



HAL
open science

Chondrosarcome : mécanismes de résistance aux traitements conventionnels et thérapies innovantes

Eva Lhuissier

► **To cite this version:**

Eva Lhuissier. Chondrosarcome : mécanismes de résistance aux traitements conventionnels et thérapies innovantes. Biochimie, Biologie Moléculaire. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMC407 . tel-02299931

HAL Id: tel-02299931

<https://theses.hal.science/tel-02299931>

Submitted on 29 Sep 2019

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

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



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Chondrosarcome : Mécanismes de résistance aux traitements conventionnels et thérapies innovantes

Présentée et soutenue par

Eva LHUISSIER

Thèse soutenue publiquement le 28 Septembre 2017

devant le jury composé de

Mme Dominique MODROWSKI	CR INSERM, HDR, Université Paris Diderot	Rapporteur
M Franck VERRECCHIA	DR INSERM, Université de Nantes	Rapporteur
M Mohamed OUZZINE	DR INSERM, Université de Lorraine	Examineur
Mme Valentine BOUET	MCU, HDR, Université de Caen Normandie	Examineur
M Karim BOUMEDIENE	PU, Université de Caen Normandie	Codirecteur de thèse
Mme Catherine BAUGE	MCU, HDR, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Catherine BAUGE et Karim BOUMEDIENE, EA7451 BioConnect



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Karim Boumediene pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Je te remercie pour ta confiance, tes conseils et ton aide dans le seul but de me faire progresser.

Je remercie également le Dr Catherine Baugé pour avoir accepté de diriger ce travail. Tu as toujours été disponible pour moi, ta passion pour la recherche et ton exigence m'ont permis de me dépasser et d'aller toujours plus loin. Je t'en remercie.

Je tiens à remercier le Dr Dominique Modrowski et le Dr Franck Verrecchia de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je remercie le Dr Valentine Bouet et le Dr Mohamed Ouzzine pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie le Dr Sylvain Leclercq (Chirurgie Orthopédique, Clinique Saint-Martin, Caen) pour m'avoir permis d'obtenir des prélèvements de chondrocytes, le service d'Anatomie Pathologique du CHU de Caen et le Dr Goulven Rochcongar (Service Orthopédie du CHU de Caen), pour les prélèvements de chondrosarcomes primaires. Je remercie aussi le Dr Llombart-Bosch (Valence, Espagne) et le Dr Block (Chicago, USA) pour le don respectif des lignées cellulaires de chondrosarcome CH2879, JJ012 et FS090.

Je tiens à remercier Vincent Beaudoin et Anne-Marie Frelin pour leur aide sur l'irradiateur X Cegelec (Equipex REC-HADRON).

Je remercie le Dr Haelewyn et Charlotte Marie du Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB), ainsi que le Dr Valentine Bouet, le Pr Thomas Fréret, Gerald Née et Stacy Lagillière du laboratoire GMPc, COMETE pour leur aide pour les expériences sur les souris.

Je remercie le Dr Laurent Coulbault pour son aide lors du dosage du platine par spectrophotométrie d'absorption atomique de flamme. Et le Dr Stéphane Allouche pour m'avoir conseillée dans mon choix de reprendre des études de médecine.

Je tiens à remercier le Dr Yohann Repesse pour l'analyse hématologique des prélèvements sanguins chez les souris et pour m'avoir aidé à préparer ma reprise d'étude en médecine.

Je tiens à remercier le Dr Nicolas Gruchy pour avoir gracieusement accepté que l'on utilise le scanner pour l'analyse transcriptomique.

Je remercie Marilyne Guillamin pour son aide et ses conseils pour la cytométrie en flux.

Je tiens à remercier la Région Basse-Normandie, Le Cancéropôle Nord-Ouest et la Ligue contre le cancer pour le financement de ce travail de thèse.

Je remercie également les membres du laboratoire. Tout d'abord je tiens à remercier Juliette Aury-Landas pour avoir essayé de m'initier à la génétique et à la transcriptomique. Le chemin est encore long !!! Mais également pour avoir été présente dans les bons comme dans les moins bons moments. Je remercie Quentin Bruey pour son aide technique mais également pour son amitié, pour tous ces bons moments de rigolade et pour m'avoir fait rencontrer les membres de microbiologie qui sont des gens exceptionnels. Je remercie également Marion Berthelot pour son aide, sa gentillesse et sa disponibilité. Ensuite, je voudrais remercier Martine Boittin, Céline Bazille, Lyess Allas, Nicolas Girard, Sara Bouhout, Alexis Veyssière, Nolwenn Lavagen et Quitterie Rochoux pour leur disponibilité et leurs conseils.

Je remercie également mes amis et plus particulièrement Patrick, Robin, Emmanuelle et Elodie avec qui j'ai effectué ce projet commun de thèse. Nous avons su nous soutenir et nous encourager mutuellement. Nous avons su être présents les uns pour les autres dans les bons comme dans les mauvais moments. Je n'oublie pas mes Ginettes, Laura et Miléna, pour leur encouragement, leur soutien et leur présence même si la distance nous sépare. Marie, Fred et Thomas avec qui j'ai commencé mon aventure en biologie. Et enfin Manon ma meilleure amie et son petit bout de chou Félix.

Je tiens à remercier mes parents, mon frère et mes beaux-parents pour leur soutien qu'ils m'ont apporté et pour avoir toujours cru en moi.

Je remercie tout particulièrement Xavier, celui qui partage ma vie depuis bientôt 10 ans. Je te remercie pour ton aide, ton soutien, ta gentillesse, ta patience, pour m'avoir toujours suivie dans mes choix personnels et professionnels. Je t'aime.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	- 3 -
TABLE DES MATIERES.....	- 5 -
INDEX DES FIGURES.....	- 9 -
INDEX DES TABLEAUX.....	- 11 -
ABREVIATIONS.....	- 13 -
INTRODUCTION	- 19 -
I) Le chondrosarcome.....	- 21 -
A) Généralités.....	- 21 -
1- Grade histologique des chondrosarcomes	- 21 -
2- Classification histologique des chondrosarcomes	- 22 -
a. Tumeurs bénignes	- 22 -
b. Chondrosarcomes	- 23 -
3- Altération génétique dans les chondrosarcomes.....	- 24 -
a. Changements précoces	- 24 -
b. Changements tardifs	- 26 -
4- Prise en charge des chondrosarcomes	- 28 -
a. Les chondrosarcomes de grade II et III	- 29 -
b. Les chondrosarcomes de grade I	- 29 -
B) Traitements conventionnels.....	- 30 -
1- La radiothérapie.....	- 30 -
a. Mode d'action des irradiations ionisantes	- 30 -
b. Signalisation des lésions à l'ADN.....	- 32 -
c. Réparation des lésions à l'ADN	- 33 -
2- La chimiothérapie.....	- 35 -
a. Mode d'action du cisplatine.....	- 35 -

b. Mécanisme de résistance au cisplatine	- 37 -
3- Mécanismes de résistance des chondrosarcomes aux traitements conventionnel.....	- 39 -
a. Expression de la P-glycoprotéine	- 40 -
b. Activité télomérase	- 40 -
c. Perte d'expression de la protéine p16	- 41 -
d. Expression de protéines anti-apoptotiques	- 41 -
e. Hypoxie.....	- 41 -
II) L'hypoxie	- 43 -
A) Les facteurs HIFs	- 43 -
1- Structure des facteurs HIFs	- 43 -
2- Régulation des facteurs HIFs.....	- 45 -
3- Rôle des facteurs HIFs.....	- 49 -
a. Le métabolisme : l'effet Warburg.....	- 50 -
b. La transition épithélio-mésenchymateuse	- 51 -
c. L'invasion tumorale.....	- 52 -
d. L'angiogénèse.....	- 52 -
e. Résistance aux traitements conventionnels	- 54 -
B) Ciblage thérapeutique.....	- 55 -
1- Ciblage du métabolisme hypoxique	- 55 -
2- Ciblage des facteurs HIFs.....	- 56 -
a. Composés modulant l'activité transcriptionnelle de HIF- α	- 56 -
b. Composés modulant l'expression de HIF- α	- 56 -
c. Composés affectant la stabilité protéique de HIF- α	- 58 -
3- Développement de pro-médicaments activés par l'hypoxie.....	- 58 -
4- Ciblage des voies activées par l'hypoxie.....	- 59 -
C) Rôle de l'hypoxie dans les chondrosarcomes	- 61 -

1- Etude histologique des facteurs HIFs	- 61 -
2- Ciblage thérapeutique de l'angiogenèse	- 63 -
III) Approches thérapeutiques contre les chondrosarcomes	- 66 -
A) Nouvelles options de traitement des chondrosarcomes	- 66 -
1- Inhibition des voies de survie	- 66 -
2- Inhibition de la voie de développement Hedgehog	- 67 -
3- Ciblage des voies de l'apoptose	- 67 -
B) L'épigénétique et la méthylation de H3K27	- 69 -
1- La régulation épigénétique	- 69 -
a. La modification des histones	- 69 -
b. Méthylation et déméthylation des histones	- 70 -
2- Triméthylation de l'histone H3K27 et ses régulateurs	- 72 -
a. La marque H3K27	- 72 -
b. La méthyltransférase EZH2.....	- 74 -
c. Les déméthylases JMJD3 et UTX	- 76 -
3- Ciblage thérapeutique des histone méthylases/déméthylases de H3K27	- 78 -
a. Inhibiteurs de la méthylase EZH2	- 78 -
b. Inhibiteurs des déméthylases UTX et JMJD3	- 80 -
OBJECTIFS.....	- 83 -
RESULTATS.....	- 87 -
PROJET I : IMPACT DE L'HYPOXIE SUR LA REPOSE DES CHONDROSARCOMES A LA CHIMIOOTHERAPIE ET A LA RADIOTHERAPIE.....	- 89 -
I) Effet de l'hypoxie sur la réponse des chondrosarcomes au cisplatine.....	- 93 -
II) Effet de l'hypoxie sur la résistance des chondrosarcomes aux rayons X.....	- 115 -
PROJET II : STRATEGIE THERAPEUTIQUE INNOVANTE DES CHONDROSARCOMES : EVALUATION DE NOUVELLES MOLECULES PHARMACOLOGIQUES.....	- 125-

I) Validation de l'effet du DZNep dans un modèle de culture en trois dimensions	- 129 -
II) Le DZNep induit l'apoptose dans les chondrosarcomes in vitro et in vivo par un mécanisme indépendant d'EZH2.....	- 143 -
III) Effet chronique du DZNep chez des souris immunocompétentes.....	- 179 -
IV) Le DZNep synergise l'effet apoptotique du cisplatine dans les chondrosarcomes.....	- 209 -
V) Ciblage des histone déméthylases UTX et JMJD3 dans le traitement des chondrosarcomes.....	- 231 -
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	- 255 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 271 -
ANNEXES.....	- 283 -

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Coupes histologiques de chondrosarcomes de grade I, II et III.	- 22 -
Figure 2 : Développement des tumeurs cartilagineuses bénignes et leur progression en chondrosarcomes.	- 27 -
Figure 3 : Chondrosarcome du tibia proximal. Radiographie et coupe macroscopique de la pièce opératoire.	- 28 -
Figure 4 : Dommages à l'ADN induits par les irradiations.	- 31 -
Figure 5 : Les lésions à l'ADN induisent l'activation des kinases ATM et ATR.	- 33 -
Figure 6 : Les irradiations induisent différents types de dommages à l'ADN, pouvant être réparés par différents mécanismes.	- 34 -
Figure 7 : Dommages à l'ADN induits par le cisplatine.	- 36 -
Figure 8 : Mécanisme moléculaire de résistance au cisplatine.	- 37 -
Figure 9 : Les domaines structurels des trois isoformes HIF- α et de l'isoforme HIF- β	- 44 -
Figure 10: Représentation schématique du mécanisme de régulation du facteur HIF- α	- 46 -
Figure 11 : Domaines de liaison des modulateurs des facteurs HIF- α	- 47 -
Figure 12 : Régulation temporelle de HIF-1 α , HIF-2 α et HIF en réponse à une exposition hypoxique prolongée.	- 48 -
Figure 13 : L'hypoxie comme une force motrice de la progression tumorale et de la formation de métastases.	- 49 -
Figure 14 : Interaction entre le métabolisme cellulaire et l'hypoxie intra-tumorale.	- 51 -
Figure 15 : Etapes importantes de l'angiogenèse tumorale.	- 53 -
Figure 16 : Stratégies pour cibler les cellules cancéreuses hypoxiques dans les tumeurs solides.	- 60 -
Figure 17 : Représentation d'une coupe immunohistochimique d'un chondrosarcome de grade III du tibia proximal.	- 62 -
Figure 18 : L'inhibiteur de CXCR4, AMD3100, diminue l'angiogenèse dans des xénogreffes de la lignée de chondrosarcome JJ.	- 64 -
Figure 19 : L'antagomir anti-miR-181a inhibe l'angiogenèse des chondrosarcomes in vivo.	- 65 -
Figure 20 : Organisation du nucléosome.	- 70 -
Figure 21 : Régulation transcriptionnelle de la méthylation de H3K27.	- 73 -

Figure 22 : Les histone déméthylases UTX et JMJD3 régulent l'activité transcriptionnelle.....	- 74 -
Figure 23 : EZH2 et processus tumoral.....	- 75 -
Figure 24 : Métabolisme de la S-adénosylhomocystéine (AdoHcy) et son inhibition par le 3-deazaneplanocine A (DZNep).....	- 78 -
Figure 25 : Différents modes d'inhibition de la sous-unité catalytique EZH2 du complexe PRC2.	- 80 -
Figure 26 : Le GSK-J4 présente un effet anti-tumoral in vivo.	- 81 -
Figure 27 : Evaluation de la croissance cellulaire des chondrosarcomes après irradiations aux rayons X sous hypoxie.....	- 117 -
Figure 28 : Evaluation de la survie des chondrosarcomes après irradiation aux rayons X sous hypoxie.....	- 118 -
Figure 29 : Evaluation du cycle cellulaire après irradiation aux rayons X sous hypoxie dans les lignées cellulaires de chondrosarcome JJ012 et SW1353.....	- 118 -
Figure 30 : Evaluation de l'apoptose par étude du pourcentage de cellules en Sub-G1 dans les lignées cellulaires de chondrosarcome JJ012 et SW1353 irradiées aux rayons X en hypoxie.....	- 119 -
Figure 31 : Evaluation de l'apoptose par étude du pourcentage de cellules Apo 2.7+ après irradiation aux rayons X en hypoxie dans les deux lignées cellulaires de chondrosarcome.....	- 120 -
Figure 32 : Evaluation de la sénescence après irradiation aux rayons X sous hypoxie dans les lignées cellulaires de chondrosarcome JJ012 et SW1353.....	- 121 -
Figure 33 : Modèle possible du mécanisme d'action du DZNep dans les chondrosarcomes.....	- 254 -
Figure 34 : La voie de signalisation EGFR.....	- 265 -

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I : Vue d'ensemble des caractéristiques cliniques des sous-types de chondrosarcomes.	- 24 -
Tableau II : Résumé des mécanismes impliqués dans la chimiorésistance et la radiorésistance des chondrosarcomes.....	- 39 -
Tableau III : Récapitulatif des différentes cibles contre les chondrosarcomes et des stratégies thérapeutiques au cours d'essais cliniques dans les chondrosarcomes	- 68 -
Tableau IV : Principales modifications des histones et leurs effets sur l'expression des gènes.....	- 71 -
Tableau V: Rôle des histone déméthylases UTX et JMJD3 dans les cancers.....	- 77 -
Tableau VI : Caractéristiques des lignées cellulaires de chondrosarcome.....	- 85 -
Tableau VII : Profil génétique des gènes UTX, JMJD3, IDH1, IDH2 et TP53 dans les quatre lignées de chondrosarcome par analyse des données d'exome.	- 267 -

ABBREVIATIONS

17-AAG	17-(allylamino)-17-déméthoxygeldanamycine
2-HG	2-hydroxyglutarate
2ME2	2-methoxyestradiol
3D	trois dimensions
5-FU	5-fluorouracil
Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
AdipoR	Récepteur d'adiponectine
ADN	Acide désoxyribonucléique
aHIF	Antisens Hypoxia Inducible Factor
AKT	Aputinic/Apyrimidic
ALL	Acute lymphoblastic leukemia
Arf	ADP ribosylation factor
ARN	Acide Ribonucléique
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATCC	American Type and Culture Collection
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
ATP11B	ATPase, class VI, type 11B
ATP7A	Copper-transporting ATPase 1
ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide
ATR	ATM and RAD3-related
Bax	BCL2-associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/Lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BER	Base-Excision Repair
BH3	BCL2 homology 3
bHLH	Basic helix-loop-helix
Bid	BH3 Interacting Domain Death agonist
BMP-6	Bone Morphogenetic Protein 6
CBP	CREB-binding protein
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4

