylation level did not change, 3D culture induced a stable increase in the levels of H3K9me1 and H3K9me3. The shift of the adenocarcinoma's epigenetic profile also affected drug response compared to their 2D equivalent. Out of 158 epigenetic-targeting compounds tested, all were significantly less potent against 10- or 24-days old spheroids. Only 1 compound, MS023, a type I PRMT inhibitor, displayed more than 40% efficacy against 24 days spheroids. Overall, this study demonstrates that 3D spheroids in long-term culture exhibit a time-dependent epigenetic reprogramming that mimic tumors in situ and a more stringent drug-sensitivity profile.

2.2 Introduction

Although epigenetic drugs have demonstrated potent preclinical activity justifying the onset of several clinical trials against solid tumors, the results showed a lack of efficacy in patients. Clinical failure of epigenetic therapies against solid tumors may be due to the lack of representation of current preclinical models to physiological condition of those tumors in situ. Small molecule development in oncology mainly involves high-throughput drug screenings and preclinical validation studies using cancer cells grown in two-dimension (2D). However, cancer cells grown in 2D monolayer petri dish do not reflect the context of a solid tumor [1-4]. Indeed, there is a lack of cell-cell interactions, an isolated and rapid growth, no attachment to an extracellular matrix and a disproportionate level of nutriment and oxygen availability [5-7]. Furthermore, there is a strong drift in the transcriptional and epigenetic signatures when comparing cells in situ and after several days in 2D [1, 2].

Altogether, these factors render drug discovery for solid tumors very difficult, particularly considering the epigenetic reprogramming occurring during the culture of tumors cells in 2D. Despite the overall success of epigenetic therapies against lung cancer in vitro and in vivo using DNA methyltransferase inhibitor (DNMTi) and histone deacetylase inhibitor (HDACi) (reviewed in [8-10]), these clinical trials showed disappointing results [11-19].

To overcome this challenge, there is a burgeoning interest of 3D in vitro models in the drug discovery field. Since broad epigenetic changes take time to implement, we wanted to develop a methodology for long-term 3D spheroid culture to further characterize its' impact on the whole cell epigenome, which has not yet been done. To this end, we developed a method for the long-term culture of lung adenocarcinoma spheroids. Ultimately, our goal was to generate a model that displays an epigenetic landscape representative of cancerous cells in situ, to better identify novel molecular targets and compounds for the epigenetic treatment of lung cancer.

2.3 Methods and materials

3D cell culture

A549 lung adenocarcinoma cells (ATCC CCL-185) were seeded directly from monolayers (2D culture flask) into PrimeSurface® 3D Culture Spheroid 96 well Ultra-low Attachment (ULA) Plates (SBio®, MS-9096UZ) at a density of 20×10^3 cells per well in a final volume of 100 μ l. After a brief centrifugation (100g – 5 minutes), cells were cultured for 72 hours to allow the spontaneous formation of a spheroid in F12-K medium supplemented with 10% FBS (5% CO₂ – 37°C). Spheroids were then pooled together and trypsinized (0.25%) into single cell suspension and replated into ULA plates at the same density (20×10^3 cells per well). Four days after, 100 μ l of fresh media is added to each well to provide fresh

nutriments. This methodology is then repeated every 7 days to achieve long-term 3D cell culture.

Viability assay, cell size and cell cycle analysis

For viability and cell size assays, A549 cells from spheroids (100K cells per mL) and monolayers (20K cells per mL) were dissociated as described previously and cells were labelled with Guava®ViaCount™ reagent. Cell viability was measured using Guava® Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) (Millipore Sigma-Aldrich) and cell size was measured using FACS FSC-H. For cell cycle analysis, A549 cells from spheroids (100K cells per mL) and monolayers (20K cells per mL) were trypsinized and fixed in cold 70% ethanol (20 minutes at -20°C). Samples were then washed with PBS and incubated at 37°C in propidium iodide (PI) staining solution (0.2 mg/ml RNase; 0.25 mg/ml PI in PBS) in the dark, for 30 minutes prior to FACS analysis.

Cell culture and drug treatments

A549 adenocarcinoma cells were tested for mycoplasma contamination (cat#LT07-418). A549 monolayers and spheroids grown for 10 and 24 days were treated with 154 compounds of the Epigenetics Compound Library from Selleckchem (# L1900). All drugs are dissolved in DMSO at 10 mM and were diluted in media. Cells and spheroids were exposed for 48h at a concentration of 10 µM (drugs and media were not changed during drug treatment). For drug

validations, PRMT inhibitors MS023, MS094, TP064, TP064N, SCG707, XYI, MS049, MS049N SGC5901 were kindly provided by The Structural Genomics Consortium (SGC). Cells and spheroids were treated for 48h with TP064, TP064N, SCG707, XYI, MS049, MS049N SGC5901 at 100 nM, 500 nM, 1 μ M, 5 μ M and 10 μ M. All inhibitors were diluted in media and cellular viability was measured by flow cytometry. For MS023, half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was assessed after 48h exposition to concentration ranging from 5 nM to 500 μ M. IC_{50} values were calculated with GraphPad Prism software.

Protein and histone extractions

Whole cell proteins were extracted using ice-cold lysis buffer (5 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl pH 7.4, 50 mM NaF, 250 mM NaCl, 0.1% Triton, 1 mM PMSF and 0.1 mM Na_3VO_4) supplemented with Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Histone proteins were harvested with ice cold Triton Extraction Buffer (TEB; 0.5% Triton, 2 mM PMSF, 0.02% NaN_3 , 10 mM sodium butyrate), supplemented with Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche) prior to over-night acid-extraction. Following migration on SDS-PAGE gel (12% acrylamide for histones and 4-20% acrylamide for whole cell proteins), proteins were transferred onto a polyvinyl difluoride (PVDF) 0.2 μ m membrane. All experiments were performed in triplicate. ImageJ software was used to perform densitometric analyses. ANOVA tests were performed with GraphPad Prism software. Antibodies and suppliers are listed in the Supplementary file 1.

qPCR analysis

Gene expression analysis of EMT markers snail, slug, N-cadherin and E-cadherin was done by qPCR. A549 spheroids were culture in 3D (as previously described) and harvested after 3, 10, 17, 24, 31 and 38 days. A549 cells grown in 2D monolayer petri dish were also harvested and used as control. We used QIAshredder (#79654) to homogenize cell lysates and eliminate debris prior to RNA extraction using RNeasy Mini Kit (#74104). DNase treatment was performed on column (#79254) and RNA concentration was measured by Nanodrop. 30 ng of ARN was used for RT-PCR and 1 ul of cDNA was used to perform each qPCR. ACTB, HPRT and B2M were used as endogenous expression control. Each culture timepoint was analyzed in triplicates and data is represented as a relative quantification ($\Delta\Delta C_T$) to 2D control.

Metabolism analysis

3D and 2D culture ATP levels of A549 cells were measured by *Cell titerGlo 3D* 3 days after seeding at 6 different initial densities: 2.5, 5, 10, 25, 50 and 100K cells per well. The Relative Luminescence Unit (RLU) is directly correlated with ATP levels within well.

Incucyte analysis

Spheroid formation was monitored using the live cell imaging system Incucyte™. Cells were seeded in the ULA plates at different density (5×10^3 , 20×10^3 and 40×10^3 cells per well) and pictures were taken every 8 hours for the first 2 days and every

24 hours up until day 5. Spheroid diameter was measured with built-in Incucyte™ area analysis function.

2.4 Results

Spheroid sub-culture methodology allows lung cancer cells to grow and remain viable while adapting to a 3D microenvironment

In order to assess the impact of 3D culture on cancer cell epigenetic profile, we developed a model that allowed long-term spheroid culture. Briefly, cells were seeded in ultra-low attachment (ULA) plates and dissociated and re-seeded at specific time points, allowing the maintenance of adenocarcinoma cells in spheroids for several weeks (Figure 1a). This method proved effective at generating highly reproducible spheroids (Figure 1c) and is also crucial for 3D long-term culture and cell cycle establishment of newly acquired epigenetic features triggered by the 3D microenvironment. If left unpassed, the A549 cells rapidly lose viability, decreasing to 50% after 1 week and 20% after 2 weeks (Supp. figure 1a). Surprisingly, not all cancer cell lines have the ability to sustain long-term 3D culture. Notably, osteosarcoma cell U2OS, that produce 3D spheroids, died shortly after the first passage in 3D (Supp. figure 1c).

Next, we monitored total area (μm^2) of each spheroid by imaging with an Incucyte™ (Figure 1b). Regardless of their initial seeding density, spheroids

reached a steady diameter around the third day (Figure 1d). We then asked if cells within the spheroids continued to grow. Despite of the diameter remaining stable, the number of cells inside the spheroid kept increasing over time (Figure 1e). Although cells within spheroids still proliferated, they did so at a much slower rate than in monolayer culture (Figure 1f). The population doubling time exhibited a significant reduction, going from 22 hours in 2D culture to 40 hours in 3-days old spheroids. Then, the doubling time further increased to an average of 150 hours from day 10 to 24. In 31-days old spheroid, the population reached a doubling time greater than 300 hours. Cell metabolism, measured by cellular ATP levels using Cell titer Glo, was significantly reduced in cells from 3-days old spheroids as compare to cells in 2D (Figure 1g). After 24 hours in 3D, cell viability was significantly reduced by 25% as compared to cells in 2D, which remained stable until the 24th day in 3D (Figure 2a). Cell viability decreased even more, reaching 30% at 38 days. (Supp. Figure 1b). This result prompted us to investigate cell cycle distribution throughout 3D culture process (Figure 2b-c). Consistent with the doubling time increase in 3D (Figure 1f), the cells population in S phase rapidly decreased after 1 day in 3D (Figure 2b). We also found a significant increase of apoptotic cells after 1 day in 3D, which resumed to control level on day 3 and for the rest of the 3D culture (Figure 2b). After day 3, cell cycle stabilized and remained similar for the rest of the long-term 3D culture, suggesting an adaptation phase to the 3D culture causing a transitory cellular stress (Figure 2b). Collectively, these data support the importance of long-term spheroid culture in order to allow complete adaptation and investigate changes that are not related

to a stress response but to the actual 3D cell culture reprogramming. 3D cell culture also caused a significant 25% reduction of cell size compared to cells in a 2D cultured as measured by forward side scatter (Figure 2 d-e). Metabolic and phenotypic changes can be caused by the lack of oxygen within a spheroid. Therefore, we measured cell response to a hypoxic microenvironment. Using cell extracts, we measured by qPCR gene expression of hypoxia responsive genes *HIF1 α* , *CDKN1A* and *catalase*. Although the *HIF1 α* expression remains stable, we did observe a significant increase in the expression of *catalase*, an oxidative stress marker, as well of a significant decrease in *CDKN1A*, which inhibition is associated with tumor progression (Figure 2f) [20, 21]. This prompted us to stop our 3D culture at 38 days (Figure 2f). Taken together, our results show that there is a rapid adaptation to the 3D culture and phenotypic and metabolic changes occurring as early as 24 hours in 3D.

3D culture induces expression changes of key epigenetic regulators and histone PTMs

We then sought to investigate if spheroid culture modulated the expression levels of epigenomic regulating enzymes. For this purpose, spheroids were cultured up to 38 days and proteins and histones were harvested at day 3, 10, 17, 24, 31 and 38. We compared the expression level of a series of proteins involved in epigenetic regulation in spheroids vs A549 cells in monolayer. Although some proteins did not exhibit expression difference (Supp. figure 2 a-b), several

regulators were marked by a significant up- or down-regulation, which appears to be time dependent. Specifically, KAT family complex KAT3A and KAT3B expression was reduced by 90% after 17 days in 3D, along with a decrease in KAT2A and KAT7 expression (Figure 3a). KAT6A expression showed a modest increase from day 10 to 24. Conversely, HDAC6, a histone deacetylase, exhibited a significant upregulation after 10 days in 3D (Figure 3b). We also noticed a downregulation of BRG1, a chromatin remodeler enzyme, after 17 days in 3D and a rapid decrease in tubulin and LSD-1 expression (Figure 3b). The marked loss of many KATs did not impact overall acetylation levels (Supp. figure 2c). However, H3K9ac displayed a transient upregulation and H4K16ac was rapidly increased (Figure 3c-d). Both of those acetylation marks are KAT6A substrates.

Histone methylation levels, on the other hand, showed a global increase on specific residues (Figure 3e-f). Chromatin repressive marks H3K9me1 and H3K9me3 were increased while H3K9me2 and H3K27me3 increased only after at 10 days but returned to basal expression after 31 days (Figure 3e-f). These results provide evidence that 3D culture shifts the cancer cell epigenome, in a time-dependent manner, towards a more condensed nuclei and heterochromatin state.

Lung spheroid do not display an EMT phenotype while in vitro

In recent studies, it has been shown that the knockdown of BRG1 is linked with promotion of NSCLC aggressiveness [22, 23]. Furthermore, an overexpression of HDAC6 is correlated with tumorigenesis [24]. We observed a rapid decrease of

mesenchymal markers snail, slug and N-Cadherin combined with an increase in epithelial marker E-Cadherin, which does not mimic an EMT phenotype (Figure 4a). However, other groups showed that E-cadherin expression is required for the spheroid formation of cancer cells [25, 26]. Therefore, it is not clear whether 3D cell culture trigger an EMT phenotype. Further experiments measuring migration and invasion need to be performed to answer this question.