CDKN2	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CMML	Chronic Myelomonocytic Leukemia
CO ₂	Dioxyde de carbone
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CSB	Cassures simple-brin
C-TAD	Domaine de transactivation C-terminal
CTR1	Copper Transporteur 1
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
D10	dose correspondant à 10% de survie
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DLBCL	Diffuse Large B-Cell Lymphoma
DMEM	Dulbecco's modification of eagle's minimum essential medium
DR	Death Receptor
Dup	duplication
DZNep	3-deazaneplanocine A
E2F	E2F transcription factor 1
EED	Embryonic Ectoderm Development
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	Agence Européenne de Médecine
ERBB2	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ERCC1	Excision repair crosscomplementing 1
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
EXT	Exostosine
EZH1	Enhancer of Zest Homolog 1
EZH2	Enhancer of Zest Homolog 2
FBOX32	F-Box protein 32
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Fer
FGF	Fibroblast Growth Factor
FIH-1	Factor Inhibiting HIF-1
FOXC1	Forkhead box transcription factor C1

GLUT	Transporteur de glucose
Gy	Gray
H	Histone
H2AX	Histone 2 AX
H3K27	Lysine 27 de l'histone H3
H3K27me3	Lysine 27 de l'histone H3 triméthylée
H3K4me3	Lysine 4 de l'histone H3 triméthylée
H3K9me2	Lysine 9 de l'histone H3 diméthylée
H3K9me3	Lysine 9 de l'histone H3 triméthylée
HDAC	Histones déacétylases
HIF	Hypoxia Inductible Factor
HIF-1 α	Hypoxia Inductible Factor 1 α
HIF-2 α	Hypoxia Inductible Factor 2 α
HK	Héxokinase
HR	Homologous Recombinaison
HRE	Hypoxia Responsive Element
Hsp	Heat-Shock Protein
htz	hétérozygote
IAP2	Inhibitor of apoptosis protein 2
IC50	Concentration inhibitrice médiane
ICORE	Interactions Cellules Organismes Environnement
IDH1	Isocitrate déshydrogénase 1
IDH2	Isocitrate déshydrogénase 2
IHH	Indian hedgehog
ING4	Inhibitor of Growth Family Member 4
IP	Iodure de Propidium
IPAS	Inhibiteur du domaine protéique
IRM	Imagerie par résonance magnétique
Jmj	Jumonji
JMJD3	Jumonji D3
K	Lysine
KDM	Lysine demethylase
KDM3A	Lysine Demethylase 3A

KDM4B	Lysine Demethylase 4B
KDM4C	Lysine Demethylase 4C
KDM6A	Lysine Demethylase 6A
KDM6B	Lysine Demethylase 6B
LDH-A	Lactate déshydrogénase A
LSD-1	Lysine (K)-Specific Demethylase 1A
MATE1	Mutidrug And Toxin Extrusion 1
MDM2	Mouse Double Minute 2
MDR1	Multidrug Resistance Protein 1
MEC	Matrice extracellulaire
miR	microARN
MLH1	mutL homolog 1
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMR	Mismatch Repair
Mre11	Meiotic recombination 11
Mre11/Rad50/NBS1	Meiotic recombination 11-RAD50-Nijmegen breakage syndrome 1
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
MSH2	mutS homolog 2
mTOR	mechanistic Target Of Rapamycin
NAFLD	sténose hépatique non-alcoolique
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
NER	Nucleotide-Excision Repair
NHEJ	Non-Homogous End Joining
N-TAD	Domaine de transactivation N-terminal
O ₂	Oxygène
ODD	Oxygen-dependent Degradation Domain
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase
pH	Potentiel hydrogène
PHD	Prolyl-hydroxylases
PHF20	PHD Finger Protein 20

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PTHrP	Parathyroid hormone related protein
pVHL	protéine Von Hippel-Lindau
RACK	Receptor Activated Protein Kinase C
RAD51	Radiation sensitive 51
RB	Rétinoblastome
RbAp48	Retinoblastoma-binding protein 48
RbBP5	Retinoblastoma-binding protein 5
RBE	Efficacité biologique relative
RGS16	regulator of G-protein signaling 16
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RTK	Récepteurs tyrosine kinase
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SAH	S-adénosyl-1-homocystéine
SAM	S-adénosylmethionine
SA-β-Gal	Senescence-associated β-galactosidase
SDF1	Stromal cell Derived Factor 1
SEM	Standard Error of the Mean
SET	Su(var)3-9 Enhancer of zeste and Trithorax
SFR	Structure Fédérative de Recherche
siRNA	small interfering Ribonucleid Acid
SIRT1	Sirtuine 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SUZ12	Suppressor of zeste 12 homolog
SVF	Serum de Veau Foetal
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF-β	Transforming growth factor β
TGF-β3	Transforming growth factor β3
TP53	Tumor protein 53
TPR	Répétition tétratricopéptidique

Trim26	Tripartite motif-containing protein 26
TWIST	Twist-related protein 1
uPA	Urokinase plasminogen activator
uPAR	urokinase receptor
UTX	Ubiquitously transcribed tetracopeptide Repeat X-linked Protein
VASH1	Vasohibin-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R1	Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 1
VEGF-R2	Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 2
WDR5	WD repeat-containing protein 5
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis E3 Ubiquitin Protein ligase
γ H2AX	phosphorylated histone 2 AX

INTRODUCTION

I) Le chondrosarcome

A) Généralités

Le chondrosarcome est une tumeur maligne osseuse produisant un cartilage hyalin différencié. Il forme un groupe hétérogène de tumeurs dont la majorité prolifère lentement et forme rarement de métastases (Jamil et al., 2010). Il est le plus fréquemment retrouvé dans les régions médullaires des os longs, du fait de l'ossification enchondrale. Bien que le chondrosarcome soit une tumeur relativement rare, il représente la deuxième tumeur osseuse la plus fréquente (20-27% de toutes les tumeurs osseuses primaires et malignes). Son incidence est de 1/200000 par an sans différence entre mâle et femelle et une moyenne d'âge comprise entre 30 et 60 ans (Dai et al., 2011).

1- Grade histologique des chondrosarcomes

Le pronostic dépend du grade histologique de la tumeur. Le chondrosarcome conventionnel est divisé en 3 grades histologiques basés sur son aspect microscopique, la taille des noyaux des cellules tumorales, le marquage nucléaire et la cellularité (Evans et al., 1977). Les tumeurs de grades I et II ont un haut niveau de survie alors que les tumeurs de grade III sont rares (Dai et al., 2011).

Les chondrosarcomes de grade I, également appelés chondrosarcomes de bas grade, sont proches du cartilage normal mais sont apparentés à une lésion bénigne de type enchondrome avec une matrice hyaline abondante et une faible cellularité (Jamil et al., 2010). Toutefois, ils présentent des cellules avec des noyaux ronds hyperchromatiques de la taille d'un lymphocyte mature et plus rarement des cellules atypiques pouvant être binucléés (Figure 1A) (Kim et al., 2011). Cependant, le diagnostic entre un enchondrome et un chondrosarcome central de grade I est difficile dû au manque de fiabilité de la radiographie conventionnelle et un aspect cytologique identique des cellules dans les deux lésions (Fletcher, 2013).

Les chondrosarcomes de grade II (ou grade intermédiaire) présentent une matrice myxoïde avec une cellularité plus abondante et des mitoses visibles au microscope. Les noyaux deviennent atypiques et hyperchromatiques et leur taille est augmentée (Figure 1B).

Les chondrosarcomes de grade III, appelés de haut grade, sont caractérisés par une très forte cellularité avec la présence de cellules indifférenciées, de cellules géantes ou encore de larges

cellules à noyaux hyperchromatiques (Figure 1C). Ils présentent des domaines de polymorphismes marqués, des changements myxoïdes et une liquéfaction de la matrice chondroïde. Enfin, des mitoses sont facilement détectables ainsi qu'une abondante nécrose.

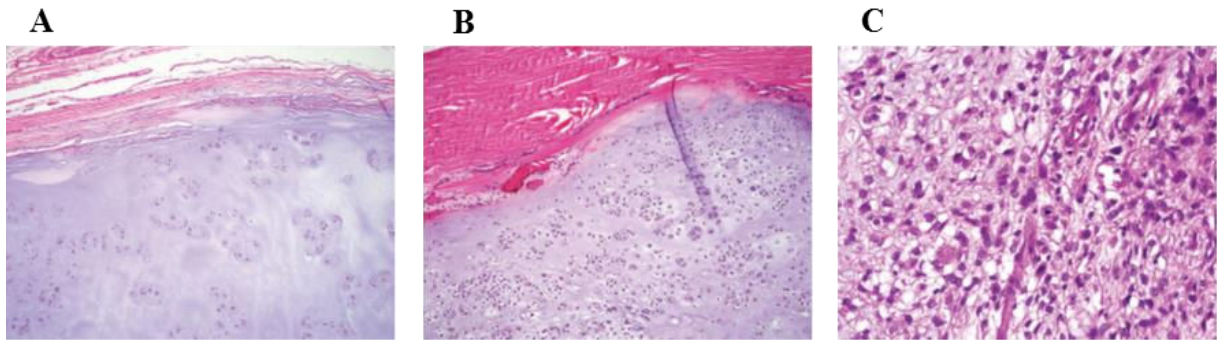


Figure 1 : Coupes histologiques de chondrosarcomes de grade I, II et III.

(A) Chondrosarcome de grade I avec une matrice chondroïde et une faible cellularité, (B) Augmentation de la cellularité dans le chondrosarcome de grade II, (C) Augmentation de cellularité et présence de cellules atypiques dans le chondrosarcome de grade III (d'après Kim et al., 2011).

2- Classification histologique des chondrosarcomes

Les os longs se forment à partir d'un modèle cartilagineux, qui est remplacé par de l'os au cours de l'ossification enchondrale. La dérégulation des voies de signalisation qui contrôlent cette ossification entraîne la formation d'enchondromes ou d'ostéochondromes pouvant être les précurseurs des chondrosarcomes centraux et périphériques (Tableau I).

a. Tumeurs bénignes

Les enchondromes se développent dans la partie métaphysaire de l'os à la suite de lésions solitaires ou multiples (connues sous le nom d'enchondromatose et responsables de la maladie d'Ollier ou du syndrome de Maffucci). Ces tumeurs bénignes empêchent la différenciation terminale des chondrocytes de la plaque de croissance (Bovée et al., 2010). Les enchondromes sont asymptomatiques et le plus fréquemment retrouvés au niveau des os des mains et des pieds. Ces tumeurs bénignes, d'une taille généralement inférieure à 5cm, ne nécessitent pas de traitement chirurgical (Fletcher, 2013).

Les ostéochondromes se manifestent par des excroissances osseuses et cartilagineuses dans la région métaphysaire des os longs, suite à des lésions solitaires ou multiples (Bovée et al., 2010). Ces lésions sont fréquentes chez les jeunes patients et leur croissance s'arrête en même temps que la fusion des plaques de croissance. De plus, le risque de transformation en chondrosarcome périphérique est de 1% (Bernard et al., 2010). Ils peuvent être responsables du syndrome d'ostéochondromes multiples (MO).

b. Chondrosarcomes

Le chondrosarcome conventionnel constitue environ 85% de l'ensemble de cette famille de tumeurs (Gelderblom et al., 2008). Selon sa localisation dans l'os, il peut être classé en chondrosarcome primaire central ou secondaire périphérique. Au moins 85% des chondrosarcomes conventionnels sont localisés au centre de la cavité médullaire, on parle alors de chondrosarcomes primaires centraux. Moins de 15% des chondrosarcomes conventionnels se développent à la surface de l'os, résultant pour la plupart du temps, d'une transformation maligne à l'intérieur de la coiffe du cartilage, d'un ostéochondrome préexistant, on parle donc de chondrosarcomes secondaires périphériques. Une très faible minorité de chondrosarcomes (moins de 1%) qui se développent à la surface de l'os, peuvent être d'origine périostale avec une histologie semblable à celle des chondrosarcomes conventionnels, on parle de chondrosarcome périostal. Enfin, les chondrosarcomes juxtacorticaux se distinguent des chondrosarcomes secondaires périphériques par un meilleur pronostic après une chirurgie locale.

Hormis les chondrosarcomes conventionnels, il existe plusieurs sous types de chondrosarcomes rares, dont l'ensemble constitue 10 à 15% des chondrosarcomes totaux (Gelderblom et al., 2008). On y retrouve le chondrosarcome dédifférencié correspondant à un sarcome non cartilagineux de haut grade (un histiocytome fibreux malin, un ostéosarcome ou un fibrosarcome) ayant un mauvais pronostic juxtaposé à une tumeur cartilagineuse bien différenciée (enchondrome, chondrosarcome de grade I et II). Le chondrosarcome mésenchymateux est retrouvé chez des patients relativement jeunes. Il résulte d'une lésion hautement maligne des os et des tissus mous et est caractérisé par un mélange de cartilage différencié et de cellules rondes indifférenciées ainsi que par la présence de chondrocytes en repos. Le chondrosarcome à cellules claires, correspondant à une tumeur maligne de faible grade, est caractérisé par la présence de cellules tumorales avec un cytoplasme clair et vide et

de chondrocytes hypertrophiques. Il est localisé préférentiellement sur l'extrémité proximale du fémur et de l'humérus. De plus, les métastases sont rares mais peuvent survenir 24 ans après le diagnostic initial.

Tableau I : Vue d'ensemble des caractéristiques cliniques des sous-types de chondrosarcomes. (adapté de Gelderblom et al., 2008).

	Chondrosarcome conventionnel primaire central	Chondrosarcome conventionnel secondaire périphérique	Chondrosarcome dédifférencié	Chondrosarcome mésenchymateux	Chondrosarcome à cellule claire
Fréquence	75%	10%	10%	<2%	<2%
Lésion précurseur	Enchondrome	Ostéochondrome	Chondrosarcome conventionnel	Aucune	Aucune
Survenue	Enchondromatoses (Maladie d'Ollier)	Ostéochondromes multiples (MOs)	Rarement MOs ou enchondromatoses	Aucune	Aucune
Age	>50 ans	>40 ans	Age médian à 59 ans	Pas d'âge (pic à 20-30 ans)	Pas d'âge (pic à 30-50 ans)
Localisation préférentielle	Pelvis, fémur, humérus et côtes	Pelvis, os de la ceinture scapulaire	Fémur et pelvis	65-86% squelettique 14-43% extraosseux	Humérus et fémur
Grade histologique	Grade I-III	Haut grade	Haut grade	Bas grade	
Survie	Grade I : 83% à 10 ans Grade II : 64% à 10 ans Grade III : 29% à 10 ans	24% à 5 ans	28% à 10 ans	89% à 10 ans	

3- Altération génétique dans les chondrosarcomes

Bien que l'origine cellulaire des différents types de chondrosarcome soit connue depuis des décennies, la base moléculaire du développement des chondrosarcomes commence tout juste à être comprise. Le modèle actuel implique des changements moléculaires précoces et tardifs (Samuel et al., 2014). Les changements précoces affectent des gènes impliqués dans la prolifération et les processus de différenciation des chondrocytes alors que les changements tardifs affectent des gènes impliqués dans le développement et la progression tumorale menant à une transformation maligne (Figure 2).

a. Changements précoces

Les gènes IDH1 et IDH2 : Ils codent l'isocitrate déshydrogénase (IDH) 1 et 2 respectivement. Ces enzymes permettent la conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate au cours du cycle de

Krebs. Les mutations hétérozygotes des gènes IDH1 et IDH2 sont fréquemment retrouvées dans les chondrosarcomes centraux, dédifférenciés, périostaux et intra-crâniens. Tarpey et al ont montré que le séquençage de l'ensemble du génome de 49 chondrosarcomes centraux a permis de mettre en évidence que 59% de ces chondrosarcomes possédaient des mutations IDH.

La voie IHH/PTHrP : Cette voie est impliquée dans la diminution de la croissance et la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Tout comme les enchondromes, les chondrosarcomes centraux expriment de façon constitutive la voie IHH (Indian hedgehog) / PTHrP (Parathyroid hormone related protein). Le niveau d'activation d'IHH reste relativement constant au cours de la progression tumorale, ce qui permettrait aux chondrocytes de rester dans un état prolifératif (Bovée et al., 2010). En effet, après séquençage d'exome, 9 des 49 chondrosarcomes testés présentent une mutation activatrice de la voie de signalisation IHH (Tarpey et al., 2013). De plus, des analyses immunohistochimiques montrent que l'augmentation du niveau d'expression de PTHrP et de son récepteur PTHR est corrélée au grade des chondrosarcomes, faisant de PTHrP un marqueur de la progression tumorale dans les chondrosarcomes (Samuel et al., 2014). Cependant, dans les chondrosarcomes périphériques de haut grade, la voie de signalisation IHH est diminuée (Bovée et al., 2010, Gelderblom et al., 2008).

EXT1 et EXT2 : Ces deux gènes sont localisés sur les chromosomes 8q24 et 11p11 respectivement et ont une forte homologie (Samuel et al., 2014). EXT1 et EXT2 sont impliqués dans la biosynthèse de l'héparane sulfate. Dans le milieu extracellulaire des plaques de croissance, l'héparane sulfate se lie à IHH, permettant ainsi de réduire la diffusion d'IHH entraînant la diminution de la prolifération des chondrocytes et l'augmentation de la différenciation hypertrophique (Bovée et al., 2010). Le séquençage d'exome de 4 chondrosarcomes périphériques a permis de mettre en évidence que 3 sur 4 présentaient des mutations hétérozygotes des gènes EXT1 et EXT2 (Tarpey et al., 2013). Ces mutations entraînent un développement anormal de l'héparane sulfate dans le cytoplasme et provoquent une accumulation d'IHH dans la matrice extracellulaire pouvant entraîner la perte de l'organisation polaire et la croissance dans le mauvais sens des chondrocytes présents dans la plaque de croissance (Bovée et al., 2010). Cependant, les gènes codant l'exostosine (EXT) ne sont pas impliqués dans la survenue des chondrosarcomes centraux (Gelderblom et al., 2008).

b. Changements tardifs

Des altérations au niveau des gènes EXT1, EXT2, IDH1 et IDH2 et de la voie IHH/PTHrP sont considérées comme des évènements précoces dans le développement des chondrosarcomes en initiant une prolifération cellulaire anormale. Cependant, elles ne suffisent pas pour produire une tumeur maligne. Il est nécessaire d'avoir des altérations dites tardives au niveau d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur en association avec d'autres voies de signalisation pour induire les lésions nécessaires à une perte totale du contrôle de la croissance cellulaire (Figure 2).

La voie p53 : Le gène TP53 code la protéine p53. Régulateur clé dans la progression du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose, il est le gène le plus communément muté dans les tumeurs. Les altérations de la voie p53 sont présentes dans 96% des chondrosarcomes, mettant l'accent sur son importance dans la progression tumorale des chondrosarcomes (Bovée et al., 2010). En effet, un haut niveau de p53 est associé au grade tumoral, à l'aneuploïdie chromosomique et à la survie des patients. Au sein des chondrosarcomes, un haut niveau de p53 est corrélé à un niveau élevé de MDM2, une protéine inhibitrice de p53, indiquant que p53 peut être fonctionnellement dérégulé dans ces tumeurs (Samuel et al., 2014).

La voie pRB : Cette voie est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. La protéine pRB (rétinoblastome) inhibe E2F, une protéine impliquée dans le contrôle de l'entrée en phase S du cycle cellulaire. pRB est lui-même inhibé par CDK4 (Cyclin Dependent Kinase 4), qui est à son tour inhibée par la protéine p16, codée par le gène CDKN2. De nombreuses altérations de la voie pRB ont été rapportées dans les chondrosarcomes, incluant la délétion et la méthylation de p16. De plus, la perte d'expression de p16 est hautement corrélée avec le grade des chondrosarcomes (Samuel et al., 2014). D'après Schrage et col, 96% des chondrosarcomes de haut grade (grades II et III) présentent une altération de la voie pRB, affectant soit p16, CDK4 ou la cycline D. Enfin, l'analyse du séquençage d'exome a permis de mettre en évidence que 33% des chondrosarcomes centraux contiennent une mutation perte de fonction sur des gènes de la voie RB (Tarpey et al., 2013).

Les anomalies chromosomiques : En raison d'altérations dans les régulateurs clés du cycle cellulaire, les tumeurs ont tendance à acquérir des mutations plus rapidement et plus intensément que les tissus normaux. Dans les chondrosarcomes, un nombre important d'anomalies chromosomiques aléatoires a été mis en évidence. En effet, des études d'hybridation génomique comparative ont révélé des gains ou des pertes de chromosomes

entiers et/ou de régions chromosomiques, avec un nombre d'anomalies par tumeur allant de 4 à 7 (Samuel et al., 2014). Les gains et les pertes de chromosomes entiers, conduisant à une aneuploïdie, observés dans les chondrosarcomes centraux et périphériques, sont différents entre ces deux types de tumeurs. Au sein des chondrosarcomes centraux, on retrouve une péridiploïdie avec un nombre de copies d'ADN relativement stable alors que dans les chondrosarcomes périphériques, le nombre de copie d'ADN est variable avec une haploïdie pour les faibles grades et une sévère hyperploïdie pour les hauts grades. Ces observations montrent que les mécanismes d'apparition d'une altération chromosomique peuvent être différents entre les chondrosarcomes centraux et périphériques.

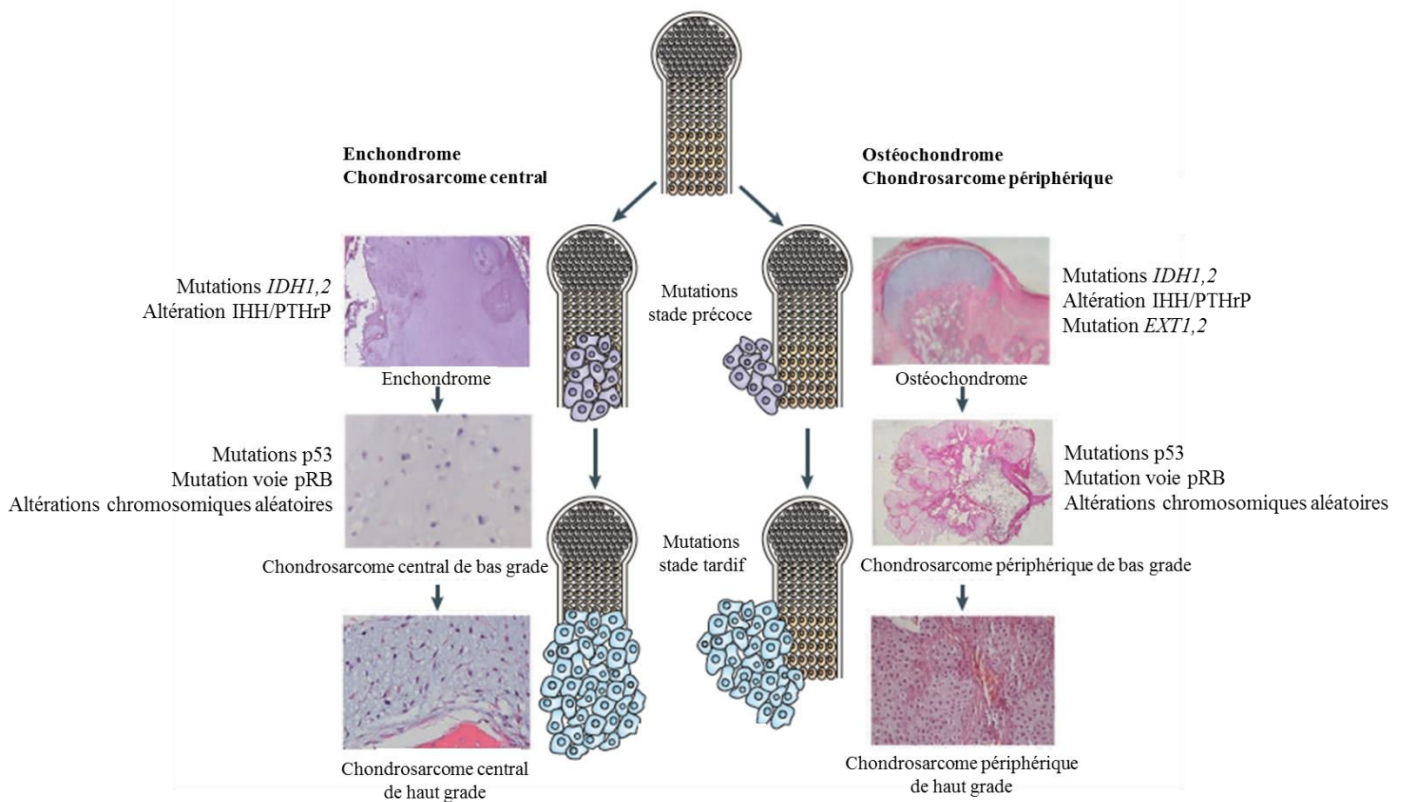


Figure 2 : Développement des tumeurs cartilagineuses bénignes et leur progression en chondrosarcomes.

Au cours du stade précoce, les mutations au sein d'*IDH1/2* et de la voie *IHH/PTHrP* sont retrouvées dans les lésions cartilagineuses bénignes et les tumeurs malignes, suggérant qu'elles ne provoquent pas directement la transformation maligne, mais affectent le comportement des chondrocytes normaux. De même, des modifications des gènes *EXT* favorisent des mutations supplémentaires dans les chondrocytes normaux. Lors du stade tardif, des mutations dans les voies *p53* et *pRB* entraîne un taux rapide de dommages mutationnels favorisant le développement d'une tumeur maligne. Les gains et les pertes aléatoires de régions chromosomiques peuvent résulter des mutations de ces gènes mais également d'autres gènes suppresseurs de tumeur ou d'oncogènes (adapté de Bovée et al., 2010 et Samuel et al., 2014).

4- Prise en charge des chondrosarcomes

La survie globale des patients atteints d'un chondrosarcome n'a pas évolué depuis des dizaines d'années. Ainsi, le taux de survie à 10 ans est respectivement de 86% et 55% pour les chondrosarcomes de grade II et III. De plus, les métastases, essentiellement pulmonaires, surviennent dans 20 à 30% des cas pour les grades II et III et sont exceptionnelles pour les grades I (Angelini et al., 2012).

Les chondrosarcomes sont des tumeurs résistantes à la chimio- et à la radio-thérapie conventionnelle. Ainsi, la résection chirurgicale reste le traitement de choix dans la majorité des cas (Dai et al., 2010, Jamil et al., 2010 et Gelderblom et al., 2008). L'ampleur de la résection chirurgicale dépend des caractéristiques clinique et histologique de la lésion. En effet, les résections au niveau des membres (Figure 3) nécessitent généralement une reconstruction par prothèse. Les résections des os pelviens sont quant à elles délabrantes. Lorsque l'atteinte des parties molles et des gros vaisseaux est trop importante, la résection chirurgicale consiste en une amputation du membre.

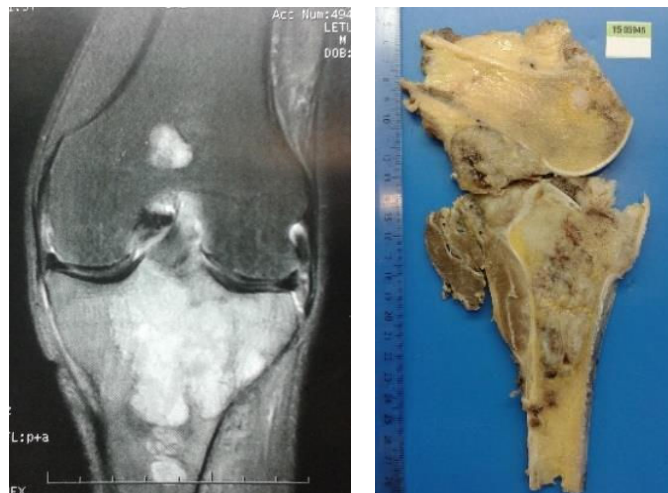


Figure 3 : Chondrosarcome du tibia proximal. Radiographie et coupe macroscopique de la pièce opératoire (CHU de Caen, Dr Bazille C).

D'un point de vue clinique, bien que les tumeurs cartilagineuses bénignes soient asymptomatiques et que les tumeurs malignes peuvent provoquer des douleurs et des gonflements locaux, la distinction entre enchondrome et chondrosarcome de grade I n'est pas fiable en radiographie traditionnelle. Cependant, la localisation de la tumeur dans le squelette

axial et une taille supérieure à 5cm sont des prédicteurs fiables de la malignité (Gelderblom et al., 2008). De plus, le scanner et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont des outils adjuvants vitaux pour caractériser la tumeur, sans pour autant permettre une distinction absolue entre une tumeur bénigne et maligne (Dai et al., 2010).

a. Les chondrosarcomes de grade II et III

Une résection chirurgicale est le traitement le plus répandu pour les chondrosarcomes intermédiaires et de haut grade. Cependant, elle peut conduire à une morbidité considérable et à une reconstruction plus ou moins complexe en fonction de l'emplacement de la tumeur (Gelderblom et al., 2008). De plus, bien que les chondrosarcomes soient considérés comme relativement résistants à la radiothérapie, cette dernière peut être effectuée à des doses supérieures à 60 Gy, après une résection incomplète de la tumeur, dans le cas d'une résection causant une morbidité inacceptable ou lors d'une incapacité à effectuer une résection tumorale due à sa localisation (Dai et al., 2010).

Face aux limites de la radiothérapie conventionnelle, de nouvelles alternatives au traitement des chondrosarcomes ont été testées (Dai et al., 2010). Ainsi, la photon-radiographie semble avantageuse car la dose d'excitation après dépôt d'énergie dans le volume cible semble épargner les structures proches de la tumeur. La protonthérapie est bénéfique après une résection incomplète des tumeurs chondrogéniques de la base du crâne et du squelette axial, avec un contrôle local de 85 à 10%. Enfin, l'hadrothérapie par ions Carbone représente un mode de radiation attractif avec une haute activité biologique, une meilleure précision balistique et une meilleure efficacité biologique relative (RBE).

b. Les chondrosarcomes de grade I

Pour la plupart des chondrosarcomes de bas grade, le traitement actuel consiste en un curetage intralésional extensif suivi d'une thérapie adjuvante locale (phénolisation et cryochirurgie) et d'un remplissage de la cavité par une greffe osseuse (Gelderblom et al., 2008). Cette technique montre des résultats cliniques prometteurs et un contrôle local satisfaisant.

B) Traitements conventionnels

1- La radiothérapie

La radiothérapie est une méthode de traitement locorégional des cancers, qui utilise les irradiations ionisantes pour détruire ou ralentir la croissance des cellules tumorales. Elle est aujourd'hui indispensable en cancérologie puisqu'elle est utilisée dans deux tiers des traitements, seule ou en association à la chirurgie ou à la chimiothérapie. Les protocoles de radiothérapie sont dépendants du type de tumeur, sa localisation, sa taille, son extension et son grade. Une radiothérapie classique délivre la dose totale par fraction de 2Gy, une fraction par jour, 5 jours par semaine, permettant un meilleur ratio entre l'efficacité anti-tumorale et la tolérance des tissus sains aux irradiations. L'étalement et le fractionnement de la dose d'irradiation permettent aux tissus sains traversés par le faisceau d'irradiation de se régénérer plus rapidement que la tumeur. Cependant, bien que la radiothérapie soit globalement efficace contre les cancers, une partie des patients va subir par la suite une résistance aux irradiations et une récurrence. Dans le cas d'un chondrosarcome dont la résection est incomplète ou impossible, une forte dose de radiothérapie (supérieure à 60Gy) est utilisée.

a. Mode d'action des irradiations ionisantes

Les irradiations ionisantes, telles que les rayons X et les rayons gamma (γ), sont capables de créer des lésions soit directement soit indirectement, par l'intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) provenant de la radiolyse de l'eau, principalement à l'ADN mais également aux lipides, aux glucides et aux protéines (Kim et al., 2015; Lomax et al., 2013; Roos and Kaina, 2013). Les altérations au niveau de l'ADN se traduisent par des modifications de base, des cassures simple-brin, des cassures double-brin et des pontages inter- ou intra-brin (Figure 4). En fonction du nombre de cassures et de l'altération des mécanismes de réparation de ces cassures, les irradiations ionisantes conduisent à la mort cellulaire (apoptose, nécrose, autophagie et catastrophe mitotique), essentiellement par apoptose et catastrophe mitotique.

Il faut savoir qu'environ 40% des lésions de l'ADN sont la conséquence directe de dépôts d'énergie dans la matière biologique et 60% sont dues aux effets indirects de l'irradiation (Tubiana et al., 2008).

- Les cassures simple-brin (CSB)

Les CSB, survenant au niveau de la liaison phosphodiester entre le phosphate et le désoxyribose, sont les lésions les plus fréquentes (Kim et al., 2015). Elles sont estimées à 1000/cellule pour 1Gy, mais sont 3 à 4 fois plus importantes dans les cellules hypoxiques (Tubiana et al., 2008). Cependant, ces cassures sont très vite réparées (moins d'une heure) et n'ont pas d'impact létal.

- Les cassures double-brin (CDB)

Les CDB sont des lésions extrêmement délétères correspondant à la rupture des deux chaînes d'ADN à des sites distants de quelques bases. Elles sont moins nombreuses que les CSB (40/cellule pour 1Gy) (Roos and Kaina, 2013) mais elles ont un rôle dans la létalité radio-induite. De plus, leur induction est proportionnelle à la dose d'irradiation (Tubiana et al., 2008).

- Les modifications de base

Les radiations ionisantes affectent la structure de l'ADN en induisant des dommages sur les bases libres, les nucléosides et les nucléotides de l'ADN et en provoquant une déformation de la double hélice. Cependant, les bases endommagées ont un rôle cytotoxique mineur et sont facilement réparées (Kim et al., 2015).