Lung spheroids are sensitive to type I PRMT inhibition

Finally, we asked if the phenotypic and epigenetic changes occurring in 3D would translate into a different drug response. To answer this question, we treated the adenocarcinoma 2D monolayer and 10- or 24-days old spheroids with an epigenetic-targeting compound library. All samples were treated a final concentration of 10 μ M for 48h (Figure 5a). As expected for 2D monolayer, the drugs' efficacies had a uniform distribution, ranging from 100 to 0% viability after 48 hours of treatment (Figure 5b). It is of interest to mention that none of the currently approved HDAC inhibitors kept their potency against lung spheroids, once again highlighting the need for more representative screening models (Figure 5c). For 10-days old spheroids, only 6 compounds were able to reduce viability under 50% (Figure 5b); MC1568, UNC0631, ORY-1001 (RG-6016), WHI-P154, MS023 and JIB-04. 4 out of 6 target the cell methylation; MS023 is a type I PRMT inhibitor, UNC0631 is a G9a inhibitor, JIB-04 is a pan-selective jumonji inhibitor and ORY-1001 is a LSD1 inhibitor. MC1568 is the only HDACi still potent

against spheroids and WHI-P154 target the JAK/STAT pathway. ORY-1001 is the only compound used in clinical trials, currently in phase II for the treatment of acute myeloid leukemia.

With 24 days spheroids, only 1 compound out of the 154 could decrease cell viability under 60%: MS023, a Type I Protein Arginine Methyl Transferase (PRMT) inhibitor. (Figure 5b). MS023 activity was validated in 2D with an IC_{50} of 6,47 μ M and proved to be an even greater inhibitor with 24-days old spheroids compared to 10-days old, with IC_{50} values of 48,52 μ M and 26,34 μ M respectively (Figure 5d).

To investigate the mechanism by which MS023 targets spheroids, we looked at the PRMTs expression level in 3D. Surprisingly, no PRMT was overexpressed in 3D (Figure 6a), instead PRMT1 and PRMT6 exhibited a significant protein downregulation (Figure 6a). We additionally found that PRMT1 specific substrate, asymmetric di-methylation on arginine 3 of histone 4 (H4R3me2a), was significantly increased (Figure 6b). This upregulation could be an artefact of global asymmetric di-methylation, but we did not observe a global increase in asymmetrical methylation levels in spheroids (Figure 6b). More studies need to be done to understand the mechanism involved in the increase of H4R3me2a. Finally, we asked if spheroid sensitivity to type I PRMT inhibition could be attributed to one of the family members. To this end, we treated A549 cells in 2D and 3D at 10 or 24 days with 3 specific Type I- inhibitors; MS049 (PRMT4/6),

TP064 (PRMT4 inhibitor), SGC707 (PRMT3). In addition, we also tested one type II inhibitor as a negative control, the GSK591 (targeting PRMT5). None of the above-mentioned inhibitors had a clinically significant effect on cell viability, suggesting that PRMT1 or PRMT2 may be involved in spheroid sensitivity (Figure 6c). In summary, the data shown here suggest that lung spheroids are less sensitive to HDAC inhibition, a response that closely resembles patient lung tumors in many clinical trials. This furthers the argument that current preclinical models inadequately portray a physio-pathological response to drug treatment. In addition, the results show that Type I PRMT inhibition may be a novel target for advanced lung cancer.

2.5 Conclusion

In conclusion, we developed a new long-term 3D method to cultivate adenocarcinoma cells over a long period of time. This method was intended to assess the full epigenetic modifications occurring in 3D, as these marks take time to occur during cell reprogramming or adaptation to a novel microenvironment. We demonstrated that cells rapidly adapt to the 3D culture by decreasing their size, doubling time, viability and metabolism. Furthermore, key epigenetic regulators and histone modifications were significantly altered in 3D. The modification of the epigenome affected the drug response of spheroids compared to their 2D counterpart. Indeed, epigenome-targeting compounds were

significantly less potent against 10- or 24-days old spheroids. This method enabled the discovery of the MS023, a type I PRMT inhibitor, as the only molecule with more the 40% efficacy against 24 days spheroids.

In this article, we describe a new 3D model, which recapitulates specific epigenetic markers associated with advanced lung cancer; namely the increase of H3K27me3, the downregulation of BRG1/SMARCA4 and a HDAC6 upregulation [22-24, 27].

Our model was able to identify a specific sensibility to type I PRMT inhibition. On an interesting note, HDACi had no effects against spheroids, but were very potent when tested against cells in 2D. Interestingly, this 3D models would have predicted the failure of HDACi in the clinic (reviewed in [28]).

Our spheroids' Type I PRMT inhibition sensibility can be partially explained by the spheroid reliance on arginine methylation for survival and the MTAP^{-/-} genetic background of A549 cells. First, a certain level of arginine methylation, ADMA or SDMA, is required for cancer cell survival [29]. When in 3D, we showed that adenocarcinoma cells increase their PRMT1 ADMA-specific substrate H4R3me2A in order to adapt and survive in the new environment. Targeting this enzyme with the MS023 may trigger an important decrease of ADMA and thus drive the cells to apoptosis.

Second, MTAP gene encodes the S-Methyl-5'-Thioadenosine Phosphorylase protein, responsible for the phosphorylation of S-Methyl-5'-Thioadenosine (MTA) to adenine and 5-methylthioribose-1-phosphate. Loss of MTAP expression results in an MTA accumulation, which has an inhibitory action on PRMT5 activity [30]. Since PRMT1 and PRMT5 have a redundancy in pathways and targets, MTAP -/- cells predominantly rely on PRMT1 hence have an increased sensitivity to PRMT1 inhibition [31]. This gives a strong rationale for the combination of PRMT1 and PRMT5 inhibitors in the treatment of MTAP negative lung cancers. Taken together, our results show that long-term spheroid culture is essential to gain an epigenetic landscape that has biological relevance. While this model is an important step towards more representative pre-clinical models, it remains distinct from an actual physio-pathological state. To improve on the model, we need to incorporate co-culture with cancer associated fibroblast and immune cells and add an extracellular matrix to address the lack of interactions that induce the reverse EMT phenotype profile in vitro. Finally, further studies are needed in order to define the epigenetic landscape more broadly with whole transcriptome sequencing.

2.6 References

1. Ben-David, U., et al., *Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response*. Nature, 2018. **560**(7718): p. 325-330.
2. Gosselin, D., et al., *An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity*. Science, 2017. **356**(6344).
3. Miki, Y., et al., *The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012. **131**(3-5): p. 68-75.
4. Hoffmann, O.I., et al., *Impact of the spheroid model complexity on drug response*. J Biotechnol, 2015. **205**: p. 14-23.
5. Lamichhane, S.P., et al., *Recapitulating epithelial tumor microenvironment in vitro using three dimensional tri-culture of human epithelial, endothelial, and mesenchymal cells*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 581.
6. Altorki, N.K., et al., *The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(1): p. 9-31.
7. Kimlin, L.C., G. Casagrande, and V.M. Virador, *In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update*. Mol Carcinog, 2013. **52**(3): p. 167-82.
8. Liu, S.V., et al., *Epigenetic therapy in lung cancer*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 135.
9. Duruisseaux, M. and M. Esteller, *Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications*. Semin Cancer Biol, 2018. **51**: p. 116-128.
10. Mehta, A., et al., *Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy*. Cancer Metastasis Rev, 2015. **34**(2): p. 229-41.
11. Traynor, A.M., et al., *Vorinostat (NSC# 701852) in patients with relapsed non-small cell lung cancer: a Wisconsin Oncology Network phase II study*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(4): p. 522-6.
12. Vansteenkiste, J., et al., *Early phase II trial of oral vorinostat in relapsed or refractory breast, colorectal, or non-small cell lung cancer*. Invest New Drugs, 2008. **26**(5): p. 483-8.
13. Ryan, Q.C., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors or lymphoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(17): p. 3912-22.
14. Otterson, G.A., et al., *Phase II study of the histone deacetylase inhibitor Romidepsin in relapsed small cell lung cancer (Cancer and Leukemia Group B 30304)*. J Thorac Oncol, 2010. **5**(10): p. 1644-8.
15. Schrupp, D.S., et al., *Clinical and molecular responses in lung cancer patients receiving Romidepsin*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(1): p. 188-98.
16. Dasari, A., et al., *A phase I study of sorafenib and vorinostat in patients with advanced solid tumors with expanded cohorts in renal cell carcinoma and non-small cell lung cancer*. Invest New Drugs, 2013. **31**(1): p. 115-25.
17. Ramalingam, S.S., et al., *Carboplatin and Paclitaxel in combination with either vorinostat or placebo for first-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 56-62.
18. Schwartzmann, G., et al., *A phase I trial of cisplatin plus decitabine, a new DNA-hypomethylating agent, in patients with advanced solid tumors and a follow-up*

- early phase II evaluation in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs*, 2000. **18**(1): p. 83-91.
19. Reid, T., et al., *Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pivaloyloxymethyl butyrate (Pivanex, AN-9) in advanced non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2004. **45**(3): p. 381-6.
 20. Shen, C.Y., et al., *Hypoxia and reoxygenation of the lung tissues induced mRNA expressions of superoxide dismutase and catalase and interventions from different antioxidants*. *Transplant Proc*, 2008. **40**(7): p. 2182-4.
 21. Mizokami, K., et al., *Relationship of hypoxia-inducible factor 1alpha and p21WAF1/CIP1 expression to cell apoptosis and clinical outcome in patients with gastric cancer*. *World J Surg Oncol*, 2006. **4**: p. 94.
 22. Orvis, T., et al., *BRG1/SMARCA4 inactivation promotes non-small cell lung cancer aggressiveness by altering chromatin organization*. *Cancer Res*, 2014. **74**(22): p. 6486-6498.
 23. Glaros, S., et al., *Targeted knockout of BRG1 potentiates lung cancer development*. *Cancer Res*, 2008. **68**(10): p. 3689-96.
 24. Li, T., et al., *Histone deacetylase 6 in cancer*. *J Hematol Oncol*, 2018. **11**(1): p. 111.
 25. Lin, R.Z., et al., *Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin*. *Cell Tissue Res*, 2006. **324**(3): p. 411-22.
 26. Stadler, M., et al., *Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 1151.
 27. Mahmood, M.Q., et al., *Epithelial mesenchymal transition (EMT) and non-small cell lung cancer (NSCLC): a mutual association with airway disease*. *Med Oncol*, 2017. **34**(3): p. 45.
 28. Damaskos, C., et al., *Histone Deacetylase Inhibitors as a Novel Targeted Therapy Against Non-small Cell Lung Cancer: Where Are We Now and What Should We Expect?* *Anticancer Res*, 2018. **38**(1): p. 37-43.
 29. Blanc, R.S. and S. Richard, *Arginine Methylation: The Coming of Age*. *Mol Cell*, 2017. **65**(1): p. 8-24.
 30. Fedoriw, A., et al., *Anti-tumor Activity of the Type I PRMT Inhibitor, GSK3368715, Synergizes with PRMT5 Inhibition through MTAP Loss*. *Cancer Cell*, 2019. **36**(1): p. 100-114 e25.
 31. Gao, G., et al., *PRMT1 loss sensitizes cells to PRMT5 inhibition*. *Nucleic Acids Res*, 2019. **47**(10): p. 5038-5048.

2.7 Figure Legends

Figure 1. 3D culture induces a rapid decrease in proliferation of A549 lung cancer cells. **a.** Schematic representation of the long-term 3D culture method **b.** Bright field images of the spheroid formation from day 1 to day 7. Pictures were taken with the Live Cell Imaging System Incucyte™. **c.** Frequency distribution of 96 spheroids area (μm^2) after 0, 1, 3 and 7 days in 3D. Spheroid area was measured with Incucyte™. **d.** Spheroid diameter (mm) at different initial seeding density (5×10^3 , 20×10^3 and 40×10^3 cells per well). Diameter was measured with Incucyte™ every 8 hours for the first 2 days and every 24 hours up until day 5 (Mean \pm SD, N=3). **e.** Number of cells (log) per spheroid for the first 5 days in 3D. Cells were trypsinized and then counted by hemacytometer after trypan blue staining (Mean \pm SD, N=3). **f.** A549 cells doubling time (hours) after 3, 10, 17, 24, 31 and 38 days in 3D (Mean \pm SD, N=3; * $p < 0.05$; One-way Anova). **g.** 3D and 2D culture ATP levels of A549 cells measured by Cell titerGlo 3 days after seeding at 6 different initial densities (2.5, 5, 10, 25, 50 and 100K cells per well). Relative Luminescence Unit (RLU) is directly correlated with ATP levels within well (Mean \pm SD, N=4, * $p < 0.05$; Two-way Anova).

Figure 2. A549 lung spheroid reduced proliferation rate is associated with a rapid cell size reduction. **a.** Cell viability after 0, 1 and 3 days in 3D. Viability was measured by flow cytometry. 2D cells treated with doxorubicin $1\mu\text{M}$ for 24 hours as a cell death control (DOX). 0 day in 3D are cells harvested directly after first centrifugation from 2D (Mean \pm SD, N=3, * $p > 0.05$, One-way ANOVA). **b.** Upper panel,

quantification of cell cycle analysis results. Statistical analysis is shown for S phase and apoptotic population (Mean \pm SD, N=3, *p> 0.05, Two-way ANOVA). Lower panel, % of dividing cells (population in S phase) (Mean \pm SD, N=3, *p> 0.05, Two-way ANOVA). **c.** Flow cytometry histogram of cell cycle analysis of cells within spheroids throughout long-term 3D culture. **d.** Flow cytometry histogram of FSC-H data of cells after 0, 1 and 3 days in 3D. 2D cells treated with doxorubicin 1 μ M for 24 hours as a cell death control (DOX). 0 day in 3D are cells harvested directly after first centrifugation from 2D (N=3). **e.** Relative quantification of mean FSC-H value for all conditions in figure c (Mean \pm SD, N=3, *p>0.05, One-way ANOVA). **f.** Gene expression analysis by qPCR of oxidation (catalase), hypoxia (HIF1 α) and cell cycle (p21) markers. RNA was harvested from cells in 2D and after 3, 10, 17, 24, 31 and 38 days in 3D. Represented as a relative quantification (RQ) to 2D control (Mean with min and max value, N=3; dotted line show threshold for significant RQ).

Figure 3. 3D culture induced expression level changes of key epigenetic regulators. **a.** Left panel, Expression analysis of KAT2A, KAT3A, KAT3B, KAT6A, KAT7 by western blot of cells in 2D and after 3, 10, 17, 24, 31 and 38 days in 3D. Right panel, Quantification of proteins expression relative to 2D control (Mean \pm SD, N=3; *p < 0.05; Two-way Anova) **b.** Left panel, Expression analysis of BRG1, LSD1, HDAC6, TUBULIN by western blot of cells in 2D and after 3, 10, 17, 24, 31 and 38 days in 3D. ACTIN was used as loading control. Right panel, Quantification of proteins expression relative to 2D control (Mean \pm SD, N=3; *p < 0.05; Two-way

Anova). **c.** Histone lysine acetylation levels analysis by western blot. **d.** Quantification of acetylation levels relative to 2D control (Mean \pm SD, N=3; *p < 0.05; Two-way Anova). **e.** Histone lysine methylation levels analysis by western blot. Total H3 or H4 was used as loading control. **f.** Quantification of methylation levels relative to 2D control (Mean \pm SD, N=3; *p < 0.05; Two-way Anova).

Figure 4. Lung spheroids do not display all gene changes mimicking EMT phenotype. **a.** Gene expression analysis by qPCR of EMT markers Snail, slug (left panel), N-cadherin and E-cadherin (right panel). RNA was harvested from cells in 2D and after 3, 10, 17, 24, 31 and 38 days in 3D. Represented as a Relative quantification to 2D control (Mean \pm SD, N=3; dotted line show threshold for significant RQ).

Figure 5. Lung spheroids are sensitive to type I PRMT inhibition **a.** Schematic representation of the screening process **b.** Distribution of cell viability after treatment (48h 10 μ M) with an epigenetic drug library. Viability was accessed by flow cytometry (N=1) **c.** Distribution of cell viability after treatment (48h 10 μ M) with 25 HDAC inhibitors. Viability was accessed by flow cytometry (N=1). **d.** Cell viability and IC₅₀ of 2D cells and 10 or 24 days old spheroid after 48h treatment with MS023 (treatment concentration ranging from 5 nM to 500 μ M).

Figure 6. A549 spheroids sensitivity to type I PRMT inhibition is type specific. **a.** Left panel, Expression analysis of PRMT1, PRMT3, PRMT4, PRMT5 and PRMT6 by

western blot. ACTIN was used as loading control. Right panel, Quantification of proteins levels expressed as a percentage relative to 2D control (Mean \pm SD, N=3; *p < 0.05; Two-way Anova). **b.** Left panel, Expression analysis of H4R3me2A, H3R2me2A, total asymmetrical (ADMA) and symmetrical (SDMA) arginine methylation levels by western blot. H3 or H4 was used as loading control. Right panel, Quantification of arginine methylation levels expressed as a percentage relative to 2D control (Mean \pm SD, N=3; *p < 0.05; Two-way Anova). **c.** Cell viability of 2D and 10 or 24 days old spheroids with different PRMT inhibitors. Each condition was treated for 48 hours with MS049 (PRMT4), SCG707 (PRMT3), TP064 (PRMT4/6) or GSK591 (PRMT5) at concentrations ranging from 100 nM to 10 μ M (Mean \pm SD, N=4; *p < 0.05; Two-way Anova).

Supplementary Figure 1. Phenotypic characterization of long-term spheroid culture. **a** and **b.** Cell viability measured by flow cytometry. **a** A549 3D spheroids were seeded at an initial density of 5, 10, 20 and 40K cells per well and viability was measured after 1 and 2 weeks without passage. (Mean \pm SD, N=2). **b** Viability of A549 spheroids after 0, 1, 2, 3, 10, 24 and 38 days in 3D. Untreated 2D cells and 2D cells treated with doxorubicin at 1 μ M for 48hrs (DOX) as controls. 0 day in 3D are cells harvested directly after first centrifugation from 2D (Mean \pm SD, N=3) **c.** Bright field images of the osteosarcoma U2OS spheroid formation directly from 2D monolayer and after first passage. Pictures were taken with the Live Cell Imaging System Incucyte TM.

Supplementary Figure 2. Epigenetic regulators expression and acetylation levels remaining unchanged in long-term spheroids

a. Left panel, expression analysis of KAT2A, KAT2B, KAT5 by western blot. Right panel, quantification of protein expression relative to 2D control (Mean \pm SD, N=3; *p < 0.05; Two-way Anova)

b. Left panel, expression analysis of HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5 by western blot. ACTIN was used as loading control. Right panel, quantification of protein expression relative to 2D control (Mean \pm SD, N=3; *p < 0.05; Two-way Anova).

c. Right panel, acetylation levels of H3K14, H3K18, H3K27, H3K56, H4K5, H4K8 and H4K12 by western blot. Total H3 or H4 was used as loading control. Left panel, quantification of acetylation levels relative to 2D control (Mean \pm SD, N=3; *p < 0.05; Two-way Anova).