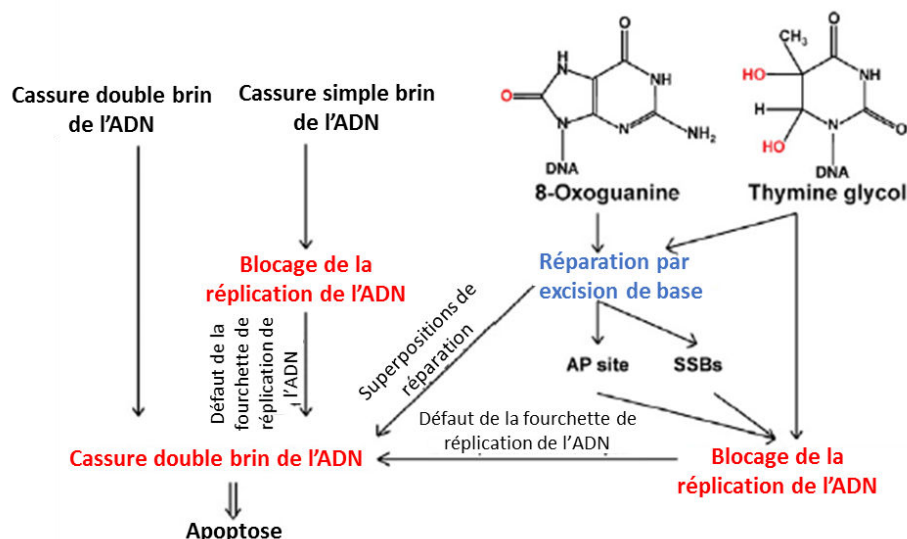


Figure 4 : Dommages à l'ADN induits par les irradiations.

Les irradiations ionisantes telles que les rayons X, induisent directement des cassures simple- et double-brin à l'ADN. Ces irradiations induisent également des lésions bloquant la réplication de l'ADN qui peuvent être converties en CDB (d'après Roos and Kaina, 2013).

b. Signalisation des lésions à l'ADN

Les irradiations ionisantes peuvent causer des lésions irréversibles mais également déclencher des mécanismes de défense (Kim et al., 2015). Des mécanismes de surveillance détectent les lésions et entraînent les cellules soit vers la mort soit vers la réparation. Ces mécanismes sont dépendants du type cellulaire, de la fonction, de l'état de prolifération et de l'importance au niveau des tissus et de l'organisme (Tubiana et al., 2008).

Les lésions de l'ADN sont signalées par des protéines « détectrices » qui se lient à ces dommages. Des cascades de signalisation sont activées visant à contrôler la réplication de l'ADN et la progression dans le cycle cellulaire par l'activation des points de contrôle G1/S, S et G2/M.

La transmission du signal est effectuée par des kinases dites « transmetteurs », présentes dans tous les organismes eucaryotes, appelées ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and RAD3-related). Le choix de la protéine kinase dépend notamment du type et du nombre de lésions. La protéine ATM est activée par le complexe Mre11/Rad50/NBS1 (protéine détectrice MRN : Meiotic recombination 11-RAD50-Nijmegen breakage syndrome 1) et est impliquée dans la réponse aux cassures double-brin. La protéine ATR est activée par le complexe Rad9/Rad1/HUS1 (protéine détectrice 9-1-1) en réponse aux cassures simple-brin (Roos and Kaina, 2013).

Ces deux kinases ATR et ATM activent par phosphorylation des protéines dites « effectrices » qui contrôlent la progression ou l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire (Figure 5). Parmi les protéines activées, on trouve l'histone H2AX impliquée dans la structure de la chromatine (une fois phosphorylée, on parle de γ H2AX), la protéine p53 impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, les protéines de contrôle du cycle cellulaire CHK1 et CHK2 et certains complexes et protéines impliqués dans la réparation (Tubiana et al., 2008).

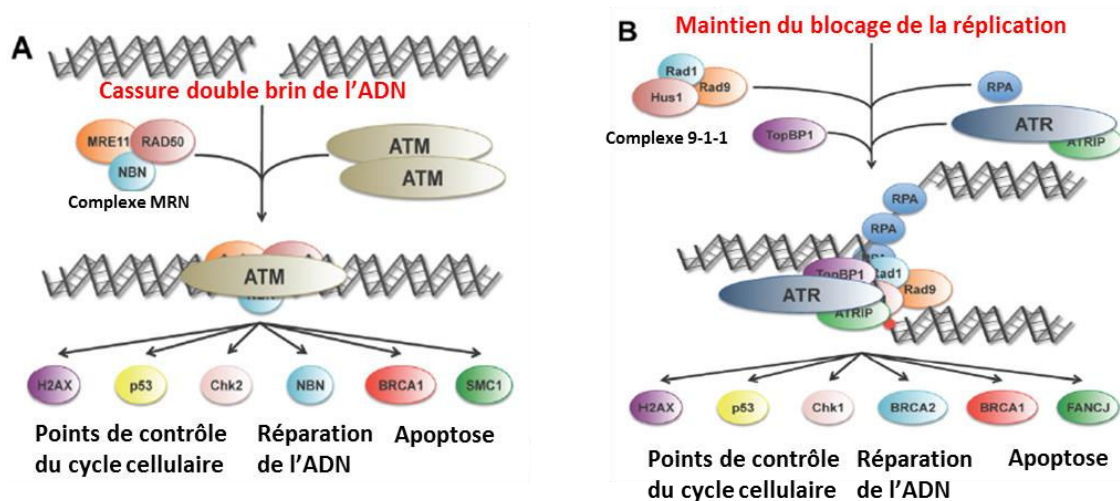


Figure 5 : Les lésions à l'ADN induisent l'activation des kinases ATM et ATR.

(A) ATM est activée par les cassures double-brin et (B) ATR est activée lors des arrêts de la fourche de réplication (d'après Roos and Kaina, 2013).

c. Réparation des lésions à l'ADN

Les cellules sont dotées de plusieurs systèmes enzymatiques de réparation des lésions à l'ADN qui ont été largement conservés au cours de l'évolution. Les divers systèmes de réparation vont d'un processus simple impliquant une seule enzyme (réversion directe du dommage) à des processus complexes multi-enzymatiques (réparation des mésappariements de bases, excision de bases et de nucléotides, recombinaison homologue et jonction d'extrémité non homologue) (Figure 6).

- Réparation des cassures simple-brin

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la réparation des cassures simple-brin (Kim et al., 2015; Lomax et al., 2013; Roos and Kaina, 2013) :

- *Système de réparation directe des lésions à l'ADN* : Les dommages à l'ADN peuvent être réparés par réversion directe in situ ne nécessitant l'intervention que d'une seule enzyme. Par exemple, les CSB avec une extrémité 3'OH peuvent être réparés par l'ADN ligase I, les dimères de pyrimidines peuvent être réparés par les photolyases et les bases alkylées peuvent être enlevées par l'alkyltransférase.
- La réparation des bases mésappariées : Cette voie répare les bases non lésées qui sont appariées à une base non complémentaire.

- La réparation par excision de bases (BER) : Elle permet de réparer des liaisons qui n'altèrent pas la conformation de l'ADN. Il existe deux voies enzymatiques : Short patch repair, qui consiste en l'insertion de seulement une à deux bases et Long patch repair, qui consiste en l'insertion d'environ 2 à 8 bases dans la brèche formée dans l'ADN après l'excision de la base modifiée.
- La réparation par excision de nucléotides (NER) : Elle permet la réparation d'une large partie des CSB. Il en existe deux formes, la première est dite globale car elle concerne tout le génome. La seconde est couplée à la transcription et répare prioritairement les lésions de l'ADN qui bloquent la synthèse de l'ARN. L'élimination par NER des lésions radio-induites peut nécessiter plusieurs heures alors que l'excision des lésions s'effectue en 2 minutes.
- Réparation des cassures double-brin

En endommageant les deux brins au même niveau, les CDB « suppriment » l'information génétique à ce site, ainsi leur réparation est indispensable à la survie de la cellule. Deux mécanismes sont impliqués dans la réparation de ces cassures (Kim et al., 2015; Lomax et al., 2013; Roos and Kaina, 2013) :

- La recombinaison homologue : Afin de parvenir à une reconstitution identique de l'information génétique, la cellule est capable de remplacer l'ADN lésé par une séquence homologue intacte en interagissant avec la chromatide sœur. Ce mécanisme intervient au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire.
- La jonction *d'extrémité non homologue (NHEJ)* : Elle intervient lors de la phase G0/G1 du cycle cellulaire. Elle consiste en une ligation par digestion enzymatique des terminaisons des fragments double-brins.

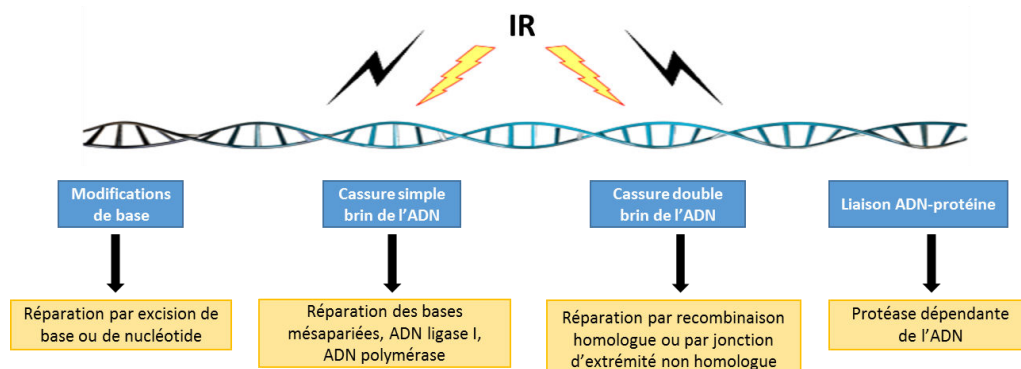


Figure 6 : Les irradiations induisent différents types de dommages à l'ADN, pouvant être réparés par différents mécanismes (d'après Kim et al., 2015).

2- La chimiothérapie

La chimiothérapie est une méthode thérapeutique utilisée essentiellement contre le cancer et fait appel à l'emploi de substances chimiques. Cette thérapie générale vise à détruire les cellules cancéreuses ou à les empêcher de se multiplier. Généralement, une combinaison d'agents chimiothérapeutiques est utilisée pour agir sur des cibles cellulaires différentes. Ces agents anticancéreux peuvent être classés en fonction de leur mode d'action : les agents alkylants, tels que le cisplatine, le melphalan et le cyclophosphamide, forment des liaisons covalentes avec les nucléotides d'ADN et inhibent ainsi la réplication. Les agents anti-métabolites (5-FU, gemcitabine, fludarabine...) bloquent une ou plusieurs voies de synthèse de l'ADN. Les antibiotiques cytotoxiques (paclitaxel, docétaxel, vincristine...) inhibent la division cellulaire en s'intercalant à l'ADN ou en générant des ROS. Et les inhibiteurs de topoisomérases, tels que le topotécane ou la doxorubicine, perturbent la structure, la réplication et la transcription de l'ADN. Dans ce travail, nous nous intéressons plus particulièrement à l'agent alkylant cisplatine.

Le cisplatine, également appelé cis-diamminedichloroplatinum (II), est une petite molécule dérivée de platine appartenant à une classe d'agents néoplasiques et a été décrit pour la première fois en 1845 par le chimiste italien Michele Peyrone. Rosenberg, 120 ans plus tard, a démontré le rôle antiprolifératif du cisplatine dans des cultures d'*Escherichia Coli* et par la suite dans des xénogreffes de tumeurs solides et hématopoïétiques (Galluzzi et al., 2014; Shen et al., 2012). Depuis la fin des années 1970, le cisplatine est l'un des plus puissants agents anti-tumoraux connus et il est couramment employé en clinique contre de nombreux cancers (testicule, ovaire, poumon, colon...). Il peut être utilisé comme thérapie adjuvante à la chirurgie, à l'irradiation ou à d'autres agents chimiothérapeutiques.

a. Mode d'action du cisplatine

Deux mécanismes sont responsables de l'entrée du cisplatine à l'intérieur du compartiment cytoplasmique de la cellule. Le cisplatine diffuse passivement à travers la membrane plasmique mais, la majorité entre activement dans les cellules par des transporteurs de cuivre dont le principal est CTR1 (copper transporter 1). Cependant, le cisplatine est également expulsé à l'extérieur de la cellule par d'autres transporteurs de cuivre tels qu'ATP7B (ATPase, Cu⁺⁺ transporting, beta polypeptide) et ATP7A (copper-transporting ATPase 1) et des transporteurs

de la membrane plasmique tels que MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) et ATP11B (ATPase, class VI, type 11B) (Galluzzi et al., 2014).

Le cisplatine est synthétisé sous forme inerte, cependant lorsqu'il pénètre dans la cellule, un ou ses deux groupements cis-chloro est remplacé par une molécule d'eau et il devient alors très électrophile. Cette hydratation se produit spontanément dans le cytoplasme du fait de la faible concentration d'ion chlorure dans le cytoplasme par rapport au compartiment extracellulaire (Galluzzi et al., 2014). Le cisplatine hydraté se lie avec une forte affinité à l'ADN mitochondrial et nucléaire, et plus particulièrement sur les purines au niveau des sites N7 nucléophiles, favorisant ainsi la génération de complexes ADN –ADN hétérotypiques et des adduits à l'ADN tels que des réticulations intra-brins guanine-guanine ou adénine-guanine et des réticulations inter-brins (Roos and Kaina, 2013; Siddik, 2003) (Figure 7).

Si la quantité de lésions d'ADN est limitée, celles-ci peuvent être reconnues et éliminées par plusieurs systèmes de réparation. En effet, le cisplatine induit la phosphorylation des kinases AKT et ATM permettant un arrêt transitoire du cycle cellulaire en phase S et l'activation des voies de réparation telles que la réparation par excision de nucléotides (NER), la réparation des bases mésappariées (MMR) et la recombinaison homologue (HR).

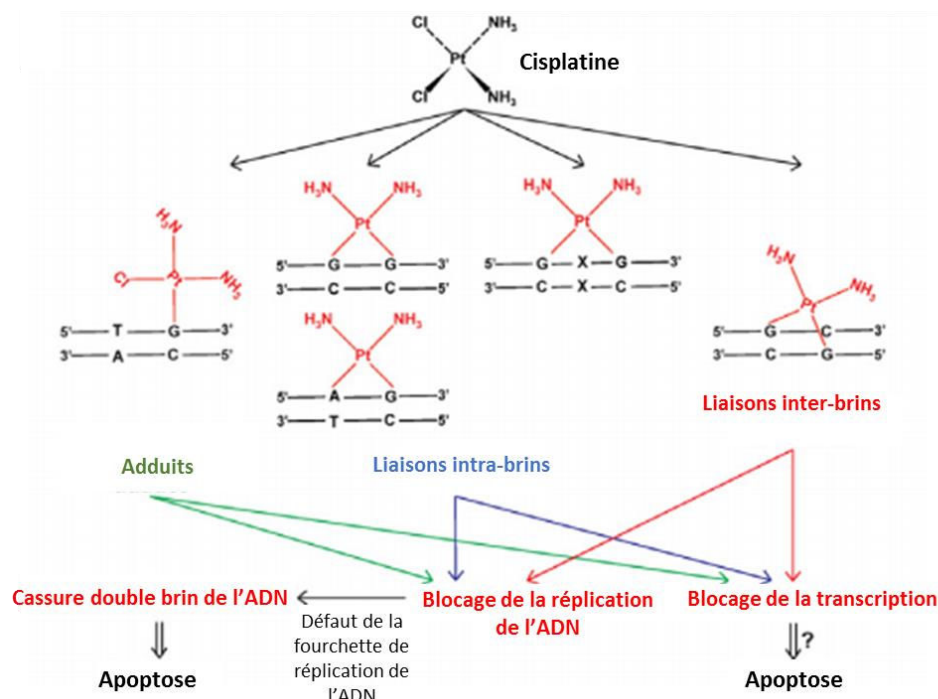


Figure 7 : Dommages à l'ADN induits par le cisplatine.

Le cisplatine induit différents types d'adduit à l'ADN pouvant avoir des conséquences différentes sur la transcription et la répllication de l'ADN (d'après Roos and Kaina, 2012).

Cependant, si les lésions provoquées par le cisplatine sont irréparables, la cellule meurt majoritairement par apoptose en initiant la voie intrinsèque (mitochondriale) et/ou la voie extrinsèque (récepteurs de mort). Néanmoins, des mécanismes additionnels à l'apoptose ont été rapportés : la sénescence a été mise en évidence dans des hépatomes humains (Qu et al., 2013), la nécrose dans des cellules de carcinome épidermoïde (Xu et al., 2014) et l'autophagie dans des lignées cancéreuses de poumon (Cho et al., 2014).

b. Mécanisme de résistance au cisplatine

L'objectif principal de la chimiothérapie anticancéreuse est d'induire la mort des cellules tumorales. Bien que le cisplatine soit un puissant inducteur de l'apoptose, une résistance peut être acquise à cause d'une exposition chronique au cisplatine ou se présenter comme un phénomène intrinsèque. Les mécanismes de résistance résultent de changements intracellulaires qui empêchent le cisplatine d'interagir avec l'ADN et qui empêchent les signaux d'endommagement de l'ADN d'activer l'apoptose. En général, la résistance est multifactorielle, c'est-à-dire que plusieurs mécanismes se rencontrent simultanément au sein d'une même cellule tumorale.