2.8 Figures

Figure 1

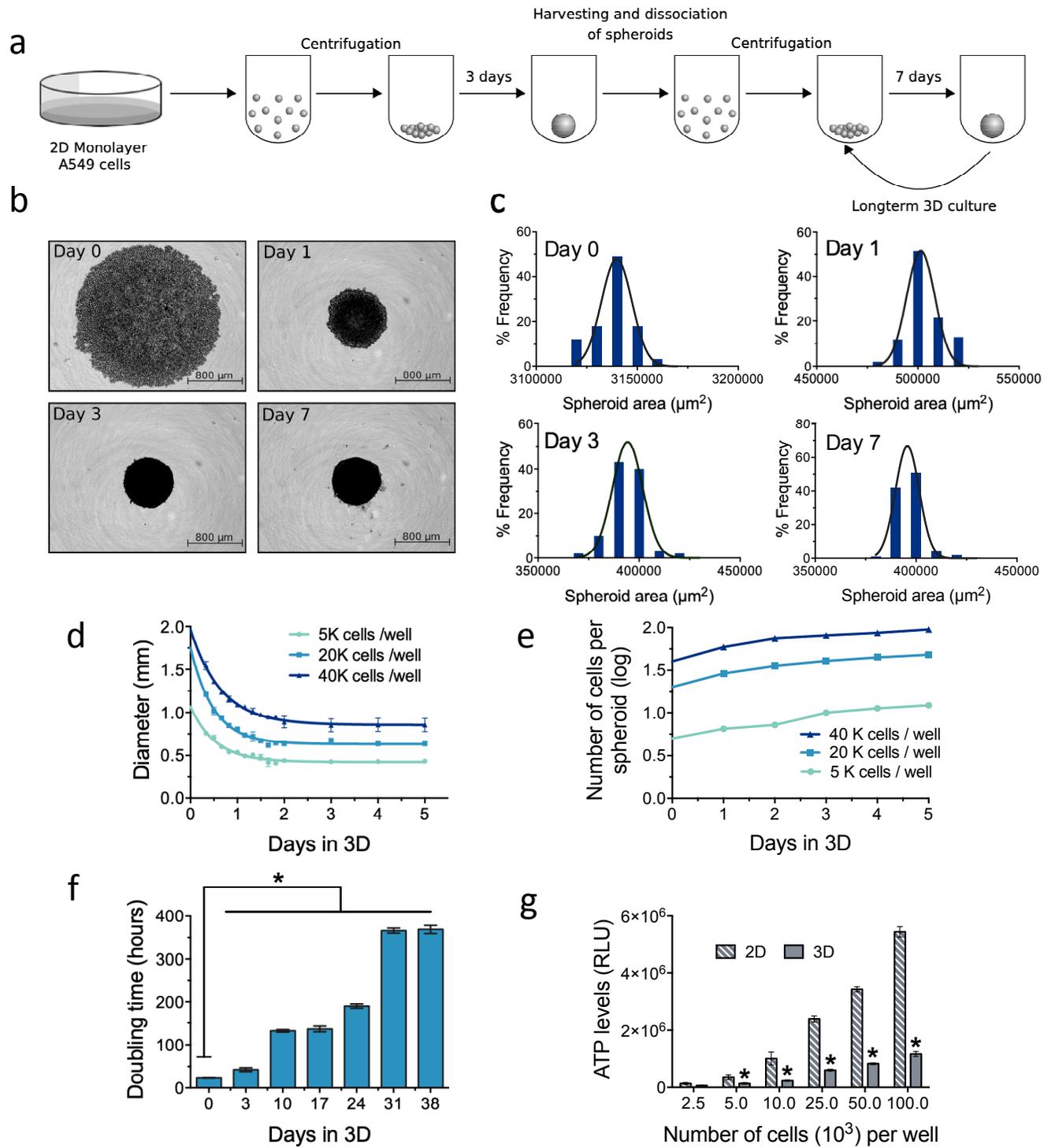


Figure 2

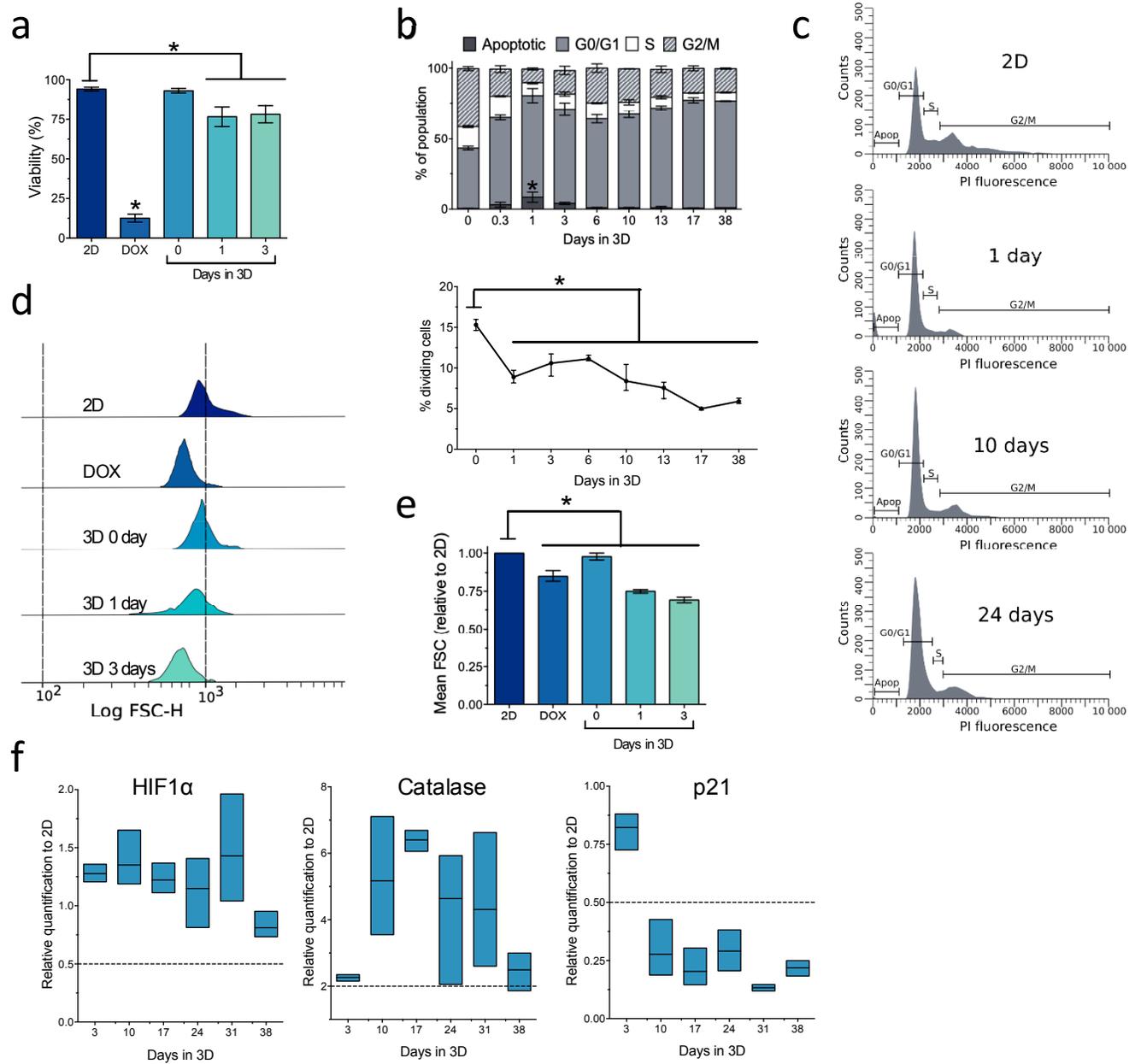


Figure 3

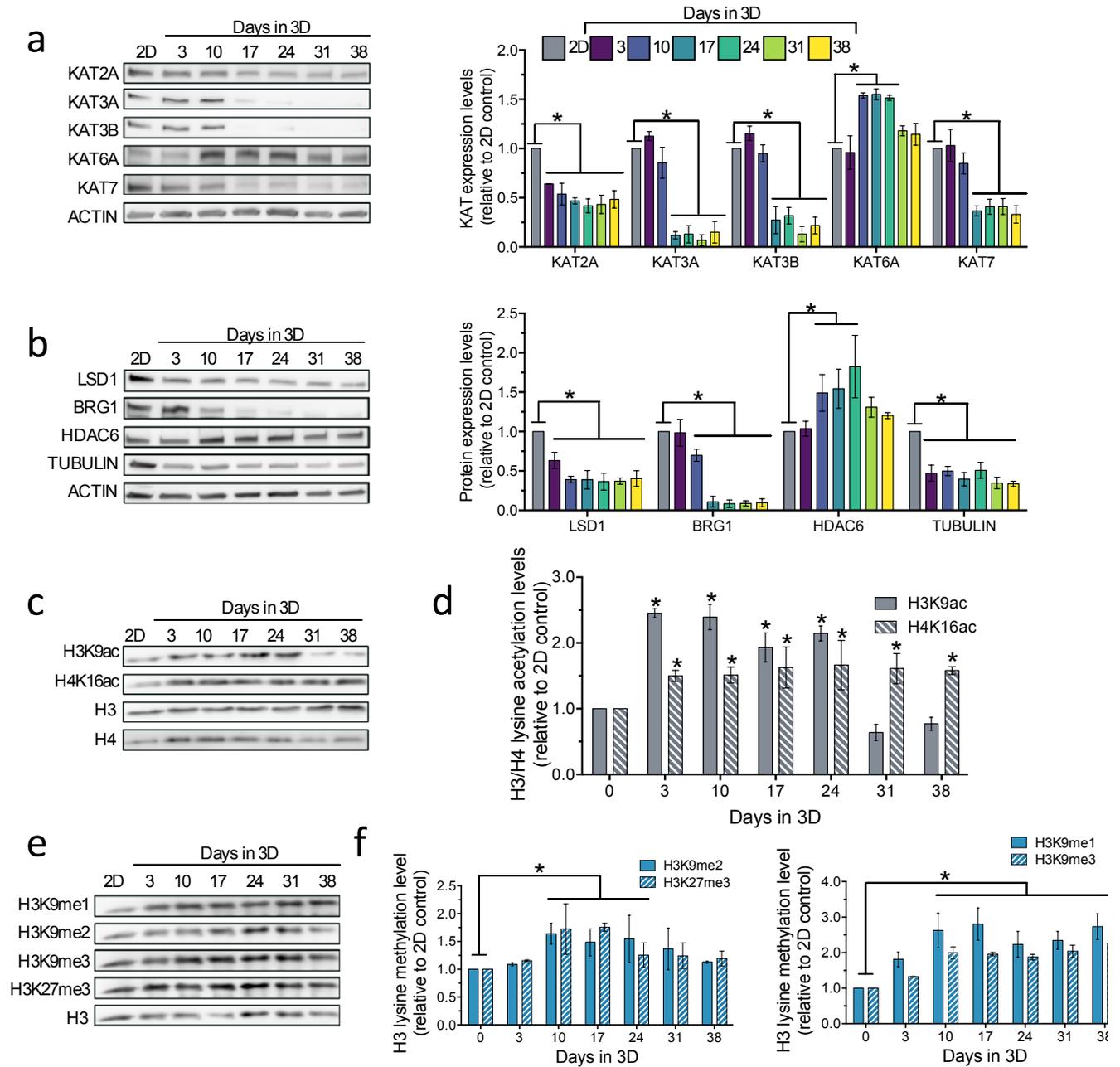


Figure 4

a

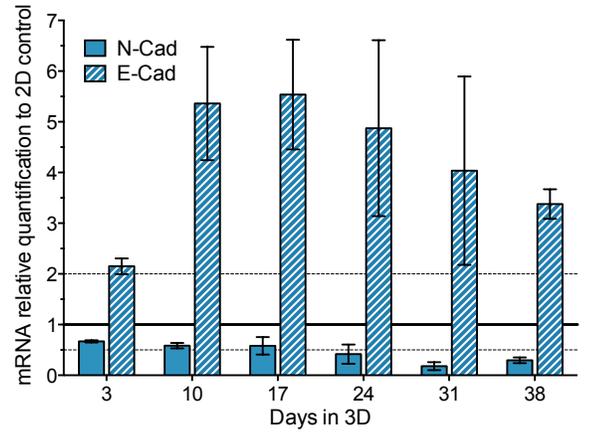
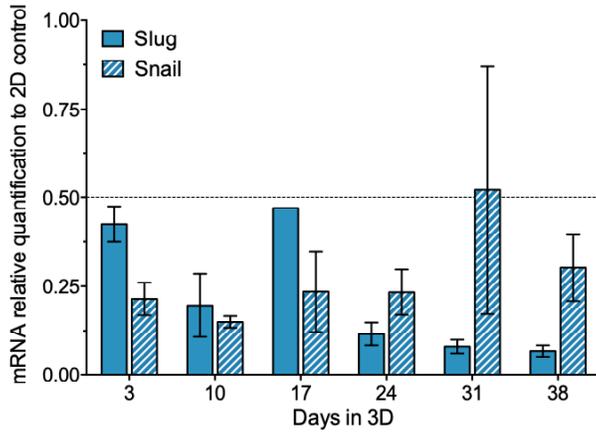


Figure 5

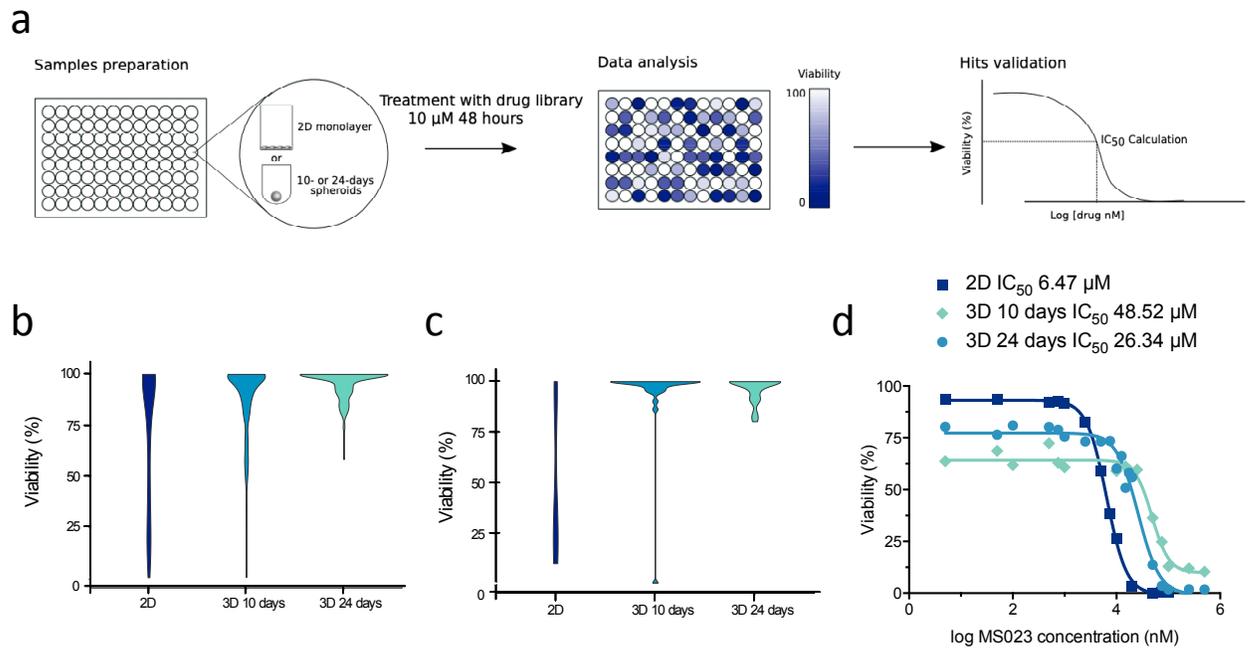
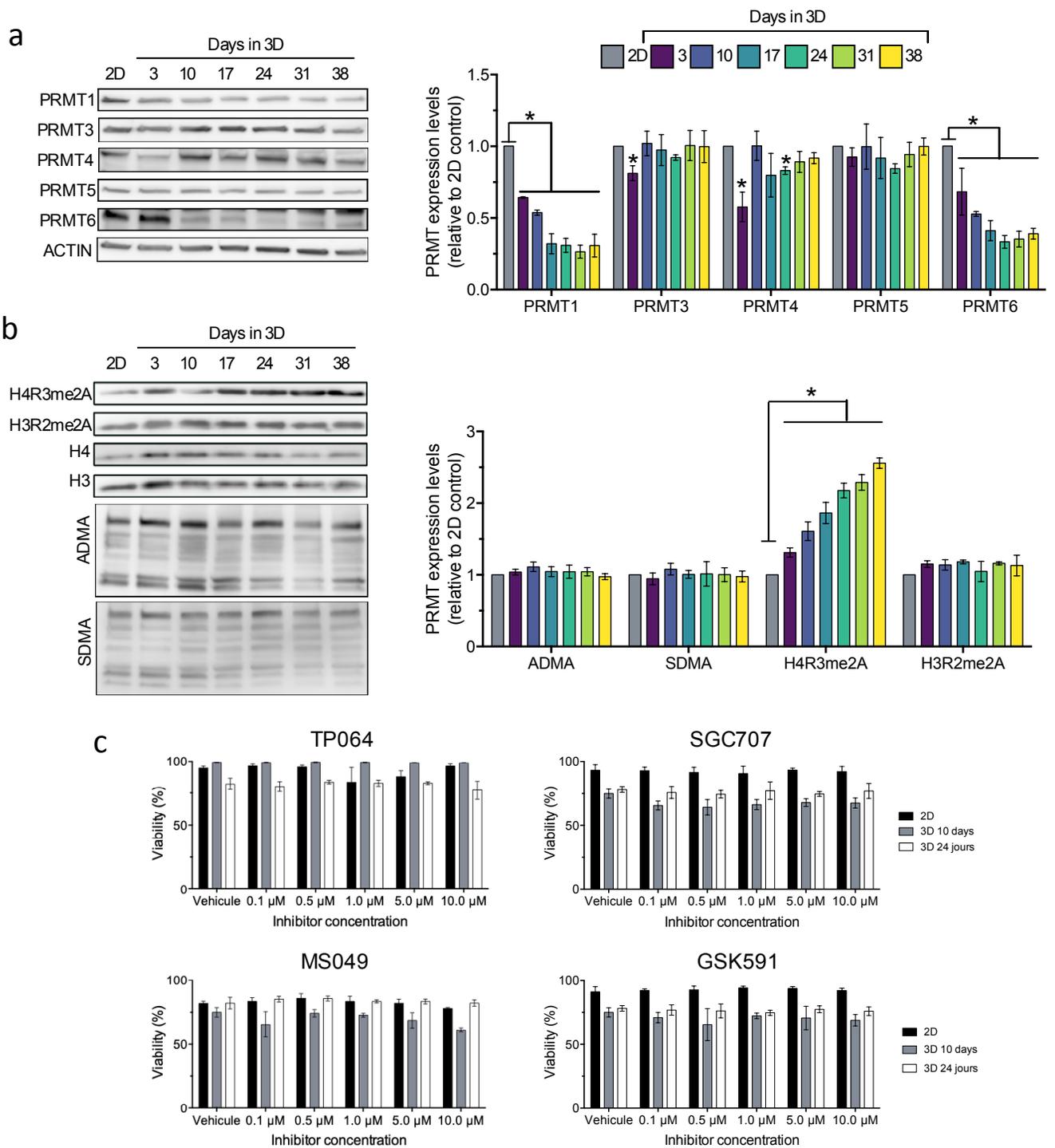
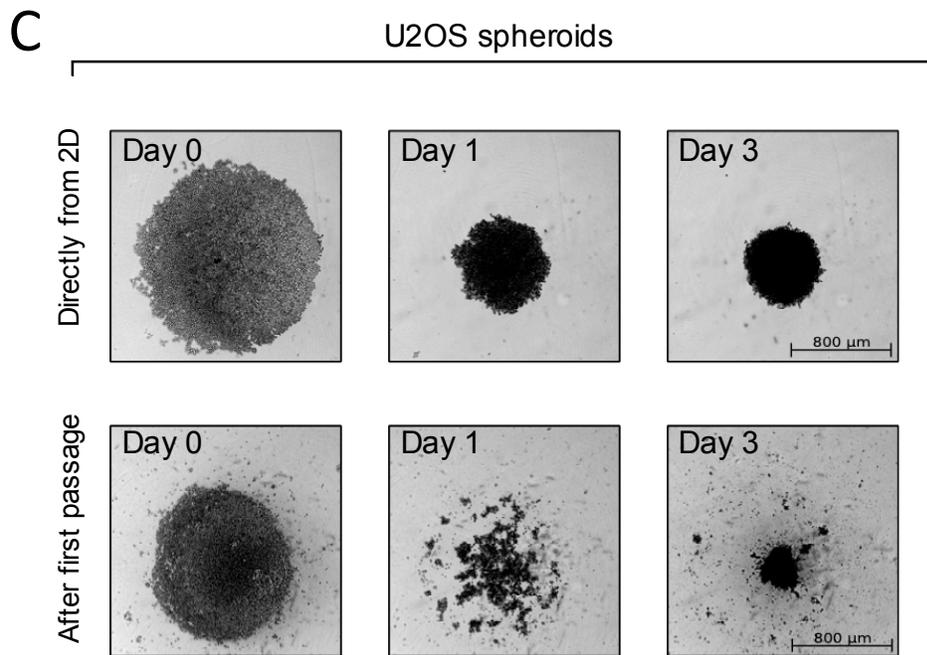
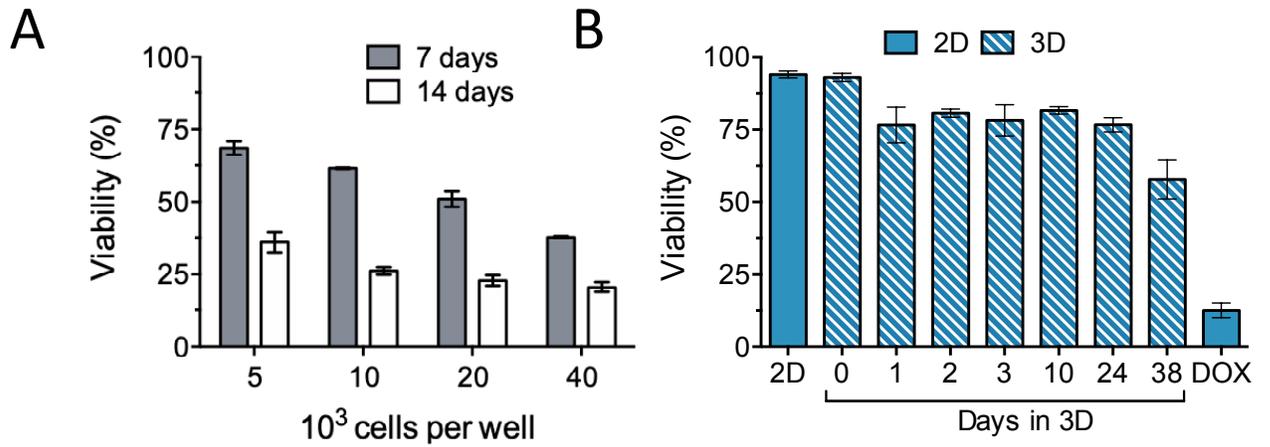