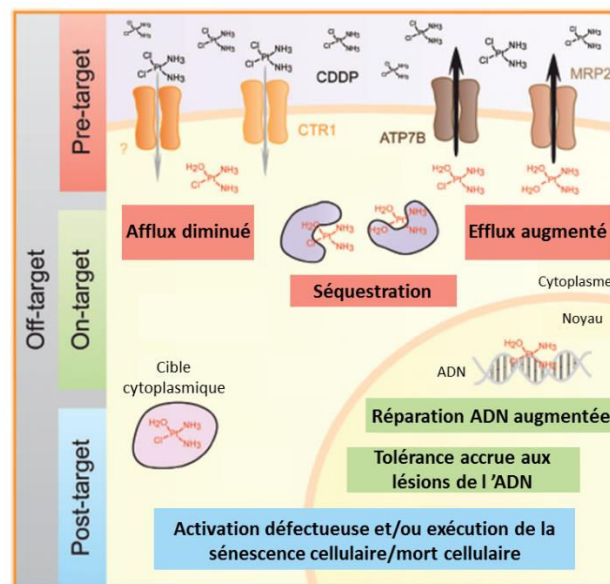


Figure 8 : Mécanisme moléculaire de résistance au cisplatine.

Cette résistance peut être causée par des mécanismes qui altèrent les transporteurs du cisplatine (CDDP) en augmentant son efflux (MRP2 et ATP7B) et en diminuant de son afflux (CTR1) (effet pre-target). Elle est également augmentée par la présence de systèmes de réparation efficaces (effet on-target). La résistance au cisplatine peut être due à une déficience des systèmes d'activation ou d'exécution de la mort cellulaire (effet post-target). Enfin, la délivrance des signaux de survie peut compenser la cytotoxicité du cisplatine (effet off-target). (adapté de Galluzzi et al., 2014).

L'effet pre-target : La résistance des cellules au cisplatine peut être causée par des altérations réduisant la quantité de cisplatine dans le cytoplasme. Deux mécanismes sont impliqués : une réduction de l'accumulation du cisplatine intracellulaire et une augmentation de la séquestration du cisplatine par les glutathions et les métallothionines (Figure 8). En effet, des altérations du niveau d'expression, de la localisation et/ou de la fonctionnalité subcellulaire des transporteurs CTR1 et ATP7B ont été associées à la résistance au cisplatine dans des modèles pré-cliniques et des patients atteints d'un cancer (Galluzzi et al., 2014). De plus, le transporteur MRP2, responsable de l'efflux du cisplatine, est également impliqué dans la résistance au cisplatine. Ce transporteur est surexprimé dans les cellules résistantes au cisplatine (Siddik, 2003).

L'effet on-target : La sensibilité des cellules cancéreuses aux effets cytotoxiques du cisplatine est limitée par la présence de systèmes efficaces de réparation de l'ADN (Figure 8). Sachant que les voies NER et MMR sont principalement utilisées pour réparer les lésions de l'ADN, la résistance au cisplatine est corrélée à une augmentation d'efficacité de ces voies. Au sein du complexe NER, la résistance au cisplatine est associée à une augmentation de l'expression d'ERCC1 (excision repair crosscomplementing 1) (Siddik, 2003). Au sein de la voie de réparation MMR, les gènes MSH2 (mutS homolog 2) et MLH1 (mutL homolog 1) sont fréquemment mutés ou dérégulés dans un contexte de résistance au cisplatine (Galluzzi et al., 2014).

L'effet post-target : La résistance au cisplatine peut aussi résulter d'une altération des systèmes permettant l'activation et l'exécution des signaux de mort cellulaire (Figure 8). En effet, une corrélation entre le statut du gène p53 et la réponse au cisplatine a été mise en évidence dans les cancers considérés comme sensibles au cisplatine ; les tumeurs germinales testiculaires, dans lesquelles le statut de p53 est sauvage, sont relativement sensibles au cisplatine alors que les tumeurs dont p53 est muté tels que les cancers de la vessie, de l'ovaire ou de la tête et du cou ont un taux de réponse beaucoup plus faible (Siddik, 2003). De plus, des protéines anti-apoptotiques telles que la survivine et XIAP interviennent dans la résistance au cisplatine. Elles influencent directement ou indirectement l'activité des caspases 3,8 et 9 en diminuant leur activité dans les cellules résistantes. Enfin, la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est corrélée à la résistance au cisplatine (Galluzzi et al., 2014).

L'effet off-target : La résistance au cisplatine peut également résulter d'altérations de voies de signalisation indirectement induites par le cisplatine (Galluzzi et al., 2014) (Figure 8). Par exemple, la surexpression d'ERBB2 (v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2), qui est fréquente dans les carcinomes du sein et de l'ovaire, favorise la résistance

au cisplatine en favorisant la sécrétion de signaux de survie par le biais d'AKT1 (c-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) mais également en régulant l'arrêt du cycle cellulaire afin de réparer les liaisons à l'ADN induites par le cisplatine.

3- Mécanismes de résistance des chondrosarcomes aux traitements conventionnels

Du fait d'une matrice extracellulaire abondante, du faible pourcentage de divisions cellulaires et d'une faible vascularisation, les chondrosarcomes sont des tumeurs résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Leur traitement pose donc des difficultés majeures aux cliniciens. Ainsi, mieux comprendre les mécanismes responsables de cette résistance pourrait à terme aboutir à l'identification de thérapies adjuvantes à la radiothérapie ou à la chimiothérapie permettant une meilleure efficacité de ces traitements afin d'épargner les tissus autour de la tumeur et d'améliorer la qualité de vie des patients. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer la résistance des chondrosarcomes aux traitements conventionnels (Tableau II).

Tableau II : Résumé des mécanismes impliqués dans la chimiorésistance et la radiorésistance des chondrosarcomes (d'après Onishi et al., 2011).

Mécanismes de résistance	Effet sur la cellule
Expression de la P-glycoprotéine	Export d'agents chimiothérapeutiques
Activité de la télomérase	Phénotype de cellule « immortelle »
Angiogenèse	Permet la formation de métastases
Expression de COX-2	Pas clair, mais associée à un faible pronostic
Synthèse de Mélovonate	Équilibre le remodelage osseux vers la résorption
Mutation du gène suppresseur de tumeur p16	Tendance à réduire l'apoptose
Augmentation de l'expression de Bcl-2, Bcl-xL et XIAP	Tendance à réduire l'apoptose
Hypoxie	Diminution de la production de ROS induites par les irradiations

a. Expression de la P-glycoprotéine

La P-glycoprotéine est une pompe transmembranaire, ATP dépendante, qui excrète des petites molécules hydrophobes. Son expression est retrouvée dans des cellules avec des fonctions sécrétoires telles que les cellules tubulaires proximales du rein et dans les régions hypertrophiques des plaques de croissance épiphysaires (Onishi et al., 2011). L'expression de la P-glycoprotéine dans les chondrosarcomes est bien établie, et son rôle dans l'efflux des drogues est important dans le développement de la chimiorésistance (Terek et al., 1998).

La P-glycoprotéine est codée par le gène MDR-1 (Multiple Drug Resistance-1) et son expression est retrouvée au niveau des lésions cartilagineuses bénignes et malignes, avec 90% des tumeurs, marquées avec un anticorps spécifique, positives à l'expression de la P-glycoprotéine (Rosier et al., 1997). L'expression de MDR-1 permet aux chondrosarcomes de résister aux effets cytotoxiques d'agents chimiothérapeutiques tels que le cyclophosphamide, la doxorubicine, le cisplatine, le dacarbazine et la vincristine. En effet, Wyman et col ont montré que les lignées de chondrosarcome qui expriment la P-glycoprotéine accumulent moins de doxorubicine intracellulaire et qu'elles sont insensibles aux effets cytotoxiques de la doxorubicine.

b. Activité télomérase

Les télomères sont des régions non codantes d'ADN situées à l'extrémité de chaque brin d'ADN et ont pour rôle de protéger les régions codantes de la dégradation. Certaines cellules cancéreuses expriment une enzyme appelée télomérase permettant l'acquisition d'une « immortalité cellulaire » (Onishi et al., 2011). Au sein des chondrosarcomes, la télomérase est active et son expression est corrélée au grade de la tumeur et au taux de récurrence. De même, Parsch et col ont montré que les lignées de chondrosarcome ayant une activité télomérase faible sont plus sensibles à l'apoptose induite par le cisplatine que celles avec une forte activité télomérase. Ce qui suggère que l'arrêt de l'allongement continu des télomères permettrait aux cellules malignes de rentrer dans un cycle cellulaire normal et de devenir sensibles aux agents chimiothérapeutiques en induisant l'apoptose.

c. Perte d'expression de la protéine p16

La perte de gènes suppresseurs de tumeur a un rôle bien connu dans la radio-résistance de nombreuses tumeurs. Parmi ces gènes suppresseurs de tumeur, le gène CDKN2, codant la protéine p16, est altéré dans les chondrosarcomes de haut grade (Asp et al., 2000). Cependant, il n'est pas modifié dans les tumeurs cartilagineuses bénignes, suggérant un rôle de p16 dans la transition vers un phénotype agressif et malin (Onishi et al., 2011). De plus, son rôle dans la radio-résistance a été mis en évidence par des expériences de réintroduction de l'expression de p16 à l'aide d'un vecteur viral (Moussavi-Harami et al., 2006), augmentant ainsi la radiosensibilité *in vitro* par induction d'une catastrophe mitotique.

d. Expression de protéines anti-apoptotiques

Dans n'importe quelle cellule, la survie et la prolifération sont contrôlées par une balance entre des signaux pro- et anti-apoptotiques (Onishi et al., 2011). Les protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2, Bcl-xL et XIAP, favorisent la survie, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. A l'inverse, les protéines pro-apoptotiques, telles que Bax, Bak et Bim, favorisent la mort cellulaire. Un haut niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et XIAP est retrouvé dans les chondrosarcomes mais pas dans les chondrocytes normaux. Cependant, ils expriment tous les deux la protéine Bcl-xL (Kim et al., 2007).

Les irradiations induisent une augmentation de l'expression de ces protéines de manière dose dépendante, suggérant un rôle de la signalisation anti-apoptotique dans la radio-résistance. Il a été mis en évidence que l'extinction de l'expression de ces protéines, à l'aide de siRNA, augmente la radiosensibilité (Kim et al., 2007).

e. Hypoxie

L'hypoxie correspond à une baisse de la disponibilité en oxygène. Sachant que la pression partielle en oxygène est spécifique pour chaque tissu, l'hypoxie est donc une notion relative à la teneur basale en oxygène dans le tissu concerné. L'hypoxie peut se manifester dans les tissus de manière physiologique (au cours du développement embryonnaire, de la cicatrisation, de la chondrogenèse, de la différenciation des lymphocytes T...) mais également dans des processus pathologiques tels que l'anémie, l'ischémie cérébrale et le cancer.

Les chondrosarcomes sont des tumeurs faiblement vascularisées, dites hypoxiques, dont le taux d'oxygène varie de 1% d'O₂ au cœur de la tumeur à 6% à sa périphérie (Reed et al., 1989). Leur résistance aux traitements conventionnels peut être expliquée par cette faible présence d'oxygène. En effet, l'hypoxie peut induire directement une résistance par privation de molécules d'oxygène car la chimiothérapie et la radiothérapie requièrent de l'oxygène intratumoral pour être efficaces (Harrison and Blackwell, 2004). La résistance à la chimiothérapie peut s'expliquer par le fait que l'hypoxie entraîne une augmentation de l'activité d'enzymes de réparation de l'ADN, une perte du potentiel apoptotique dans les cellules ayant une mutation du gène p53 ainsi que la création d'un gradient de pH qui inhibe l'accumulation intracellulaire des drogues (Shannon et al., 2003). Enfin, la résistance des chondrosarcomes à la radiothérapie peut être due à la limitation de la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsables de l'action indirecte des irradiations en occasionnant des cassures double et simple brins à l'ADN (Onishi et al, 2010).

II) L'hypoxie

Le maintien de la concentration en oxygène dans les cellules normales est essentiel pour leur fonction et leur survie. En effet, le manque d'oxygène induit un stress environnemental provoquant la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose des régions hypoxiques (Karakashev and Reginato, 2015). L'effet de l'hypoxie dans les cellules cancéreuses est tout autre. Ces dernières sont capables de s'adapter à un environnement hypoxique, en activant des mécanismes qui modulent la glycolyse, la prolifération cellulaire, l'invasion, la progression tumorale et la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Paolocchi et al., 2016; Karakashev et al., 2015; Shannon et al., 2003).

A) Les facteurs HIFs

Il est maintenant bien établi que l'hypoxie agit principalement à travers des médiateurs cellulaires appelés Hypoxia Inductible Factor (HIF). Ces facteurs sont exprimés dans les chondrosarcomes (au moins de haut grade) (Kubo et al., 2008).

1- Structure des facteurs HIFs

Le facteur HIF est un régulateur clé de la réponse cellulaire à l'hypoxie, essentiel au maintien de l'homéostasie de l'oxygène cellulaire et à l'adaptation cellulaire en milieu hypoxique. Ce facteur de transcription, appartenant à la superfamille des protéines « basic helix-loop-helix (bHLH)/Per-ARNT-Sim (PAS) » (Koh and Powis, 2012), contrôle la transcription de gènes inductibles par l'hypoxie et intervient dans l'angiogenèse, l'invasion tumorale, le métabolisme glucidique, la régulation du pH et le contrôle de la prolifération cellulaire.

Le facteur HIF est un hétérodimère comprenant une sous unité dépendante de l'oxygène HIF- α localisée dans la partie cytoplasmique et une sous unité constitutive HIF-1 β (aussi appelé Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator ou ARNT) exclusivement nucléaire. Il existe trois isoformes du facteur HIF : HIF-1, HIF-2 et HIF-3, codés par des gènes différents mais de structures proches, dont les 3 sous-unités α s'associent toutes à la même sous-unité β (Wigerup et al., 2016).

Les facteurs HIFs sont constitués de plusieurs domaines (Koh and Powis, 2012; Poon et al., 2009) (Figure 9) :

- Le motif bHLH qui intervient dans la dimérisation des deux sous-unités ainsi que dans la liaison directe du facteur HIF à l'ADN.
- Le domaine PAS forme une seconde zone de dimérisation entre les sous-unités α et β .
- Le domaine de dégradation de la sous-unité α dépendante de l'oxygène, appelé ODD (Oxygen-dependent Degradation Domain), présent uniquement dans les trois sous-unités α , comporte des résidus proline (P402/P564 pour HIF-1 α et P405/P531 pour HIF-2 α) reconnus et hydroxylés par les prolyl-hydroxylases en normoxie.
- Les deux domaines de transactivation N-terminal (N-TAD) et C-terminal (C-TAD) sont impliqués dans l'activation transcriptionnelle.

Le facteur HIF-3 α est hautement similaire à HIF-1 α et HIF-2 α au niveau de la structure de l'hélice-boucle-hélice et des domaines PAS mais ne possède pas le domaine de transactivation C-terminal. De plus, le facteur HIF-3 α possède de nombreux variants d'épissage dont le plus connu est l'inhibiteur du domaine protéique PAS (IPAS) formant une protéine tronquée qui joue le rôle d'inhibiteur de HIF-1 α (Karakashev et al., 2015; Koh and Powis, 2012).

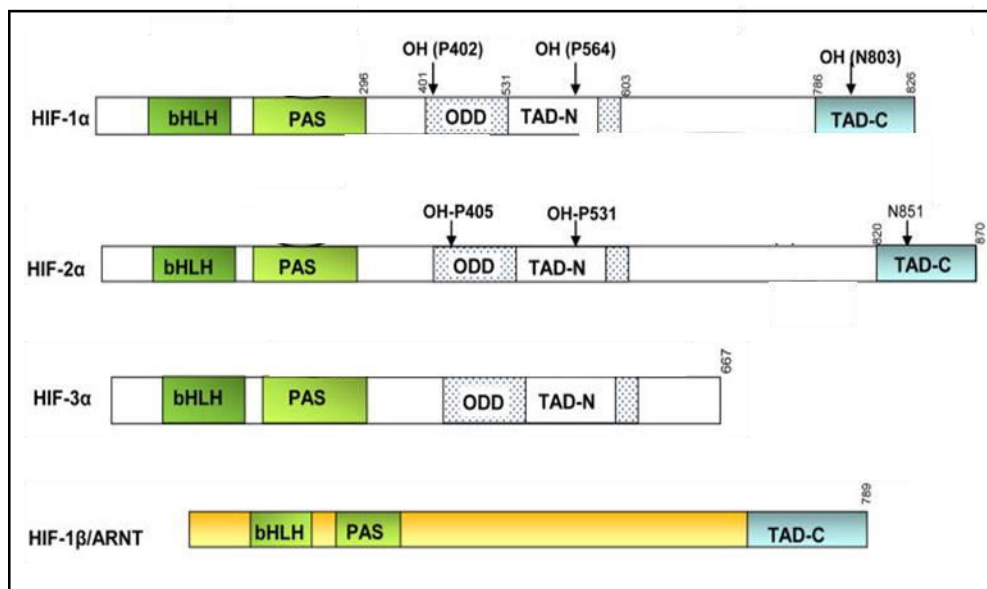


Figure 9 : Les domaines structuraux des trois isoformes HIF- α et de l'isoforme HIF- β .

Les domaines bHLH et PAS sont impliqués dans la liaison de l'ADN et l'hétérodimérisation. Le domaine ODD est nécessaire pour l'hydroxylation et la dégradation dépendante de l'oxygène. Les domaines N-TAD et C-TAD sont nécessaires pour l'activation transcriptionnelle (d'après Koh and Powis, 2012).

2- Régulation des facteurs HIFs

Les facteurs HIFs sont contrôlés par un mécanisme de régulation dépendant de la teneur cellulaire en oxygène. Toutefois, dans les cellules tumorales, l'expression des facteurs HIFs peut être contrôlée par des mécanismes indépendants de l'oxygène. Elle peut être le résultat d'une activation d'oncogènes tels que Ras, Raf, PI3K, Akt, mTOR, Myc ou la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeur tels que TP53, ING4, PTEN et VHL (Karakashev and Reginato, 2015; Chiche et al., 2010; Poon et al., 2009).

Le mécanisme de régulation des facteurs HIFs par l'oxygène ne concerne que la sous-unité α car la sous-unité β est synthétisée de façon constitutive. Contrairement à HIF-1 β , la sous-unité α est à peine détectable en normoxie car elle est constamment dégradée par le protéasome. En effet, la régulation de la sous-unité α du facteur HIF est dépendante de l'action d'enzymes appelées prolyl-hydroxylases (PHDs) : PHD1, PHD2 (préférentiellement active pour HIF-1 α) et PHD3 (préférentiellement active pour HIF-2 α) dont l'activité dépend de la présence d'oxygène, de fer (Fe^{2+}), d'ascorbate et du 2-oxoglutarate (Koh and Powis, 2012; Poon et al., 2009).

En normoxie, ces enzymes sont actives et induisent l'hydroxylation de la sous-unité α du facteur HIF au niveau des résidus prolines du domaine ODD, permettant le recrutement du facteur VHL (Von Hippel-Lindau) qui appartient au complexe ubiquitine ligase E3. Ce facteur VHL induit l'ubiquitination de la sous-unité α de HIF entraînant sa dégradation par le protéasome (Figure 10). En condition hypoxique, les prolyl-hydroxylases ne peuvent pas être activées par l'oxygène, ce qui empêche la dégradation de la sous-unité α , entraînant son accumulation dans le cytoplasme. Cet excédent de sous-unités α pénètre dans le noyau et se lie à la sous-unité β pour former le complexe HIF. Ce dernier se lie aux promoteurs de gènes cibles sur des séquences spécifiques appelées éléments de réponse à l'hypoxie ou « Hypoxia Responsive Element » (HRE) (Figure 10).

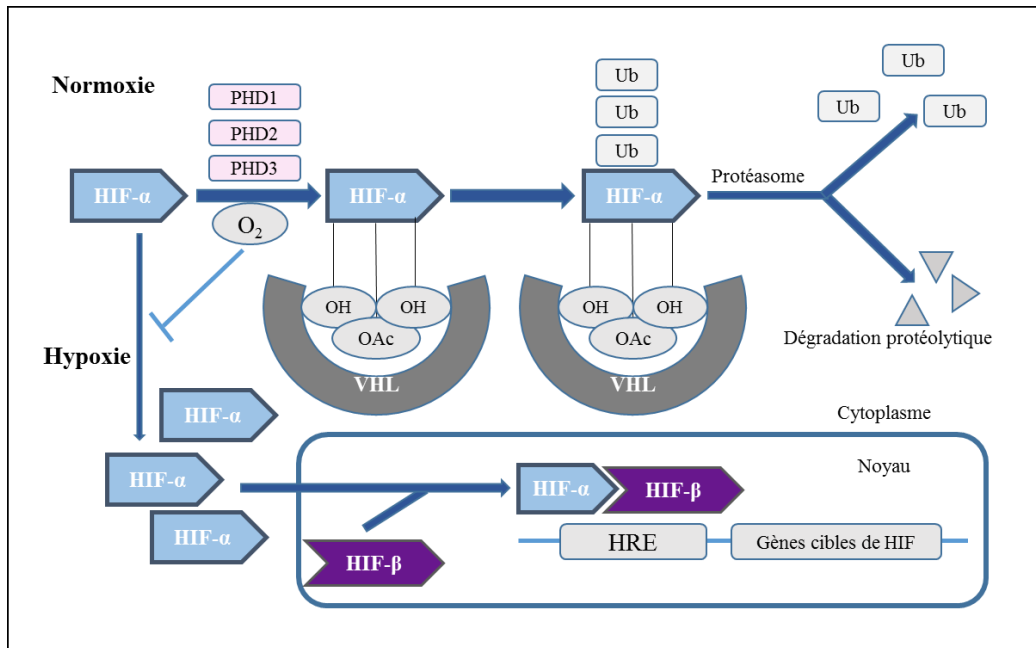


Figure 10: Représentation schématique du mécanisme de régulation du facteur HIF- α .

En normoxie, les prolyl-hydroxylases (PHD) induisent l'hydroxylation de la sous unité α , induisant le recrutement du facteur VHL (Von Hippel-Lindau). Ce facteur VHL entraîne l'ubiquitination de la sous unité α et par conséquent sa dégradation par le protéasome. En hypoxie, l'absence d' O_2 entraîne une inactivation des prolyl-hydroxylases inhibant la dégradation de la sous unité α . L'excédent de HIF- α migre vers la partie nucléaire et se lie à la sous unité β formant ainsi le facteur HIF (Hypoxia Inductible Factor) qui reconnaît des séquences spécifiques appelées HRE (Hypoxia Response Element).

Bien qu'il soit établi que la protéine VHL joue un rôle clé dans la dégradation de HIF- α , plusieurs voies alternatives impliquées dans cette dégradation ont été décrites (Wigerup et al., 2016; Koh and Powis, 2012) (Figure 11) :

- L'activité transcriptionnelle de HIF est régulée par une autre enzyme dépendante de l'oxygène : FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1). FIH-1 hydrolyse le résidu asparagine 803 du domaine C-TAD du facteur HIF-1 α et le résidu asparagine 851 du domaine C-TAD du facteur HIF-2 α mais son efficacité est plus faible. Cette hydroxylation perturbe l'interaction entre le domaine C-TAD de HIF et le co-activateur transcriptionnel p300/CREB binding protein (CREB). Tout comme les PHDs, l'hydroxylation du résidu asparagine est inhibée sous hypoxie, permettant ainsi la liaison du complexe p300/CBP au domaine C-TAD des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α et par conséquent d'activer les complexes HIFs.

- Le facteur HAF (Hypoxia-Associated Factor) est une ubiquitine ligase E3 qui induit l'ubiquitylation et la dégradation de HIF-1 α . A contrario, le facteur HAF induit la transactivation du facteur HIF-2 α au cours d'une hypoxie prolongée.
- Le complexe Hsp70/CHIP (Heat-Shock Protein 70/Carboxyl terminus of Hsp70-Interacting protein) dégrade le facteur HIF-1 α lors d'une hypoxie prolongée ou de conditions de glucose élevé, mais pas le facteur HIF-2 α .
- Le récepteur RACK (Receptor Activated Protein Kinase C) est un régulateur indépendant de l'oxygène. Il favorise la dégradation de HIF-1 α lorsque la protéine de choc thermique Hsp90 est inhibée.

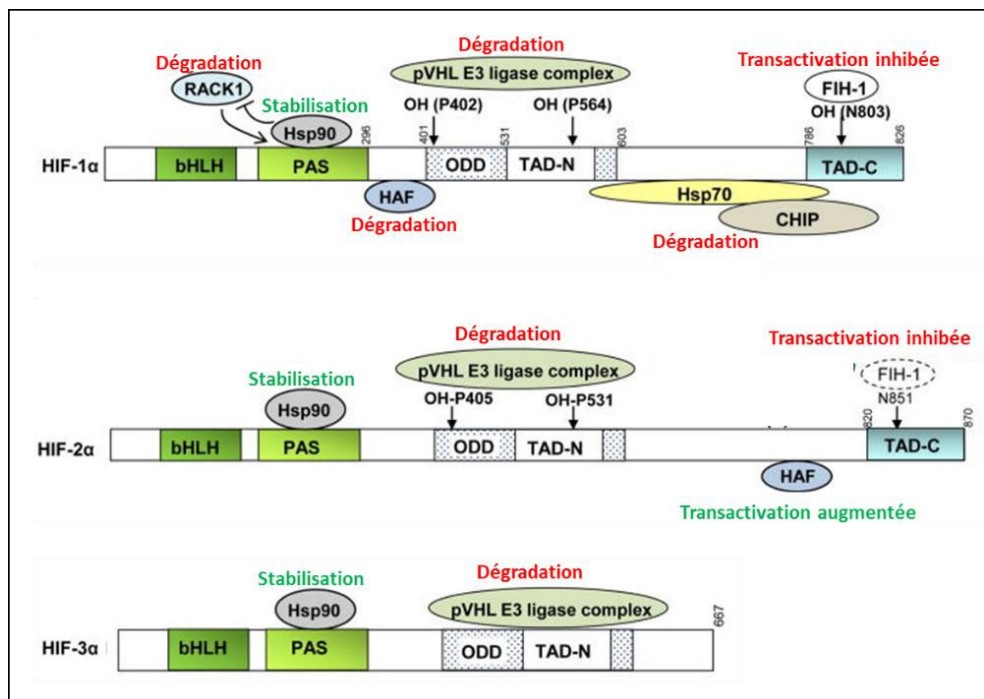


Figure 11 : Domaines de liaison des modulateurs des facteurs HIF- α .

Le complexe E3 ligase de la protéine de von Hippel Lindau (pVHL) régule la dégradation des trois sous-unités HIF- α de manière dépendante à l'oxygène. L'inhibition du facteur HIF-1 (FIH-1) induit l'hydroxylation des facteurs HIF-2 α et HIF-1 α . Le récepteur RACK1 favorise la dégradation de HIF-1 α lorsque la protéine de choc thermique 90 (Hsp90). Le facteur associé à l'hypoxie (HAF) se lie sélectivement à HIF-1 α et HIF-2 α , ce qui détermine la dégradation et la transactivation, respectivement (adapté de Koh and Powis, 2012).

Les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α sont tous deux induits par l'hypoxie. Cependant, le pic d'expression de HIF-1 α est relativement court (2h-24h) lors d'une hypoxie intense ou une anoxie, en raison d'une diminution de la stabilité de l'ARNm de HIF-1 α . Dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire, les auteurs expliquent cette baisse par l'expression d'un ARN antisens naturel (aHIF) dirigé contre HIF-1 α (Uchida et al., 2004). HIF-2 α quant à lui, continue à être exprimé après 48h-72h d'hypoxie et est activé sous hypoxie légère ou physiologique (Holmquist-Mengelbier et al., 2006).

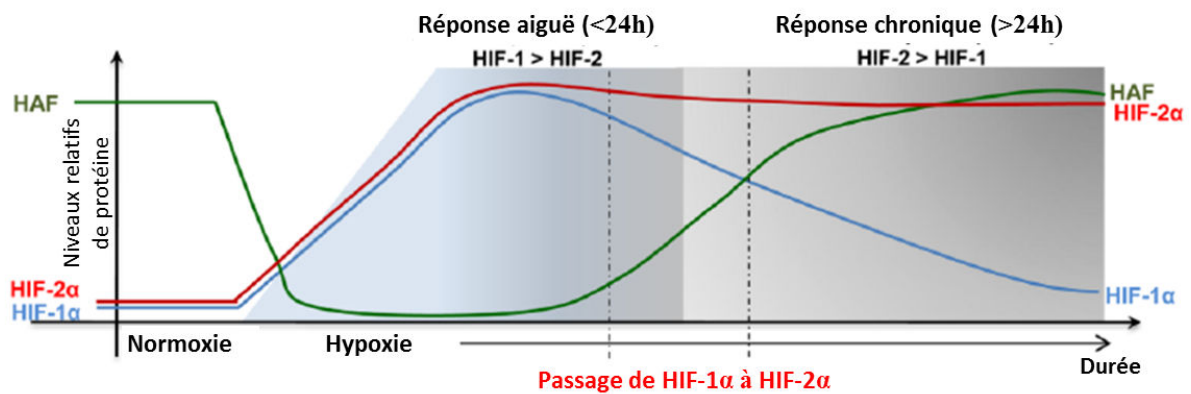


Figure 12 : Régulation temporelle de HIF-1 α , HIF-2 α et HAF en réponse à une exposition hypoxique prolongée (d'après Koh and Powis, 2012).

HIF-1 α est exprimé dans quasiment tous les types cellulaires en condition hypoxique, alors que l'expression de HIF-2 α est plus restrictive. Cependant, HIF-2 α est également retrouvé dans de multiples cellules en hypoxie (foie, rein, macrophage, cellules musculaires...), indiquant que HIF-1 α et HIF-2 α peuvent être co-exprimés dans de nombreux types cellulaires (Keith et al., 2011) mais également avoir une expression tissu-dépendante.

3- Rôle des facteurs HIFs

Lors de la croissance des tumeurs solides, l'environnement tumoral induit des changements biochimiques tels qu'un haut niveau de lactate, un faible pH et une déplétion en glucose, bicarbonate et oxygène. Les cellules malignes, par l'intermédiaire des facteurs HIFs, sont capables de s'adapter à un environnement hypoxique, favorisant leur progression tumorale et l'augmentation de la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Figure 13).

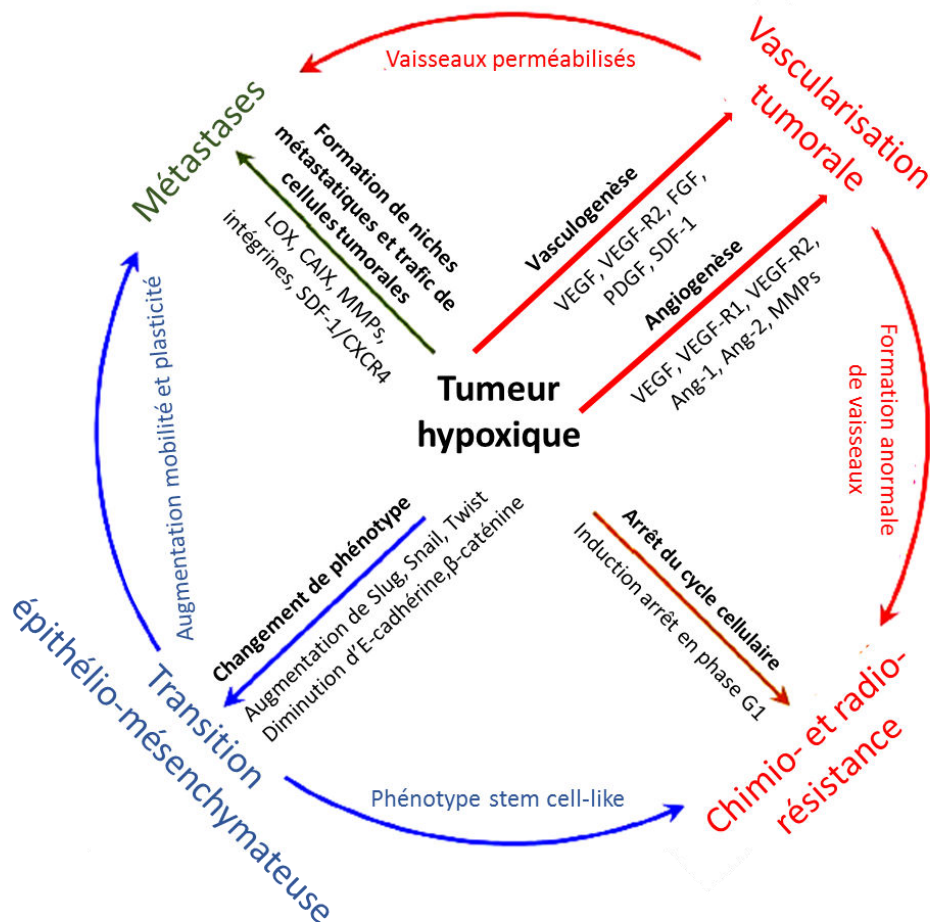


Figure 13 : L'hypoxie comme une force motrice de la progression tumorale et de la formation de métastases.

L'hypoxie stimule la tumeur en favorisant l'angiogénèse qui induit la germination de vaisseaux préexistants lors d'une production accrue de VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, Ang-1, Ang-2 et MMP. Les cellules cancéreuses hypoxiques acquièrent un phénotype mésenchymateux lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), en augmentant les facteurs de transcription tels que Slug, Snail et Twist et en diminuant l'expression de molécules d'adhésion telles que la β -caténine et l'E-cadhérine. La chimiorésistance et la radiorésistance des tumeurs sont liées à la TEM et à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (d'après Muz et al., 2015).

a. Le métabolisme : l'effet Warburg

Afin de générer de l'ATP, les cellules normales activent la voie de la phosphorylation oxydative conduisant à la formation de 36 molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. Cependant, les cellules tumorales subissent un changement au niveau des voies de synthèse énergétique. L'environnement tumoral, de part un apport limité en oxygène et d'une forte consommation de glucose, favorise la glycolyse anaérobie au cours de laquelle, le catabolisme du glucose en lactate permet de générer de l'énergie (2 ATP par molécule de glucose consommée) (Chiche et al., 2010).