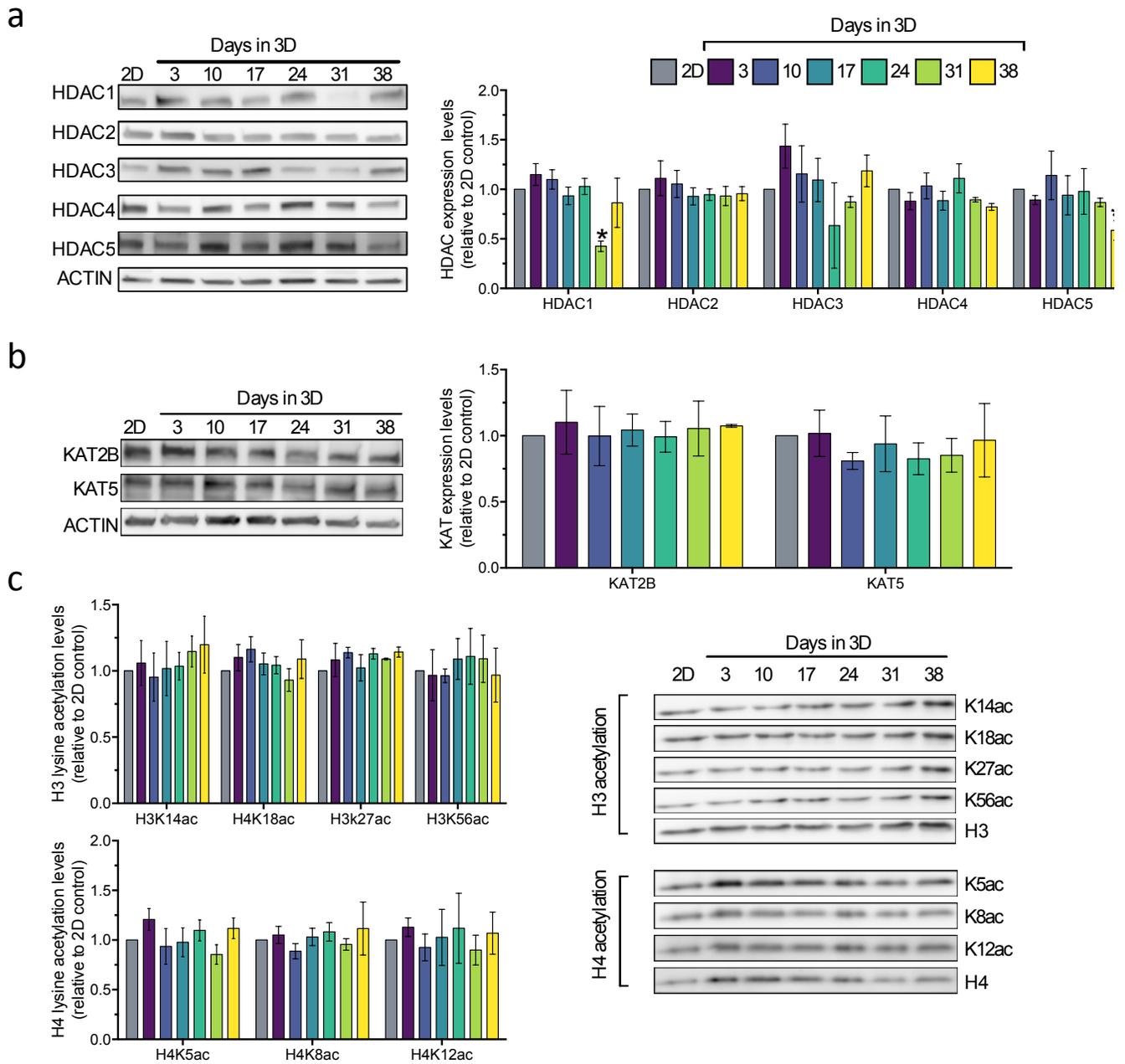
Figure 6



Suppl. Figure 1



Suppl. Figure 2



2.9 Supplementary file 1

Antibodies for western blots

The following primary antibodies were used to detect expression levels of isolated proteins:

Antibody	Dilution	Provider
KAT3A	1:1000	Cell Signaling cat#7389
KAT3B	1:2000	Active Motif cat#61402
KAT2A	1:1000	Santa Cruz cat#sc-365321
KAT2B	1:1000	Cell Signaling cat#3378
KAT5	1:2500	Abcam cat#ab137518
KAT6A	1:1000	Active Motif cat#39868
KAT7	1:1000	Bethyl Labs cat#A302-224A-T
BRG1	1:1000	Cell Signaling cat#49360
PRMT1	1:5000	Abcam cat#ab92299
PRMT3	1:1000	Thermofisher cat#730020
PRMT4	1:1000	Millipore cat#09-818
PRMT6	1:1000	LSBio cat#LS-C178302
Tubulin	1:2500	Active Motif cat#39528
HDAC1	1:2500	Cell Signaling cat#5356
HDAC2	1:1000	Cell signaling cat#5113
HDAC3	1:2000	Cell Signaling cat#3949
HDAC4	1:2500	Cell Signaling cat#7628

HDAC5	1:1000	Active Motif cat#40970
HDAC6	1:1000	Cell Signaling cat#7558
HIF1 α	1:2500	Active Motif cat# 39296
LSD1	1:1000	Active Motif cat# 61608
Actin	1:5000	Sigma-Aldrich cat#A2228

The following primary antibodies were used to detect histone post-translational modifications on H3 and H4 subunits:

Antibody	Dilution	Provider
H3K9ac	1:5000	Active Motif cat#39917
H3K14ac	1:5000	Active Motif cat#39698
H3K18ac	1:2500	Active Motif cat#39588
H3K27ac	1:5000	Active Motif cat#39134
H3K56ac	1:5000	Active Motif cat# 39282
H3ac (pan-acetyl)	1:5000	Active Motif cat#39140
H3K9me1	1:5000	Active Motif cat#39887
H3K9me2	1:5000	Active Motif cat#39753
H3K9me3	1:5000	Active Motif cat#39765
H3K27m3	1:2500	Active Motif cat#39155
H3R2me2A	1:2000	ABCAM cat#ab194706
H3	1:5000	Active Motif cat#39763
H4K5ac	1:2000	Active Motif cat#39700
H4K8ac	1:5000	Active Motif cat#39172
H4K12ac	1:5000	Active Motif cat#39928

H4K16ac	1:5000	Active Motif cat#39167
H4R3me2A	1:1000	Active Motif cat# 39006
H4	1:5000	Active Motif cat#39270

PRMT5 (1:5000), SYM11 (1:2500) and ASYM26 (1:2500) antibodies were kindly provided by Dr. Stéphane Richard Laboratory (Lady Davis Institute, McGill University, Montreal).

Chapitre 3: Discussion

3. Discussion

Ces résultats permettent de répondre à mes 3 objectifs de projet, soit le développement d'un nouveau modèle de culture cellulaire en 3D, la caractérisation phénotypique et épigénétique des changements induits par ce modèle, puis finalement l'évaluation de la réponse aux médicaments des sphéroïdes.

Premièrement, j'ai réussi à mettre en place une méthodologie de culture cellulaire en 3D qui permet le maintien à long-terme de cellules en sphéroïdes. Ce modèle est reproductible et a permis la caractérisation des changements phénotypiques des cellules au sein des sphéroïdes au fil du temps durant la culture en 3D. On observe une diminution rapide de la taille, de la viabilité, du temps de doublement des cellules et du métabolisme cellulaire en 3D. Ce modèle permet également d'évaluer les changements épigénétiques qui prennent place immédiatement et à long-terme. La caractérisation plus en profondeur de l'épigénome des sphéroïdes est essentielle à la compréhension du modèle afin d'établir un parallèle entre ce modèle in vitro et les tumeurs que l'on retrouve chez les patients. On observe une modulation de l'épigénome, tant au niveau des enzymes que des modifications post-traductionnelles des histones, qui est établie en fonction du temps de culture.

Dernièrement, nous avons comparé la réponse aux médicaments ciblant l'épigénome des cellules en 2D et en 3D, démontrant que l'effet anticancéreux en 2D de la majorité des molécules testées était partiellement ou complètement perdu lorsqu'administré à des sphéroïdes. Ce modèle a également permis l'identification du MS023, un inhibiteur de PRMT de type I, la seule molécule à avoir une efficacité de plus de 40% contre des sphéroïdes de 24 jours.

3.1 Explication de l'effet anti-cancéreux des inhibiteurs de PRMT.

Mes résultats ont mis en évidence que l'inhibition des PRMT de type I via un traitement avec le MS023 avait une activité anti-cancéreuse contre les sphéroïdes d'adénocarcinome pulmonaire. Par contre, le mécanisme par lequel les cellules sont affectées est inconnu. La sensibilité des sphéroïdes aux MS023 pourrait être expliqué par les caractéristiques inhérentes aux cellules A549 en combinaison avec les modifications qui prennent place lors de la culture en 3D.

Premièrement, bien que le MS023 est un inhibiteur des PRMT de type I, il inhibe de manière prédominante l'activité de PRMT1 avec un IC_{50} in vitro de 9 nM [152]. Dans le modèle 3D, on observe une diminution significative de l'expression de PRMT1 après 3 jours. Cependant, la réaction de méthylation catalysée par PRMT1, soit la diméthylation asymétrique sur l'arginine 3 de l'histone 4 (H4R3me2A), augmente significativement après 17 jours en 3D. Ceci pourrait être expliqué par une compensation au niveau d'expression globale de la diméthylation asymétrique, mais les niveaux globaux de diméthylation (ADMA)

restent inchangés. L'augmentation de la diméthylation est donc spécifique à H4R3me2A. L'activité du MS023 ne peut donc pas simplement être expliquée par l'augmentation d'expression d'une des cibles du médicament, plus spécifiquement PRMT1. Cependant, l'activité d'une protéine n'est pas uniquement régulée par son niveau d'expression. Les résultats par western Blot ne nous permettent pas d'exclure la possibilité de changements aux niveaux des modifications post-traductionnelles des PRMTs. Leur activité enzymatique n'ayant pas été mesurée, il serait possible que le changement au niveau de l'expression de H4R3me2 soit dû à une modification post-traductionnelle de PRMT1 [153].

Deuxièmement, les cellules A549 sont hétérozygotes pour la perte du gène MTAP (MTAP^{-/-}). Ce gène encode pour la protéine S-méthyl-5'-thioadenosine phosphorylase, impliquée dans le métabolisme de la polyamine. Une perte d'expression du gène MTAP est couramment observée dû à sa localisation proximale au gène suppresseur de tumeur CDKN2A, dont la délétion est fréquente dans les cellules cancéreuses [41, 154]. La délétion de MTAP induit une accumulation du métabolite 2-méthylthioadenosine, qui est un inhibiteur biologique de l'activité de PRMT5 [155]. Ainsi, les cellules MTAP^{-/-} reposent sur l'activité de PRMT1 pour le maintien de la méthylation des arginines, et donc sont plus sensible à des inhibiteurs des PRMT de type I [154].

À la lumière de ces résultats, nous pourrions donc stipuler que la sensibilité des sphéroïdes d'adénocarcinome à l'inhibition des PRMT de type I provient d'une part de leur état MTAP^{-/-}, qui les prédisposent à une sensibilité aux inhibiteurs de PRMT de type I, et à la diminution d'expression de PRMT1 induit par la culture 3D. Conjointement, ces 2 phénotypes ont le potentiel de sensibiliser les cellules aux inhibiteurs des PRMT. Il a également été démontré que la perte d'expression de PRMT1, que l'on retrouve dans notre modèle, sensibilise les cellules du cancer du poumons MTAP^{-/-} à une inhibition pharmacologique de PRMT5 [154, 155]. Ceci apporte donc une justification pour l'essai d'une combinaison des inhibiteurs de type de PRMT1 et PRMT5 pour le traitement des cancers du poumons MTAP^{-/-}.

3.2 Caractérisation globale du profil épigénétique des sphéroïdes.

Les changements épigénétiques induits par la culture 3D ont été évalués par western blot et ont donc permis de caractériser le niveau d'expression de groupes d'enzymes clés et de certaines modifications post-traductionnelles. Or, une caractérisation globale des changements est impérative à la compréhension de la biologie des sphéroïdes et permettrait également une meilleure corrélation entre le nouveau modèle in vitro et l'état physiopathologique des tumeurs chez les patients.

Un des objectifs importants de la culture en 3D est de développer des modèles avec lesquels l'on retrouve des caractéristiques de patients, ce qui manque aux

modèles 2D. Comme tous types de cancer, le cancer du poumon comprend plusieurs sous-types biologiquement distincts [156, 157]. Les différentes modifications de l'épigénome et du transcriptome ont brièvement été abordées dans la section 1.2.3 de l'introduction. Ces altérations ont un impact direct sur la réponse aux traitements et le pronostic des patients. Par exemple, un profil de méthylation de l'ADN CIMP-positif est utilisé comme biomarqueur chez les patients atteints de cancer du poumon et est associé à un mauvais pronostic [158, 159]. De plus, des altérations d'oncogènes comme ALK, KRAS et la surexpression d'EGFR définissent le sous-type des adénocarcinomes et ont une implication directe avec les thérapies utilisées pour ce type de patients [157].

Une compréhension exhaustive de la biologie des sphéroïdes permettrait non seulement d'identifier dès les essais précliniques des molécules efficaces mais également d'identifier spécifiquement la catégorie de patients qui pourra en bénéficier. Pour ce faire, une étude globale du profil épigénétique comprenant la transcription du génome complet (RNA-seq), des niveaux de méthylation globale de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des histones (CHiP-seq) est nécessaire.

La caractérisation du modèle par CHiP-seq est essentielle puisque la méthode avec laquelle nous avons mesuré les modifications post-traductionnelles des histones, le western blot, ne permet que d'observer des changements semi-quantitatifs exclusivement au niveau de l'expression des protéines. Bien que cette

méthode soit rapide et peu coûteuse, elle nous permet seulement d'évaluer le changement global de l'expression des protéines. Le western blot n'apporte aucune donnée relative à la position des modifications sur le génome entier. Le CHIP-seq permet non seulement de comparer si une marque post-traductionnelle est augmentée ou diminuée par rapport aux conditions contrôle, mais cette méthode permet également d'établir précisément les endroits où la marque est présente [160]. Par exemple, les niveaux d'H3K27ac peuvent être inchangés lorsqu'évalués par western blot, mais la localisation sur le génome complètement différente par rapport au contrôle. Cette nuance n'est aucunement capturée par le western blot, et est cruciale dans la caractérisation du modèle.

Avec ces informations, nous pourrions facilement identifier à quel type d'échantillons de patients nos sphéroïdes seraient les plus similaires. Ceci permettra également de confirmer les modifications d'expression des protéines observées par western blot, comme la diminution d'expression de KAT3A, KAT3B et BRG1 puis l'augmentation d'expression d'HDAC6. Le CHIP-seq permettra non seulement de confirmer les changements observés au niveau des modifications post-traductionnelles des histones, mais également de mettre en lumière les changements au niveau de la localisation génomique des marques post-traductionnelles.

3.3 Réponse aux médicaments non-épigénétiques

L'évaluation de la réponse aux médicaments a exclusivement été réalisée avec des molécules ciblant les processus épigénétiques. Une des problématiques lors de traitements des patients atteints de cancer du poumon est l'apparition de la résistance à la chimiothérapie [103, 161]. Ainsi, il sera très pertinent de tester la réponse aux agents cytotoxiques utilisé en clinique, comme le paclitaxel, afin d'évaluer si les sphéroïdes y sont sensibles. Ceci permettra non seulement de mieux catégoriser notre modèle en fonction d'un type de patient spécifique mais également de préciser comment ce modèle pourrait être utilisé en études précliniques.

3.4 Analyse de la structure et de la composition des sphéroïdes par microscopie

L'entièreté des analyses de caractérisation ont été effectuées après la récolte et l'homogénéisation des sphéroïdes à une condition donnée. Cette méthodologie est pratique et permet l'obtention d'une quantité de matériel biologique suffisante à plusieurs analyses. Cependant, elle ne nous permet pas de conclure sur la structure interne des sphéroïdes. Puisque nos sphéroïdes sont composés de plus de 20 000 cellules, il est fort probable que l'organisation tridimensionnelle des cellules au sein du sphéroïde influence la biologie de chacune des cellules.

Par exemple, les cellules en périphérie du sphéroïde auraient accès à une plus grande quantité d'oxygène et de nutriments, ce qui pourrait influencer la vitesse de réplication, leur métabolisme et la survie générale comparativement aux cellules au centre du sphéroïde [137, 162]. Ainsi, la diminution globale de 25% de viabilité après 3 jours en 3D pourrait en fait être exclusivement due à la nécrose des cellules situées au centre du sphéroïde. Il va de même pour le calcul du temps de doublement de la population; les cellules en périphérie prolifèrent peut-être beaucoup plus rapidement que les autres.

Pour pallier le manque d'information, une initiative est de conserver les sphéroïdes dans leur structure 3D et de faire des marques d'immunohistochimie sur les coupes obtenues. L'analyse par Ki67, un marqueur de prolifération, permettrait d'identifier spécifiquement les régions du sphéroïde qui sont en division active[163]. De plus, des marqueurs de nécrose (7-AAD, TUNEL, LDH) et d'hypoxie (HIF1a, PDK1, GLUT1) sauraient nous informer sur l'apport en oxygène et la viabilité des cellules dans leur structure originale [164-169]. Finalement, nous avons observé plusieurs changements au niveau des enzymes épigénétiques et des marques post-traductionnelles des histones. Une analyse par immunohistochimie pourrait non seulement confirmer ces modifications mais nous indiquer plus spécifiquement quelle sous-population au sein du sphéroïde est atteinte par ces changements.

3.5 Analyse de l'état TEM des sphéroïdes

Dans l'analyse de notre modèle, nous avons observé plusieurs marqueurs protéiques qui ont été associés par d'autres groupes de recherche avec l'agressivité et l'invasion des CPNCP dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Plus précisément, l'inactivation de BRG1 promeut l'invasion et la progression des cellules CPNCP [134, 170] et la surexpression de HDAC6 est associée avec l'agressivité des plusieurs types de cancer [171]. Par contre, les résultats de qPCR ont montré une diminution des marqueurs de TEM (N-cadhérine, slug, snail) concomitante avec une augmentation du marqueur épithélial E-cadhérine.

Une explication possible de cette dichotomie est que les cellules, lorsqu'en sphéroïde *in vitro*, présentent un phénotype différent que lorsqu'*in vivo*. Effectivement, des études ont démontré que certaines cellules, lorsqu'en condition de culture non-adhérente *in vitro*, c'est à dire sans attachement avec une matrice extracellulaire, augmentent significativement leur expression de E-cadhérine afin de survivre et d'optimiser leur adhésion cellule-cellule. Cette augmentation d'E-cadhérine induit donc également la diminution d'expression de N-cadhérine, puisque celles-ci sont dépendantes [172-174]. Cependant, ces mêmes cellules, lorsqu'en xénogreffe chez des souris présentent un phénotype contraire à celui *in vitro*, avec une augmentation des marqueurs de TEM (N-cadhérine, slug, snail) et une diminution du marqueur épithélial E-cadhérine [173].

Ceci illustre l'influence majeure que les conditions de culture ont sur la biologie des cellules cancéreuses.

À la lumière de ces résultats, nous ne pouvons donc pas conclure si notre modèle est composé de cellules plus agressives et invasives. Il serait très intéressant de faire des expériences d'invasion et de migration et/ou d'évaluer leur comportement sous forme de xénogreffe et si le temps de culture en 3D influence également leur comportement dans un organisme.

3.6 Analyse de la composition en cellules souches cancéreuses des sphéroïdes.

La résistance à l'apoptose induite par le détachement de la matrice extracellulaire, ou l'anoïkose, est une des caractéristiques clés des cellules souches cancéreuses (CSC) [175, 176]. Puisque notre modèle utilise un véhicule à très faible attachement sans ajout de matrice extracellulaire, nous pourrions en déduire que les cellules qui s'adaptent à la culture et réussissent à survivre dans ce modèle affichent un phénotype d'anoïkose. Cette transition a été répertoriée chez des cellules d'adénocarcinome du poumon lorsqu'ensemencé dans le même type de plaque [173]. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer si notre modèle favorise la transition des cellules vers des cellules souches cancéreuses. Ceci est facilement

effectué par FACS à l'aide de marqueur des CSC, comme CD133, ALDH et CD44 [177-179].

Si notre modèle est effectivement composé d'une population plus importante de cellules souches cancéreuses, nous pourrions vérifier si la sensibilité aux inhibiteurs de PRMT de Type I est spécifique à ce type de cellules.

3.7 Amélioration du modèle 3D

Ajout d'une composante de co-culture au modèle.

Une composante importante, comme soulignée dans la section 1.3.1 de l'introduction, est le microenvironnement des tumeurs. Celui-ci inclut l'interaction des cellules tumorales avec la matrice extracellulaire, les cellules saines, les fibroblastes, les cellules du système immunitaire et les vaisseaux sanguins [180].

Une amélioration possible du modèle, et une perspective du projet, est l'ajout d'une composante de co-culture en 3D afin de mieux représenter le microenvironnement. Plus précisément, nous pourrions ajouter au modèle actuel des cellules fibroblastes de poumons sain, comme la lignée HFL-1 (ATCC CC-153), afin de mieux représenter les interactions cellules-cellules entre la tumeur et l'environnement sain. Une autre composante de co-culture qui serait pertinente d'introduire dans le modèle sont les cellules endothéliales, comme les HUVEC,

qui demeure une composante importante des tumeurs *in vivo* [181-183]. Plusieurs études ont même démontré l'étendue des changements induits par la co-culture en 2D [139, 184, 185]. Par exemple, lorsque mis en co-culture, des cellules d'ostéosarcomes sécrètent des cytokines et des facteurs de croissances qui influencent les fibroblastes sains et modifient leur expression de facteurs important dans la tumorigénèse, tels $TNF\alpha$ et MMP-1[186]. Plus précisément, les fibroblastes sains voient leur niveau de $TNF\alpha$ et de MMP-1 augmenter significativement suite à la co-culture. Les fibroblastes sains, suite à leur contact avec les cellules cancéreuses, sont donc reprogrammés et contribuent à l'agressivité et l'invasion de la tumeur [186]. Un autre groupe de recherche a démontré que des cellules d'ostéosarcomes ont une capacité de migration différente suite à l'exposition au même type de cellule saine. Finalement, la lignée cellulaire SJS-1 a démontré une augmentation drastique du marqueur de métastase ALP (alkaline phosphatase) suite à une exposition à la lignée HULEC-5a (cellules du poumons) [185].

Basée sur ces résultats en 2D, on peut supposer que l'introduction de ces différentes composantes induira probablement plusieurs modifications, tant au niveau phénotypique qu'épigénétique, puisque l'interaction entre les différents types de cellules enclencherait potentiellement des cascades de signalisation différentes qu'en condition de monoculture. Il serait également intéressant d'évaluer si l'ajout d'un microenvironnement modifie la réponse aux médicaments des sphéroïdes.

Dérivation d'autres lignées cellulaires en 3D.

À ce jour, seule la lignée des adénocarcinomes A549 a été dérivée et amplement caractérisée en 3D. Par contre, puisque la méthodologie du modèle est hautement reproductible, il est logique de vouloir dériver d'autres types de lignées cancéreuses en 3D. Bien que la méthodologie reste la même, une caractérisation complète des changements phénotypiques et épigénétiques de chacune des lignées dérivées reste essentielle. Sachant que, pour les cellules utilisées en 2D, les différentes lignées cellulaires sont sensibles à la méthode de culture (milieu utilisé, fréquence des passages, cycle de congélation) et que ces conditions peuvent notamment influencer le profil d'expression des cellules, nous pouvons supposer que l'adaptation à la culture 3D est probablement spécifique à chaque lignée cellulaire également [141, 147, 187].

Conclusion et perspectives

Conclusion et retour sur les objectifs

Bien que les modèles 3D connaissent un grand succès dans le domaine de la recherche sur le cancer, il existe présentement un manque flagrant de caractérisation des changements épigénétiques qui se produisent dans ces conditions de culture. De plus, les cellules cancéreuses sont souvent dans le véhicule de culture en 3D pendant un très court moment, ce qui limite l'interprétation des résultats puisque, comme nous l'avons démontré, les cellules sont encore en phase d'adaptation.

Le premier objectif était de développer un nouvel outil de criblage en 3D dans le but d'être plus représentatif des tumeurs solides. Pour ce faire, nous avons mis sur pied une méthode de culture qui permet de garder des cellules d'adénocarcinomes du poumon jusqu'à 38 jours en culture 3D. Nous avons démontré que le modèle 3D, contrairement aux cellules en 2D, récapitule des marques épigénétiques spécifiques associées avec les cancers du poumon de stades avancés, comme par exemple l'augmentation des niveaux de H3K27me3, la diminution d'expression de SMARCA4 et l'augmentation d'expression de HDAC6 [118, 143, 144, 147]. Cependant, les résultats actuels ne permettent pas

d'affirmer avec certitude que notre modèle est plus représentatif des tumeurs solides observées chez les patients. Une plus ample caractérisation est nécessaire afin d'établir ce parallèle, et est abordée plus en profondeur dans la section 3.2 et dans les perspectives futures.

Le deuxième objectif était de caractériser les changements phénotypiques et épigénétiques qui prennent place au sein des sphéroïdes. Les cellules au sein des sphéroïdes maintiennent une viabilité d'environ 75%, accompagnée par une diminution de leur métabolisme par rapport aux cellules cultivées en 2D. Nous avons réussi à démontrer que la culture 3D à long-terme était nécessaire afin de voir apparaître plusieurs changements au niveau morphologique et épigénétique. Effectivement, les cellules perdent 30% de leurs tailles très rapidement, soit dès le premier jour en 3D. Au contraire, le cycle cellulaire est ralenti lors du passage en 3D et pour atteindre un plateau seulement après 1 semaine de culture. De plus, la modulation du profil d'expression épigénétique a lieu sur plusieurs semaines.

Finalement, le troisième et dernier objectif de recherche était de valider si la réponse aux médicaments des sphéroïdes diffère des modèles 2D et, si possible, identifier de nouveaux agents épigénétiques efficaces contre ce type de cancer. Nous avons réussi à démontrer que le profil de réponse aux médicaments ciblant l'épigénétique est très différent pour les cellules en 2D que les sphéroïdes. Notamment, les sphéroïdes sont plus résistants aux inhibiteurs d'HDAC que les cellules d'adénocarcinomes en 2D, un profil de résistance qui est similaire à celui

que l'on retrouve chez les patients en phases cliniques traités avec ce groupe de médicament. Nous avons également observé que le MS023, un inhibiteur de PRMT de type I, est un des seuls médicaments sur les 158 testés qui maintient une efficacité contre les sphéroïdes. Le mécanisme d'action du MS023 contre les sphéroïdes d'adénocarcinomes reste cependant encore à élucider.