L'hypoxie induit une reprogrammation métabolique dans les cellules tumorales (Figure 14). En effet, le facteur HIF-1 stimule la glycolyse au détriment de la phosphorylation oxydative en régulant l'expression de gènes impliqués dans ces voies. HIF-1 favorise l'expression de gènes codant : des transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT3) afin de faciliter le transport du glucose dans les cellules, des enzymes glycolytiques telles que l'héxokinase-2 (HK-2) (augmente la capacité des cellules à cataboliser le glucose), la pyruvate déshydrogénase kinase-1 (PDK-1) (inactive la pyruvate déshydrogénase responsable de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA) et la lactate déshydrogénase A (LDH-A) (convertit le pyruvate en lactate) (Semenza, 2008).

La conversion du pyruvate en lactate aboutit à la formation de proton H^+ , affectant la régulation du pH intracellulaire des tumeurs (Figure 14). En effet, des mécanismes se mettent en place afin d'exclure les protons H^+ hors de la cellule tels que des pompes ATPases, l'échangeur sodium/proton NHE1, le co-transporteur MCT-4 et la carbonique anhydrase IX. L'acidification du pH extracellulaire favorise la survie des cellules tumorales, l'invasion cellulaire due à l'activation de protéases responsables de la digestion de la matrice extracellulaire et la formation de métastases (Chiche et al., 2010).

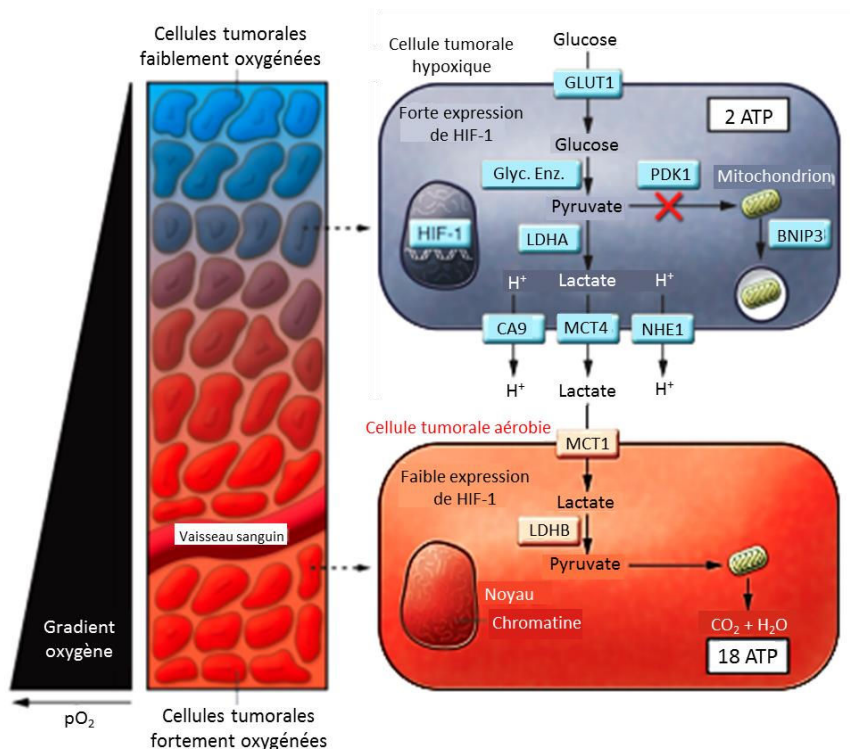


Figure 14 : Interaction entre le métabolisme cellulaire et l’hypoxie intra-tumorale.

Les cellules tumorales à proximité d’un vaisseau sanguin sont bien oxygénées alors que celles qui sont plus distantes sont faiblement oxygénées et expriment un haut niveau de HIF-1. HIF-1 induit l’expression de protéines qui augmentent : le transporteur de glucose 1 (GLUT1), les enzymes glycolytiques (Glyc. Enz.), la lactate déshydrogénase A (LDHA) et l’efflux de ces molécules hors de la cellule (dont l’anhydrase carbonique IX (CA9), l’échangeur sodium hydrogène 1 (NHE1), et le transporteur monocarboxylate 4 (MCT4)). Deux molécules de lactate sont produites pour une molécule de glucose consommée par la cellule hypoxique. Cette augmentation du métabolisme glycolytique est associée à une réduction de l’apport de substrat aux mitochondries (par l’action de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) et à une réduction de la quantité de mitochondries (suite à l’autophagie déclenchée par BNIP3). Les cellules tumorales aérobies expriment des protéines qui leur permettent d’utiliser le lactate (MCT1 et LDHB) en présence d’O₂, comme principal substrat pour la phosphorylation oxydative mitochondriale (d’après Semenza, 2008).

b. La transition épithélio-mésenchymateuse

L’hypoxie influence le comportement migratoire et invasif des cellules tumorales via la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM est physiologiquement active durant l’embryogenèse, la régénération tissulaire et la carcinogenèse, permettant aux cellules d’acquérir une plasticité et une mobilité (Muz et al., 2015). La TEM induite par l’hypoxie est caractérisée par une perte de protéines impliquées dans l’adhésion cellulaire telles que la E-cadhérine et la β -caténine et une surexpression de protéines mésenchymateuses telles que SNAIL, la vimentine, la N-cadhérine et TWIST (Paolicchi et al., 2016; Wigerup et al., 2016;

Muz et al., 2015). Phénotypiquement, ces changements correspondent à une modification de la morphologie des cellules tumorales, à une augmentation de leur prolifération et à leur migration afin d'envahir les organes alentour (Paolicchi et al., 2016).

c. L'invasion tumorale

L'habilité des cellules cancéreuses à modifier et à dégrader la matrice extracellulaire (MEC) est essentielle pour leur migration. Il est bien établi que les facteurs HIF-1 et HIF-2 régulent l'expression de gènes impliqués dans la dégradation de la MEC, tels que les métalloprotéases (MMPs). Il a été mis en évidence que l'expression de MMP-2 et MMP-9 est augmentée dans les cancers du sein et du colon (Choi et al., 2011; Krishnamachary et al., 2003). De plus, l'activation de l'enzyme protéolytique uPA (urokinase plasminogen activator), après liaison à son récepteur uPAR (urokinase receptor), permet la conversion du plasminogène en plasmine impliqué dans la dégradation de nombreuses protéines de la MEC (fibronectine et laminine) (Krishnamachary et al., 2003; Pugh and Ratcliffe, 2003). L'hypoxie régule donc le dynamisme de la MEC contribuant ainsi à la dissémination métastatique.

d. L'angiogenèse

L'angiogenèse est une caractéristique de la progression tumorale au cours de laquelle l'hypoxie induit un déséquilibre dans la production de facteurs pro- et anti-angiogéniques conduisant à une augmentation rapide et chaotique de la formation de vaisseaux sanguins (Muz et al., 2015). L'hypoxie et les facteurs HIFs sont impliqués dans les différentes étapes de formation des vaisseaux sanguins (Muz et al., 2015) (Figure 15) :

- Tout d'abord, les cellules endothéliales progénitrices de la moelle osseuse sont recrutées puis différenciées en cellules endothéliales. Cette différenciation est possible grâce à la régulation du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et à la production de molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF-R2 (Flk-1) et des membres de la famille FGF (Fibroblast Growth Factor) et PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), important pour la formation d'un réseau vasculaire primitif (Wigerup et al., 2016).
- L'hypoxie induit la prolifération des cellules endothéliales en régulant l'expression du VEGF (Wigerup et al., 2016) et de son récepteur VEGF-R1 (Flt-1) (Harris, 2002) et de l'Angiopoïétin-1 et -2. Finalement, des cellules de support telles que les cellules

musculaires lisses et les péricytes sont recrutées grâce à certains facteurs de croissance (PDGF, TGF- β) pour permettre la maturation des vaisseaux sanguins et par conséquent la dissémination des cellules tumorales dans la circulation sanguine.

Les facteurs HIF-1 et HIF-2 jouent un rôle important dans la vascularisation tumorale. Cependant leur effet est dépendant du temps et du contexte cellulaire. En effet, HIF-1 induit l'expression du VEGF pendant une hypoxie aigüe alors que HIF-2 régule l'expression du VEGF au cours d'une hypoxie prolongée (Holmquist-Mengelbier et al., 2006).

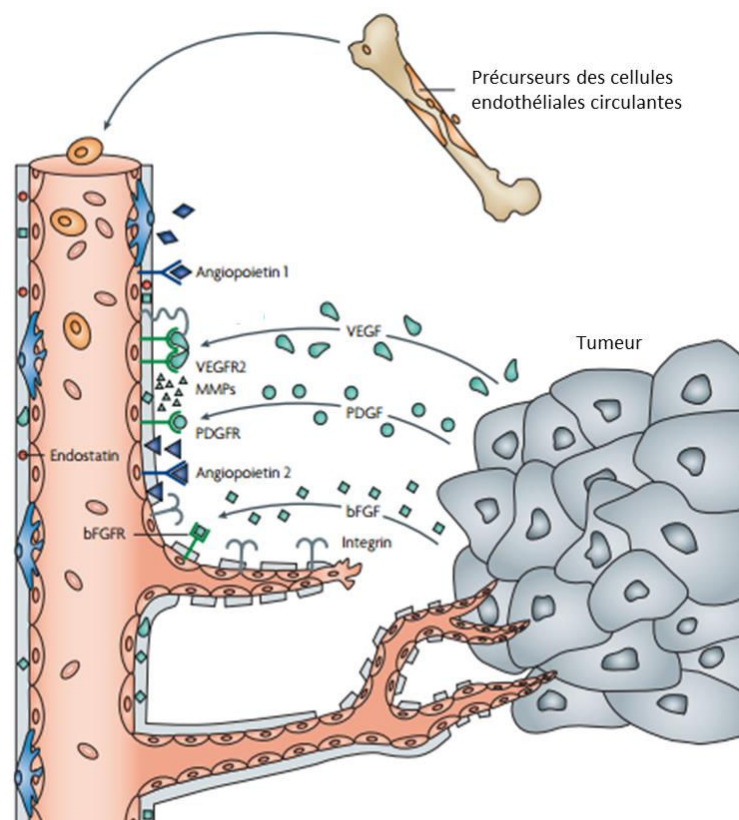


Figure 15 : Etapes importantes de l'angiogenèse tumorale.

L'angiopoïétine 1 se lie à son récepteur endothélial et aide au maintien des vaisseaux sanguins. Le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) est sécrété par les cellules tumorales et se lie à son récepteur (VEGFR2) présent sur les cellules endothéliales. Les métalloprotéines matricielles (MMPs) sont libérées par les cellules tumorales mais également par les cellules endothéliales après stimulation par le VEGF. L'angiopoïétine 2 se liant aux mêmes récepteurs que ceux de l'angiopoïétine 1, augmente la dégradation de la membrane basale vasculaire et la migration des cellules endothéliales, facilitant ainsi la formation de germes. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance fibroblastique (bFGF) sont sécrétés par les cellules tumorales. La progression du vaisseau en formation vers la tumeur est facilitée par l'expression des intégrines au niveau des cellules endothéliales (d'après Folkman, 2007).

e. Résistance aux traitements conventionnels

De nombreuses études cliniques ont associé l'hypoxie tumorale à un risque de rechute plus élevé, à un taux de survie globale plus faible et à une résistance aux traitements. Cette dernière peut être induite par l'hypoxie de deux manières : soit directement, par privation de molécule d'oxygène diminuant l'activité de certains agents anticancéreux. Soit indirectement, par la mise en place de mécanismes d'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie, par l'intermédiaire des facteurs HIFs.

L'implication de l'hypoxie dans la radiorésistance nuit grandement au traitement des cancers. En effet, l'efficacité de la radiothérapie repose sur la présence d'oxygène afin de créer des radicaux libres et d'induire des cassures à l'ADN (Kim et al., 2015; Stapleton et al., 2017). Sous hypoxie, la formation de ces radicaux libres est réduite entraînant par conséquent une inefficacité de la radiothérapie.

La résistance des cellules tumorales hypoxiques aux chimiothérapies peut s'expliquer de différentes façons :

- La distribution des agents anticancéreux est plus faible en raison de l'éloignement des cellules hypoxiques des vaisseaux sanguins et d'un transport sanguin par le réseau vasculaire intra-tumoral inefficace.
- A travers l'inhibition de gènes pro-apoptotiques (tels que Bax et Bid) et l'induction de gènes anti-apoptotiques (Survivin, Bcl-2, Bcl-xL...), l'hypoxie inhibe l'apoptose et induit la survie des cellules tumorales (Karakashev and Reginato, 2015).
- Cependant, l'hypoxie peut également induire l'apoptose en diminuant l'expression de Bcl-2 et en activant le gène TP53. Or, le gène TP53 étant muté dans un grand nombre de cellules tumorales, l'hypoxie induit une sélection de ces cellules induisant ainsi leur prolifération et leur survie (Semenza, 2000).
- Certains agents chimiothérapeutiques agissent lors de la phase de synthèse de l'ADN. Cependant, l'hypoxie induit un ralentissement du cycle cellulaire ainsi qu'un arrêt de la phase G1- S du cycle cellulaire conduisant à une diminution de l'efficacité de ces agents (Shannon et al., 2003).
- L'hypoxie augmente l'expression d'enzymes de réparation de l'ADN compromettant ainsi l'action d'agents chimiothérapeutiques tels que les agents alkylants et les composés de platine (Harris, 2002).

- L'efflux des agents chimiothérapeutiques en dehors de la cellule est augmenté par l'hypoxie. En effet, l'hypoxie induit l'expression du gène MDR1 codant une protéine transmembranaire, la p-glycoprotéine, associée à la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies (Doktorova et al., 2015; Karakashev and Reginato, 2015; Shannon et al., 2003).

B) Ciblage thérapeutique

L'hypoxie est reconnue comme étant un marqueur des tumeurs solides en augmentant l'agressivité tumorale, le risque de métastase et la résistance aux traitements, ce qui fait d'elle une cible thérapeutique attractive. Plusieurs approches pour cibler les cellules tumorales hypoxiques ont été proposées : l'utilisation de pro-médicaments activés par l'hypoxie, le ciblage spécifique de l'hypoxie ou encore le ciblage des voies de signalisation induites par l'hypoxie (Figure 16).

1- Ciblage du métabolisme hypoxique

L'hypoxie étant connue pour induire la glycolyse et augmenter l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme, de nouveaux inhibiteurs ciblant les voies métaboliques induites par l'hypoxie ont été développés afin de tuer les cellules tumorales hypoxiques et d'augmenter la sensibilité aux traitements chimiothérapeutiques standards ou aux thérapies ciblées.

Parmi ces inhibiteurs, on retrouve : (Karakashev and Reginato, 2015)

- WZB117 est une petite molécule qui inhibe le transporteur de glucose GLUT1. Son utilisation en association avec d'autres agents chimiothérapeutiques tels que le cisplatine ou le paclitaxel induit la mort des cellules cancéreuses de poumon de façon synergique in vitro et dans des modèles de xénogreffe.
- Phloretin est un autre inhibiteur de GLUT1 qui augmente les effets du daunorubicin en augmentant l'apoptose dans des lignées cellulaires de colon, de carcinome pulmonaire non à petites cellules et de carcinome rénal.
- FX11 est une molécule inhibitrice de la lactate déshydrogénase A (LDHA), enzyme qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate. FX11 induit un stress oxydatif et inhibe

la progression tumorale dans des xénogreffes de lymphome humain. Sa combinaison avec le paclitaxel induit une régression tumorale dans les xénogreffes de cancer du sein triple négatif résistant au paclitaxel.

- Dichloroacétate est un puissant inhibiteur de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK). Cette enzyme inhibe l'action de la pyruvate déshydrogénase (PDH) responsable de la conversion du pyruvate en acétyl-coenzyme A. Le dichloroacétate induit l'apoptose dans une variété de modèles précliniques et des essais cliniques sont en cours dans des tumeurs cérébrales et de la tête et du cou.

2- Ciblage des facteurs HIFs

Depuis la découverte du facteur HIF-1 comme acteur majeur de la réponse cellulaire à l'hypoxie, de multiples tentatives de développer un inhibiteur spécifique de HIF-1 ont échoué. Cependant, de nombreux composés affectent l'activité des facteurs HIFs à travers différents mécanismes.

a. Composés modulant l'activité transcriptionnelle de HIF- α

Pour initier la transcription de ses gènes cibles, les facteurs HIF- α recrutent l'activateur transcriptionnel p300/CBP. Chetomin est un puissant perturbateur de la liaison entre HIF-1 α ou HIF-2 α et p300 en rompant les sites de liaison au zinc du domaine CH1 de p300 (Wigerup et al., 2016). Cet inhibiteur présente une activité anti-tumorale dans des modèles précliniques du cancer de la prostate (Karakashev and Reginato, 2015).

La liaison de HIF-1 aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) est nécessaire pour l'activité transcriptionnelle. L'inhibiteur echinomycin se lie au HIF-1 pour empêcher sa liaison aux HREs et induit l'apoptose dans des lignées cellulaires de gliome et de cancer du sein (Karakashev and Reginato, 2015). Cependant, bien que son efficacité a été démontrée in vitro et in vivo, les essais cliniques ont été un échec à cause d'effets secondaires trop importants.

b. Composés modulant l'expression de HIF- α

La traduction de l'ARNm HIF- α est contrôlée par la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Ainsi, le ciblage de cette voie permet de moduler l'activité de HIF. En effet, l'inhibition de

mTOR diminue les niveaux d'expression de HIF-1 α et HIF-2 α sous normoxie et hypoxie. De plus, un nouveau groupe d'inhibiteurs de HIF-1 appelé glyceollins peuvent bloquer la traduction de HIF-1 α en inhibant la voie PI3K/mTOR sous hypoxie (Wigerup et al., 2016). Il en est de même pour l'inhibiteur BEZ235, un autre inhibiteur de la voie PI3K/mTOR, qui diminue la synthèse protéique de HIF-1 α dans des lignées cellulaires de glioblastome et de carcinome de la tête et du cou à cellules squameuses (Karakashev and Reginato, 2015).