Perspectives futures

La suite du projet repose sur la caractérisation systématique des modifications au niveau du transcriptome, du profil de modifications post-transcriptionnelles et de la méthylation de l'ADN. Plus précisément, nous pourrions évaluer si le profil d'expression des sphéroïdes évolue dans le temps et s'il est similaire aux profils de tumeurs de patients en comparant nos résultats avec ceux disponibles dans la littérature (GEO, Gene Expression Atlas, ENCODE). Comme mentionné dans mon introduction, les mutations des oncogènes KRAS et ALK ainsi que les niveaux d'expression d'EGFR permettent en clinique de distinguer entre les différents types d'adénocarcinomes [120]. Le profil de méthylation d'ADN pourrait aider à déterminer si notre modèle se rapproche effectivement des cancers du poumons avancés, puisque les niveaux de méthylation d'ADN sont corrélés avec la progression du cancer du poumon [120]. Ceci permettrait d'évaluer si nos sphéroïdes se rapprochent d'un type de patients en particulier notamment au niveau de la progression du cancer, et de la résistance aux différentes classes de médicaments. Avec une analyse bio-informatique complète, il serait possible de positionner notre modèle en fonction des différents profils de patients et ainsi cibler plus facilement les traitements dès les phases de recherche précliniques.

Au niveau de la sensibilité du modèle aux inhibiteurs des PRMTs de type I, la prochaine étape est de confirmer si les sphéroïdes sont effectivement sensibles à l'inhibition spécifique de PRMT 1. Pour ce faire, il existe présentement quelques inhibiteurs de PRMT1 disponibles sur le marché, dont AMI-1, C7280948, allantodapsone et GSK3368715 [188, 189]. Pour les essais *in vivo*, le GSK3368715 est à mon avis le plus prometteur puisque son action anticancéreuse et d'inhibition spécifique de PRMT1 a été démontré *in vitro* ainsi que dans des xenogreffes [155, 190]. Un essai de viabilité avec ces 4 inhibiteurs pourrait confirmer si les sphéroïdes sont effectivement sensibles à l'inhibition spécifique de PRMT1. Il serait également pertinent de faire des analyses par CHIP-seq et RNA-seq avec des sphéroïdes traités au MS023. Ceci nous permettrait d'évaluer quelles voies de signalisation sont activées par le traitement, s'il change le profil d'expression des cellules et de proposer des pistes pour la compréhension exhaustive des mécanismes sous-jacents à la sensibilité des sphéroïdes aux inhibiteurs de PRMTs de type I.

Pour ce qui est du modèle en soi, il permet actuellement d'évaluer la différence entre un support de culture en 2D vs 3D, mais n'apporte pas d'éléments du microenvironnement retrouvé chez les patients. Il serait intéressant d'ajouter des composantes du microenvironnement, comme des fibroblastes sains (HFL-1), des cellules du système immunitaire (NK, cytokines) et un réseau vasculaire (HUVECs). D'autre part, il serait pertinent d'observer la structure des sphéroïdes par immunohistochimie. Ceci permettrait d'évaluer les changements

épigénétiques au niveau unicellulaire en fonction de leur position au sein du sphéroïde. Plus précisément, j'évaluerais par immunohistochimie si l'augmentation de SMARC4, un marqueur associé à l'invasion chez les adénocarcinomes, est localisé en périphérie de la structure des sphéroïdes. Nous pourrions également vérifier si les sphéroïdes possèdent un centre nécrotique par marquage au LDH avec des cellules en hypoxie en vérifiant les niveaux d'expression d'HIF1 α . Finalement, ce modèle pourrait facilement être adapté à d'autres types de lignées cellulaires cancéreuses afin d'évaluer si la transition en 3D est lignée-spécifique ou si les changements que l'on observe peuvent être généralisés à l'utilisation de culture en 3D.

Références

1. Furdas, S.D., et al., *Small molecule inhibitors of histone acetyltransferases as epigenetic tools and drug candidates*. Arch Pharm (Weinheim), 2012. **345**(1): p. 7-21.
2. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
3. Jones, P.A., J.P. Issa, and S. Baylin, *Targeting the cancer epigenome for therapy*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(10): p. 630-41.
4. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
5. Jones, P.A. and D. Takai, *The role of DNA methylation in mammalian epigenetics*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1068-70.
6. Eden, S., et al., *An upstream repressor element plays a role in Igf2 imprinting*. EMBO J, 2001. **20**(13): p. 3518-25.
7. Constancia, M., et al., *Deletion of a silencer element in Igf2 results in loss of imprinting independent of H19*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 203-6.
8. Hark, A.T., et al., *CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 486-9.
9. Chen, T. and E. Li, *Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases*. Curr Top Dev Biol, 2004. **60**: p. 55-89.
10. Hervouet, E., et al., *Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma*. Clin Epigenetics, 2018. **10**: p. 17.
11. Gowher, H. and A. Jeltsch, *Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites*. J Mol Biol, 2001. **309**(5): p. 1201-8.
12. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 219-20.
13. Chen, Z.X. and A.D. Riggs, *DNA methylation and demethylation in mammals*. J Biol Chem, 2011. **286**(21): p. 18347-53.
14. Gowher, H., et al., *Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13341-8.
15. Iida, T., et al., *PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA*. Genes Cells, 2002. **7**(10): p. 997-1007.
16. Bostick, M., et al., *UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1760-4.
17. Esteve, P.O., et al., *Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication*. Genes Dev, 2006. **20**(22): p. 3089-103.
18. Kim, J.K., et al., *UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(2): p. 493-505.

19. Zhu, H., et al., *Lsh is involved in de novo methylation of DNA*. EMBO J, 2006. **25**(2): p. 335-45.
20. Fuks, F., et al., *The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(9): p. 2305-12.
21. Yin, X. and Y. Xu, *Structure and Function of TET Enzymes*. Adv Exp Med Biol, 2016. **945**: p. 275-302.
22. Rasmussen, K.D. and K. Helin, *Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer*. Genes Dev, 2016. **30**(7): p. 733-50.
23. Kuo, M.H. and C.D. Allis, *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. Bioessays, 1998. **20**(8): p. 615-26.
24. Wapenaar, H. and F.J. Dekker, *Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes*. Clin Epigenetics, 2016. **8**: p. 59.
25. Di Cerbo, V. and R. Schneider, *Cancers with wrong HATs: the impact of acetylation*. Brief Funct Genomics, 2013. **12**(3): p. 231-43.
26. Dokmanovic, M., C. Clarke, and P.A. Marks, *Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(10): p. 981-9.
27. Lagger, G., et al., *Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression*. EMBO J, 2002. **21**(11): p. 2672-81.
28. Dang, W., *The controversial world of sirtuins*. Drug Discov Today Technol, 2014. **12**: p. e9-e17.
29. Guarente, L., *Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex*. Nat Genet, 1999. **23**(3): p. 281-5.
30. Sawan, C. and Z. Herceg, *Histone modifications and cancer*. Adv Genet, 2010. **70**: p. 57-85.
31. Rice, J.C. and C.D. Allis, *Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(3): p. 263-73.
32. Branscombe, T.L., et al., *PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 32971-6.
33. Weiss, V.H., et al., *The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(12): p. 1165-71.
34. Zhang, X., L. Zhou, and X. Cheng, *Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3*. EMBO J, 2000. **19**(14): p. 3509-19.
35. Hyun, K., et al., *Writing, erasing and reading histone lysine methylations*. Exp Mol Med, 2017. **49**(4): p. e324.
36. Wood, A. and A. Shilatifard, *Posttranslational modifications of histones by methylation*. Adv Protein Chem, 2004. **67**: p. 201-22.
37. Anand, R. and R. Marmorstein, *Structure and mechanism of lysine-specific demethylase enzymes*. J Biol Chem, 2007. **282**(49): p. 35425-9.
38. Kampranis, S.C. and P.N. Tschlis, *Histone demethylases and cancer*. Adv Cancer Res, 2009. **102**: p. 103-69.
39. Klose, R.J. and Y. Zhang, *Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(4): p. 307-18.
40. Bedford, M.T. and S. Richard, *Arginine methylation an emerging regulator of protein function*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 263-72.
41. Blanc, R.S. and S. Richard, *Arginine Methylation: The Coming of Age*. Mol Cell, 2017. **65**(1): p. 8-24.

42. Litt, M., Y. Qiu, and S. Huang, *Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation*. Biosci Rep, 2009. **29**(2): p. 131-41.
43. Chang, B., et al., *JMJD6 is a histone arginine demethylase*. Science, 2007. **318**(5849): p. 444-7.
44. Webby, C.J., et al., *Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing*. Science, 2009. **325**(5936): p. 90-3.
45. Li, S., et al., *JMJD1B Demethylates H4R3me2s and H3K9me2 to Facilitate Gene Expression for Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*. Cell Rep, 2018. **23**(2): p. 389-403.
46. Zhang, J., et al., *Regulation of histone arginine methylation/demethylation by methylase and demethylase (Review)*. Mol Med Rep, 2019. **19**(5): p. 3963-3971.
47. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
48. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 27-36.
49. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
50. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
51. Riggs, A.D. and P.A. Jones, *5-methylcytosine, gene regulation, and cancer*. Adv Cancer Res, 1983. **40**: p. 1-30.
52. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. **301**(5895): p. 89-92.
53. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
54. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
55. Halkidou, K., et al., *Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer*. Prostate, 2004. **59**(2): p. 177-89.
56. Song, J., et al., *Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer*. APMIS, 2005. **113**(4): p. 264-8.
57. Ryan, Q.C., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors or lymphoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(17): p. 3912-22.
58. Batty, N., G.G. Malouf, and J.P. Issa, *Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents*. Cancer Lett, 2009. **280**(2): p. 192-200.
59. Vansteenkiste, J., et al., *Early phase II trial of oral vorinostat in relapsed or refractory breast, colorectal, or non-small cell lung cancer*. Invest New Drugs, 2008. **26**(5): p. 483-8.
60. Schrupp, D.S., et al., *Clinical and molecular responses in lung cancer patients receiving Romidepsin*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(1): p. 188-98.
61. Reid, T., et al., *Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pivaloyloxymethyl butyrate (Pivanex, AN-9) in advanced non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2004. **45**(3): p. 381-6.
62. Ramalingam, S.S., et al., *Carboplatin and Paclitaxel in combination with either vorinostat or placebo for first-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 56-62.

63. Traynor, A.M., et al., *Vorinostat (NSC# 701852) in patients with relapsed non-small cell lung cancer: a Wisconsin Oncology Network phase II study*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(4): p. 522-6.
64. Eckschlager, T., et al., *Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
65. Zhang, Q., et al., *Histone Deacetylases (HDACs) Guided Novel Therapies for T-cell lymphomas*. Int J Med Sci, 2019. **16**(3): p. 424-442.
66. Li, Y. and E. Seto, *HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(10).
67. Yang, X.J., *The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): p. 959-76.
68. Nguyen, C.T., et al., *Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6456-61.
69. Valk-Lingbeek, M.E., S.W. Bruggeman, and M. van Lohuizen, *Stem cells and cancer; the polycomb connection*. Cell, 2004. **118**(4): p. 409-18.
70. Bhadury, J., et al., *BET and HDAC inhibitors induce similar genes and biological effects and synergize to kill in Myc-induced murine lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(26): p. E2721-30.
71. Yang, X., et al., *Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer*. Cancer Cell, 2014. **26**(4): p. 577-90.
72. Sorm, F. and J. Vesely, *Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice*. Neoplasma, 1968. **15**(4): p. 339-43.
73. Sorm, F., et al., *5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic*. Experientia, 1964. **20**(4): p. 202-3.
74. Li, L.H., et al., *Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia*. Cancer Res, 1970. **30**(11): p. 2760-9.
75. Li, L.H., et al., *Phase specificity of 5-azacytidine against mammalian cells in tissue culture*. Cancer Res, 1970. **30**(11): p. 2770-5.
76. Da Costa, E.M., et al., *DNA Methylation-Targeted Drugs*. Cancer J, 2017. **23**(5): p. 270-276.
77. Richon, V.M., et al., *A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3003-7.
78. Filippakopoulos, P., et al., *Selective inhibition of BET bromodomains*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1067-73.
79. Loven, J., et al., *Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers*. Cell, 2013. **153**(2): p. 320-34.
80. Morin, R.D., et al., *Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin*. Nat Genet, 2010. **42**(2): p. 181-5.
81. Daigle, S.R., et al., *Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor*. Cancer Cell, 2011. **20**(1): p. 53-65.
82. DeVita, V.T., *Vincent T. DeVita on His New Book, "The Death of Cancer," and the Current State of Cancer Care*. Oncology (Williston Park), 2016. **30**(3): p. 210.
83. Gore, S.D., et al., *Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms*. Cancer Res, 2006. **66**(12): p. 6361-9.

84. Zhu, W.G. and G.A. Otterson, *The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells*. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2003. **3**(3): p. 187-99.
85. Chai, G., et al., *HDAC inhibitors act with 5-aza-2'-deoxycytidine to inhibit cell proliferation by suppressing removal of incorporated abases in lung cancer cells*. *PLoS One*, 2008. **3**(6): p. e2445.
86. Luszczyk, W., et al., *Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression*. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(8): p. 2309-21.
87. Zhu, W.G., et al., *DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors*. *Cancer Res*, 2001. **61**(4): p. 1327-33.
88. Tan, P., et al., *Dual epigenetic targeting with panobinostat and azacitidine in acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome*. *Blood Cancer J*, 2014. **4**: p. e170.
89. Kirschbaum, M., et al., *A phase 1 clinical trial of vorinostat in combination with decitabine in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome*. *Br J Haematol*, 2014. **167**(2): p. 185-93.
90. Sharma, S.V., et al., *A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations*. *Cell*, 2010. **141**(1): p. 69-80.
91. Schwartzmann, G., et al., *A phase I trial of cisplatin plus decitabine, a new DNA-hypomethylating agent, in patients with advanced solid tumors and a follow-up early phase II evaluation in patients with inoperable non-small cell lung cancer*. *Invest New Drugs*, 2000. **18**(1): p. 83-91.
92. Benson, E.A., et al., *Carboplatin with Decitabine Therapy, in Recurrent Platinum Resistant Ovarian Cancer, Alters Circulating miRNAs Concentrations: A Pilot Study*. *PLoS One*, 2015. **10**(10): p. e0141279.
93. Fang, F., et al., *A phase 1 and pharmacodynamic study of decitabine in combination with carboplatin in patients with recurrent, platinum-resistant, epithelial ovarian cancer*. *Cancer*, 2010. **116**(17): p. 4043-53.
94. Fang, F., et al., *The novel, small-molecule DNA methylation inhibitor SGI-110 as an ovarian cancer chemosensitizer*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(24): p. 6504-16.
95. Fang, F., et al., *Decitabine reactivated pathways in platinum resistant ovarian cancer*. *Oncotarget*, 2014. **5**(11): p. 3579-89.
96. Matej, D.E. and K.P. Nephew, *Epigenetic therapies for chemoresensitization of epithelial ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2010. **116**(2): p. 195-201.
97. O'Donnell, J.S., M.W.L. Teng, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019. **16**(3): p. 151-167.
98. Drake, C.G., E. Jaffee, and D.M. Pardoll, *Mechanisms of immune evasion by tumors*. *Adv Immunol*, 2006. **90**: p. 51-81.
99. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
100. Wrangle, J., et al., *Alterations of immune response of Non-Small Cell Lung Cancer with Azacytidine*. *Oncotarget*, 2013. **4**(11): p. 2067-79.
101. Herbst, R.S., J.V. Heymach, and S.M. Lippman, *Lung cancer*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(13): p. 1367-80.

102. Hoffman, P.C., A.M. Mauer, and E.E. Vokes, *Lung cancer*. *Lancet*, 2000. **355**(9202): p. 479-85.
103. Molina, J.R., et al., *Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship*. *Mayo Clin Proc*, 2008. **83**(5): p. 584-94.
104. Mehta, A., et al., *Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy*. *Cancer Metastasis Rev*, 2015. **34**(2): p. 229-41.
105. Sugimura, H. and P. Yang, *Long-term survivorship in lung cancer: a review*. *Chest*, 2006. **129**(4): p. 1088-97.
106. Maconachie, R., et al., *Lung cancer: diagnosis and management: summary of updated NICE guidance*. *BMJ*, 2019. **364**: p. l1049.
107. Wang, S., et al., *Current Diagnosis and Management of Small-Cell Lung Cancer*. *Mayo Clin Proc*, 2019. **94**(8): p. 1599-1622.
108. Socinski, M.A., et al., *Treatment of stage IV non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. *Chest*, 2013. **143**(5 Suppl): p. e341S-e368S.
109. Posther, K.E. and D.H. Harpole, Jr., *The surgical management of lung cancer*. *Cancer Invest*, 2006. **24**(1): p. 56-67.
110. Wistuba, II, et al., *Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(7): p. 2604-10.
111. Kozower, B.D., et al., *Special treatment issues in non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. *Chest*, 2013. **143**(5 Suppl): p. e369S-e399S.
112. Ramnath, N., et al., *Treatment of stage III non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. *Chest*, 2013. **143**(5 Suppl): p. e314S-e340S.
113. Jett, J.R., et al., *Treatment of small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. *Chest*, 2013. **143**(5 Suppl): p. e400S-e419S.
114. Sequist, L.V., et al., *Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(27): p. 3327-34.
115. Kwak, E.L., et al., *Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(18): p. 1693-703.
116. Liu, T., et al., *First-line immune checkpoint inhibitors for advanced non-small cell lung cancer with wild-type epidermal growth factor receptor (EGFR) or anaplastic lymphoma kinase (ALK): a systematic review and network meta-analysis*. *J Thorac Dis*, 2019. **11**(7): p. 2899-2912.
117. Capizzi, E., et al., *Clinical significance of ROS1 5' deletions in non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2019. **135**: p. 88-91.
118. Skoulidis, F. and J.V. Heymach, *Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2019. **19**(9): p. 495-509.
119. Simoff, M.J., et al., *Symptom management in patients with lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. *Chest*, 2013. **143**(5 Suppl): p. e455S-e497S.
120. Duruisseaux, M. and M. Esteller, *Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications*. *Semin Cancer Biol*, 2018. **51**: p. 116-128.

121. Belinsky, S.A., *Silencing of genes by promoter hypermethylation: key event in rodent and human lung cancer*. Carcinogenesis, 2005. **26**(9): p. 1481-7.
122. Tsou, J.A., et al., *Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma*. Mol Cancer, 2007. **6**: p. 70.
123. Licchesi, J.D., et al., *Promoter hypermethylation of hallmark cancer genes in atypical adenomatous hyperplasia of the lung*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(9): p. 2570-8.
124. Selamat, S.A., et al., *DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21443.
125. Lukas, J., et al., *Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16*. Nature, 1995. **375**(6531): p. 503-6.
126. Belinsky, S.A., *Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 707-17.
127. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma*. Nature, 2014. **511**(7511): p. 543-50.
128. Van Den Broeck, A., et al., *Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(22): p. 7237-45.
129. Simo-Riudalbas, L. and M. Esteller, *Targeting the histone orthography of cancer: drugs for writers, erasers and readers*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(11): p. 2716-32.
130. Behrens, C., et al., *EZH2 protein expression associates with the early pathogenesis, tumor progression, and prognosis of non-small cell lung carcinoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(23): p. 6556-65.
131. Breuer, R.H., et al., *Increased expression of the EZH2 polycomb group gene in BMI-1-positive neoplastic cells during bronchial carcinogenesis*. Neoplasia, 2004. **6**(6): p. 736-43.
132. Rodriguez-Paredes, M., et al., *Gene amplification of the histone methyltransferase SETDB1 contributes to human lung tumorigenesis*. Oncogene, 2014. **33**(21): p. 2807-13.
133. Wagner, K.W., et al., *KDM2A promotes lung tumorigenesis by epigenetically enhancing ERK1/2 signaling*. J Clin Invest, 2013. **123**(12): p. 5231-46.
134. Orvis, T., et al., *BRG1/SMARCA4 inactivation promotes non-small cell lung cancer aggressiveness by altering chromatin organization*. Cancer Res, 2014. **74**(22): p. 6486-6498.
135. Huang, T., et al., *G9A promotes tumor cell growth and invasion by silencing CASP1 in non-small-cell lung cancer cells*. Cell Death Dis, 2017. **8**(4): p. e2726.
136. Drost, J. and H. Clevers, *Organoids in cancer research*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(7): p. 407-418.
137. Vinci, M., et al., *Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation*. BMC Biol, 2012. **10**: p. 29.
138. Miki, Y., et al., *The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012. **131**(3-5): p. 68-75.
139. Liao, D., et al., *Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7965.
140. Spill, F., et al., *Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis*. Curr Opin Biotechnol, 2016. **40**: p. 41-48.

141. Kapalczynska, M., et al., *2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures*. Arch Med Sci, 2018. **14**(4): p. 910-919.
142. Wrzesinski, K., et al., *The cultural divide: exponential growth in classical 2D and metabolic equilibrium in 3D environments*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106973.
143. Ma, L., et al., *Control of nutrient stress-induced metabolic reprogramming by PKCzeta in tumorigenesis*. Cell, 2013. **152**(3): p. 599-611.
144. Minchinton, A.I. and I.F. Tannock, *Drug penetration in solid tumours*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(8): p. 583-92.
145. Brown, J.M. and A.J. Giaccia, *The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy*. Cancer Res, 1998. **58**(7): p. 1408-16.
146. Ardizzoia, A., et al., *Tumor necrosis factor in solid tumors: increased blood levels in the metastatic disease*. J Biol Regul Homeost Agents, 1992. **6**(3): p. 103-7.
147. Ben-David, U., et al., *Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response*. Nature, 2018. **560**(7718): p. 325-330.
148. Gosselin, D., et al., *An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity*. Science, 2017. **356**(6344).
149. Sachs, N., et al., *A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 373-386 e10.
150. Ham, S.L., et al., *Liquid-based three-dimensional tumor models for cancer research and drug discovery*. Exp Biol Med (Maywood), 2016. **241**(9): p. 939-54.
151. Kimlin, L.C., G. Casagrande, and V.M. Virador, *In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update*. Mol Carcinog, 2013. **52**(3): p. 167-82.
152. Eram, M.S., et al., *A Potent, Selective, and Cell-Active Inhibitor of Human Type I Protein Arginine Methyltransferases*. ACS Chem Biol, 2016. **11**(3): p. 772-781.
153. Duan, G. and D. Walther, *The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks*. PLoS Comput Biol, 2015. **11**(2): p. e1004049.
154. Gao, G., et al., *PRMT1 loss sensitizes cells to PRMT5 inhibition*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(10): p. 5038-5048.
155. Fedoriw, A., et al., *Anti-tumor Activity of the Type I PRMT Inhibitor, GSK3368715, Synergizes with PRMT5 Inhibition through MTAP Loss*. Cancer Cell, 2019. **36**(1): p. 100-114 e25.
156. Scheffler, M., et al., *K-ras Mutation Subtypes in NSCLC and Associated Co-occurring Mutations in Other Oncogenic Pathways*. J Thorac Oncol, 2019. **14**(4): p. 606-616.
157. Pikor, L.A., et al., *Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications*. Lung Cancer, 2013. **82**(2): p. 179-89.
158. Shinjo, K., et al., *Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma*. Carcinogenesis, 2012. **33**(7): p. 1277-85.
159. Liu, Z., et al., *CpG island methylator phenotype involving tumor suppressor genes located on chromosome 3p in non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2008. **62**(1): p. 15-22.
160. Park, P.J., *ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(10): p. 669-80.
161. Pfister, D.G., et al., *American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003*. J Clin Oncol, 2004. **22**(2): p. 330-53.

162. Laurent, J., et al., *Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 73.
163. Sun, X. and P.D. Kaufman, *Ki-67: more than a proliferation marker*. Chromosoma, 2018. **127**(2): p. 175-186.
164. Chan, F.K., K. Moriwaki, and M.J. De Rosa, *Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity*. Methods Mol Biol, 2013. **979**: p. 65-70.
165. de Torres, C., et al., *Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain*. Neurosci Lett, 1997. **230**(1): p. 1-4.
166. Zimmermann, M. and N. Meyer, *Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes*. Methods Mol Biol, 2011. **740**: p. 57-63.
167. Chen, C., et al., *Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 9519-25.
168. Kim, J.W., et al., *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 177-85.
169. Majmundar, A.J., W.J. Wong, and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 294-309.
170. Glaros, S., et al., *Targeted knockout of BRG1 potentiates lung cancer development*. Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3689-96.
171. Li, T., et al., *Histone deacetylase 6 in cancer*. J Hematol Oncol, 2018. **11**(1): p. 111.
172. Lin, R.Z., et al., *Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin*. Cell Tissue Res, 2006. **324**(3): p. 411-22.
173. Powan, P., et al., *Detachment-induced E-cadherin expression promotes 3D tumor spheroid formation but inhibits tumor formation and metastasis of lung cancer cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2017. **313**(5): p. C556-C566.
174. Stadler, M., et al., *Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 1151.
175. Hardavella, G., R. George, and T. Sethi, *Lung cancer stem cells-characteristics, phenotype*. Transl Lung Cancer Res, 2016. **5**(3): p. 272-9.
176. Shukla, S., et al., *Lung Cancer Stem Cells: An Epigenetic Perspective*. Curr Cancer Drug Targets, 2018. **18**(1): p. 16-31.
177. Li, Z., *CD133: a stem cell biomarker and beyond*. Exp Hematol Oncol, 2013. **2**(1): p. 17.
178. Moreb, J.S., *Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells*. Curr Stem Cell Res Ther, 2008. **3**(4): p. 237-46.
179. Wang, L., et al., *The Role of CD44 and Cancer Stem Cells*. Methods Mol Biol, 2018. **1692**: p. 31-42.
180. Altorki, N.K., et al., *The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(1): p. 9-31.
181. Braekeveldt, N., et al., *Neuroblastoma patient-derived orthotopic xenografts reflect the microenvironmental hallmarks of aggressive patient tumours*. Cancer Lett, 2016. **375**(2): p. 384-389.
182. Lamichhane, S.P., et al., *Recapitulating epithelial tumor microenvironment in vitro using three dimensional tri-culture of human epithelial, endothelial, and mesenchymal cells*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 581.
183. Shoval, H., et al., *Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10428.

184. Ostman, A. and M. Augsten, *Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players*. *Curr Opin Genet Dev*, 2009. **19**(1): p. 67-73.
185. Yu, S., et al., *Lung cells support osteosarcoma cell migration and survival*. *BMC Cancer*, 2017. **17**(1): p. 78.
186. Salvatore, V., et al., *Changes in the gene expression of co-cultured human fibroblast cells and osteosarcoma cells: the role of microenvironment*. *Oncotarget*, 2015. **6**(30): p. 28988-98.
187. Luca, A.C., et al., *Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e59689.
188. Bissinger, E.M., et al., *Acyl derivatives of p-aminosulfonamides and dapsone as new inhibitors of the arginine methyltransferase hPRMT1*. *Bioorg Med Chem*, 2011. **19**(12): p. 3717-31.
189. Heinke, R., et al., *Virtual screening and biological characterization of novel histone arginine methyltransferase PRMT1 inhibitors*. *ChemMedChem*, 2009. **4**(1): p. 69-77.
190. Srour, N., S.Y. Mersaoui, and S. Richard, *M-TAP Dance: Targeting PRMT1 and PRMT5 Family Members to Push Cancer Cells Over the Edge*. *Cancer Cell*, 2019. **36**(1): p. 3-5.