EZN-2968 est un oligonucléotide antisens synthétique complémentaire de la séquence codante de l'ARNm de HIF-1 α . Il se lie à l'ARNm de HIF-1 α et induit sa dégradation in vitro et in vivo. De plus, EZN-2968 diminue les niveaux de HIF-1 dans des modèles animaux et chez des patients atteints de carcinomes mammaires ou du colon (Karakashev and Reginato, 2015).

Topotecan est un inhibiteur de l'activité de la topoisomérase de type I, approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) (Wigerup et al., 2016). Cet analogue naturel de l'alcaloïde cytotoxique, camptothécine, inhibe l'activité et la traduction de HIF-1 α in vivo dans des lignées cellulaires de gliome. De plus, il est utilisé en essais cliniques pour le traitement du cancer du poumon à petites cellules et du cancer de l'ovaire (Karakashev and Reginato, 2015).

2-méthoxyestradiol (2ME2) réduit la traduction de HIF-1 α induisant une inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogenèse. De plus, il dérégule également HIF-2 α dans des cellules de carcinome hépatocellulaire. L'efficacité du 2ME2 a été évaluée dans de nombreuses études de phases I et II chez des patients atteints de myélomes multiples et des cancers du sein, de la prostate et de l'ovaire (Wigerup et al., 2016; Karakashev and Reginato, 2015).

Les inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC) tels que vorinostat, romidepsin, panobinostat et belinostat, approuvés par la FDA dans de nombreux cancers, induisent une dégradation du facteur HIF-1 α mais leurs mécanismes d'action restent encore à être confirmés. De plus, la déacétylation de HIF-2 α par SIRT1 augmente son activité transcriptionnelle alors que celle de HIF-1 α résulte en une répression transcriptionnelle. Ce qui suggère que les inhibiteurs HDACs ont des effets directs mais controversés selon la sous-unité HIF- α (Wigerup et al., 2016).

PX-478 est un dérivé de l'agent alkylant melphalan. Cet agent cytotoxique est utilisé pour le traitement des myélomes multiples et les cancers ovariens. PX-478 inhibe HIF-1 α en inhibant sa traduction et en induisant sa dégradation protéique de manière indépendante à l'O₂, à p53 et au pVHL. De plus, son activité anti-tumorale a été démontrée dans plusieurs modèles de xénogreffes (Wigerup et al., 2016).

c. Composés affectant la stabilité protéique de HIF- α

Afin de garantir sa stabilité, la protéine HIF-1 recrute la molécule chaperone Hsp90. Ainsi, Geldanamycin, un inhibiteur de Hsp90, a été mis en évidence pour entraîner l'ubiquitination et la dégradation protéosomale de HIF-1 α , de façon indépendante de pVHL, dans des lignées cellulaires cancéreuses de prostate et de carcinomes rénaux (Wigerup et al., 2016; Karakashev and Reginato, 2015). De même, un analogue de la geldanamycin, 17-AAG (tanespimycin), semble efficace dans des essais cliniques de phase II en combinaison avec du sorafenib (un inhibiteur de Raf kinase) contre des tumeurs rénales mutées pVHL ou en combinaison avec du trastuzumab contre les cancers du sein métastatiques ERBB2 positifs (Wigerup et al., 2016;Karakashev and Reginato, 2015).

Les domaines PAS des facteurs HIF- α et la sous unité HIF-1 β forme le complexe d'assemblage HIF, cependant, il existe des petites molécules ciblant ces domaines et inhibant les interactions protéine-protéine (Wigerup et al., 2016). Parmi ces molécules, on retrouve Acrifavine, un puissant inhibiteur de la dimérisation entre HIF- α et HIF-1 β en se liant directement au domaine PAS-B de HIF-1 α et HIF-2 α . Cet inhibiteur réduit la croissance tumorale et la vascularisation dans des modèles de xélogreffes hépatocellulaires et de prostate.

3- Développement de pro-médicaments activés par l'hypoxie

Un pro-médicament est un composé inactif qui peut, spontanément ou par une voie métabolique spécifique, être converti en composé pharmacologiquement actif. Ces composés sont activés par des oxydoréductases cellulaires. Certains pro-médicaments sont activés dans les tissus hypoxiques permettant de tuer spécifiquement les cellules tumorales hypoxiques mais également les cellules tumorales non hypoxiques alentour par l'intermédiaire de l'effet « bystander ». Ce processus est habituellement inhibé en présence d'oxygène faisant de ces composés une spécificité aux cellules hypoxiques.

Parmi ces pro-médicaments, on retrouve (Wigerup et al., 2016; Karakashev and Reginato, 2015) :

- Tirapazamine est un composé bio-réducteur de la classe des N-oxides, 300 fois plus toxique sous hypoxie qu'en normoxie. Cependant, son utilisation en clinique est limitée dû à une faible pénétration dans les tissus faiblement vascularisés et à sa toxicité.

- SN30000, un analogue au tirapazamine, possède de meilleures propriétés pharmacodynamique et pharmacocinétique avec un effet anti-tumoral plus important dans des modèles de xénogreffes. Cependant, il est difficile de mettre en place des essais cliniques dû au manque de biomarqueurs prédictifs pour l'efficacité de ces composés, sécrétés par la tumeur présente chez le patient. Récemment, la P450 oxydoréductase a été identifiée comme un biomarqueur de sensibilité aux pro-médicaments.
- PR-104 est un composé nitro-aromatique, utilisé dans un essai clinique de phase II prometteur contre des carcinomes pulmonaires non à petites cellules, menant à un essai de phase III.
- TH-302 est utilisé dans des essais cliniques de phase II en combinaison avec la gemcitabine contre le cancer du pancréas ou en association avec la doxorubicine contre des sarcomes des tissus mous.
- Apaziquone (E09) est une quinone efficace dans une variété de cancers tels que les cancers de la tête et du cou, du sein et de la vessie. Cependant, les essais cliniques n'ont pas été prometteurs dû à une faible pharmacocinétique empêchant le pro-médicament de pénétrer au sein de la tumeur et qui ainsi est rapidement dégradé.

4- Ciblage des voies activées par l'hypoxie

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) jouent un rôle important dans la tumorigenèse. L'activation des RTK induit une signalisation qui promeut la progression tumorale en favorisant la résistance aux thérapies anti-cancéreuses. De plus, l'expression de multiples RTK et de leur ligand, est augmentée lors de l'hypoxie (Karakashev and Reginato, 2015).

- Kinase c-MET : est un RTK oncogénique qui joue un rôle important dans l'embryogenèse, l'invasion et la survie tumorale. PHA665752, une petite molécule sélective inhibitrice de MET, induit une radio-sensibilisation de cellules cancéreuses gastriques. Ce composé est également capable d'empêcher l'invasion tumorale induite par l'hypoxie dans des cellules cancéreuses de poumon non à petites cellules.
- Kinase AXL : est un autre membre de la famille MET kinase qui participe à la résistance induite par l'hypoxie dans des cellules cancéreuses de prostate. L'inhibition d'AXL diminue la tumorigenèse dans des cellules cancéreuses de sein in vitro et in vivo. Au niveau clinique, BGB324, un inhibiteur d'AXL, a une faible toxicité lors des essais

cliniques de phase I et une étude en phase II est en cours dans des carcinomes pulmonaires non à petites cellules.

La régulation du facteur VEGF-A est augmentée par l'hypoxie dans de nombreuses cellules cancéreuses in vitro et in vivo. La découverte du VEGF-A comme le premier facteur tumoral angiogénique a permis de développer des composés qui ciblent le VEGF ou ses récepteurs. Le bevacizumab et le ranibizumab sont deux anticorps ciblant le VEGF-A utilisés dans les thérapies angiogéniques. Ces composés inhibent l'angiogenèse tumorale et diminuent la progression tumorale dans des modèles animaux. Malheureusement, les essais cliniques sont moins impressionnants. Initialement, quelques patients répondent bien au traitement et la tumeur primaire régresse, mais avec le temps, les tumeurs deviennent résistantes et dans de nombreux cas, deviennent plus agressives en augmentant les métastases (Karakashev and Reginato, 2015).

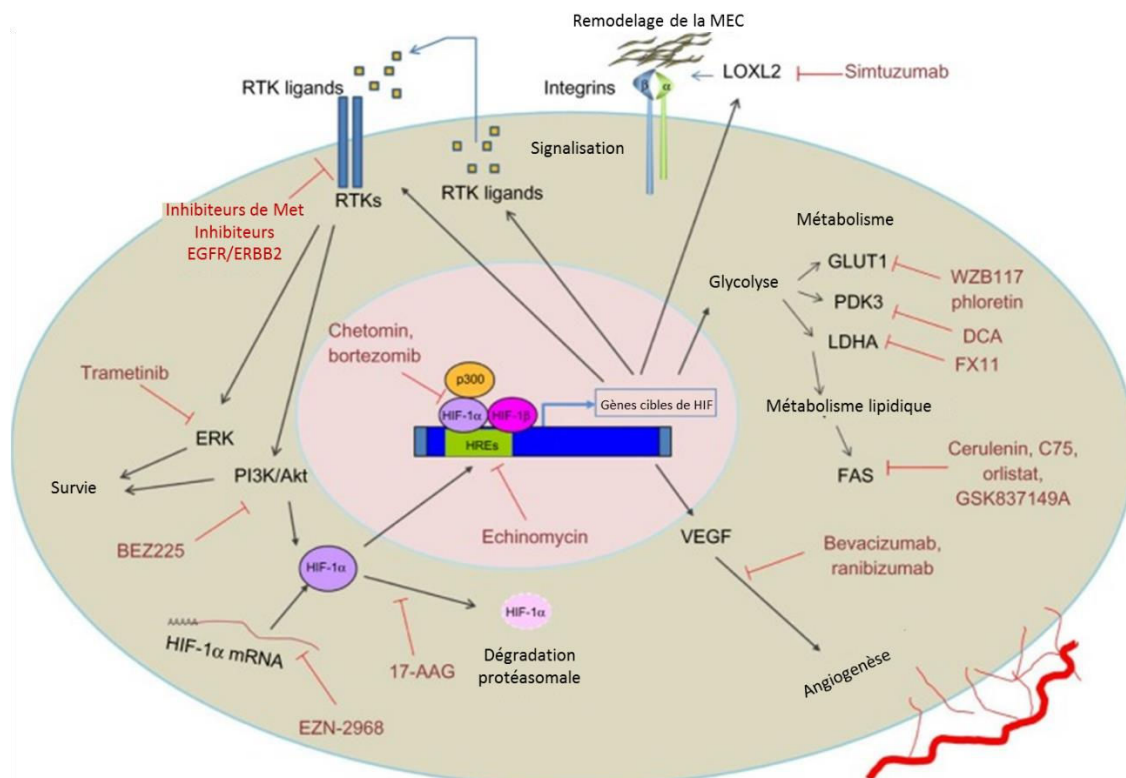


Figure 16 : Stratégies pour cibler les cellules cancéreuses hypoxiques dans les tumeurs solides.

De multiples voies peuvent être ciblées pour sensibiliser les cellules hypoxiques aux traitements anticancéreux telles que l'angiogenèse, le métabolisme, la prolifération, la survie, le remodelage de la matrice-extracellulaire, l'invasion (d'après Karakashev and Reginato, 2015).

C) Rôle de l'hypoxie dans les chondrosarcomes

Les facteurs HIFs jouent un rôle central dans la réponse à l'hypoxie. En effet, ils peuvent réguler l'expression d'une centaine de gènes impliqués dans la biologie tumorale. De cette façon, les cellules tumorales peuvent activer des réponses adaptatives afin de survivre au microenvironnement tumoral hypoxique. L'expression de HIF- α contribue à la progression de la tumeur dans le but de maintenir le métabolisme énergétique et de promouvoir l'invasion et la migration des cellules tumorales.

Bien que les chondrosarcomes soient des tumeurs faiblement vascularisées, très peu d'études ont été menées sur l'effet de l'hypoxie dans les chondrosarcomes (seulement 32 articles sont référencés sur PubMed). Au vu de la littérature, deux approches ont été menées pour étudier le rôle de l'hypoxie et des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α dans la progression tumorale des chondrosarcomes : l'étude histologique des facteurs HIFs et le ciblage thérapeutique de l'angiogenèse.

1- Etude histologique des facteurs HIFs

De nombreuses études ont confirmé que l'expression de HIF-1 α est corrélée à un faible pronostic dans divers cancers notamment gastrique, pulmonaire et œsophagien. Cependant, le rôle des facteurs HIFs au sein des chondrosarcomes n'est pas encore bien défini.

Dans les tumeurs cartilagineuses, le facteur HIF-1 est détecté dans tous les grades de chondrosarcomes mais pas dans les tumeurs bénignes (enchondromes) et son expression augmente avec le grade de la tumeur (Chen et al., 2011a; Boeuf et al., 2010; Kubo et al., 2008). De même, l'expression de HIF-2 est également plus importante dans les chondrosarcomes que dans les enchondromes (Kubo et al., 2008) et son expression augmente avec le grade tumoral (Chen et al., 2011b).

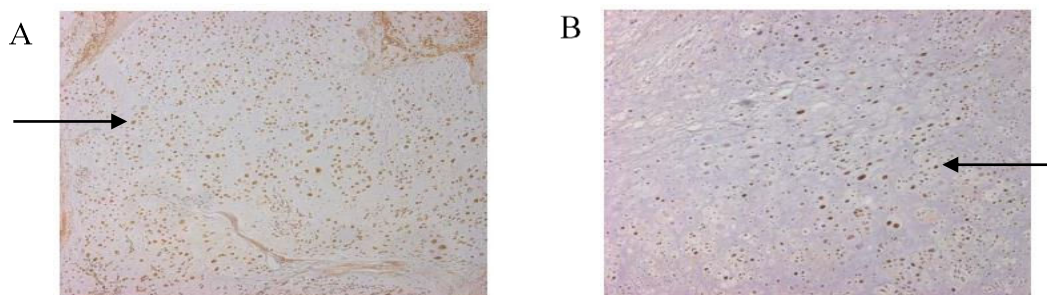


Figure 17 : Représentation d'une coupe immunohistochimique d'un chondrosarcome de grade III du tibia proximal.

Immunohistochimie (A) du facteur inductible à l'hypoxie HIF-1 α et (B) du facteur HIF-2 α . Les tissus avec une forte coloration montrent une coloration nucléaire brun foncé de HIF-1 α et HIF-2 α de manière diffuse (x100) (d'après Kubo et al., 2008).

Sous hypoxie, les cellules tumorales développent une variété de stratégies pour échapper à l'apoptose, dont le blocage de la translocation de Bax et l'induction de gènes anti-apoptotiques tels que IAP2 et Bcl-xL. Au sein des chondrosarcomes, un haut niveau de HIF-1 α est associé à une expression élevée de Bcl-xL et à la diminution de l'apoptose. Ces résultats suggèrent que le facteur HIF-1 α a un rôle dans l'échappement à l'apoptose et dans la pathogénèse du chondrosarcome (Chen et al., 2011a).

Le comportement biologique des chondrosarcomes est lié à la composition de la matrice tumorale et à son modèle de vascularisation suggérant ainsi un rôle important du processus angiogénique et du remodelage de la matrice durant le développement et la progression de ces tumeurs osseuses. Il a été mis en évidence que les chondrosarcomes de haut grade expriment fortement les protéines MMP-2 et Galectin-1 en réponse à l'hypoxie (Boeuf et al., 2010). MMP-2 intervient dans le remodelage de la matrice extracellulaire et l'angiogenèse tumorale. Galectin-1, quant à elle, est une molécule contribuant à la progression tumorale par de multiples processus tels que la prolifération, l'adhésion, et la mobilité cellulaire (Boeuf et al., 2010). De plus, l'expression de HIF-1 α dans les chondrosarcomes est liée à l'augmentation du facteur angiogénique, VEGF (Lin et al., 2004).

Beclin-1 est un médiateur clé de l'autophagie. La diminution de son expression est associée à un défaut de l'autophagie dans les carcinomes hépatocellulaires (Ding et al., 2008) suggérant un rôle de Beclin-1 dans la tumorigénèse et la progression tumorale. Au sein des

chondrosarcomes, le niveau élevé de facteur HIF-2 α associé à une faible expression de Beclin-1 joue un rôle dans la pathogénicité des chondrosarcomes (Chen et al., 2011b).

Bien que des études aient mis en évidence le rôle des facteurs HIF- α dans la progression tumorale des chondrosarcomes, leur utilisation comme facteur prédictif de mauvais pronostic reste encore à être confirmé. C'est pourquoi, Li et col ont mené une méta-analyse des différentes études publiées afin d'évaluer l'utilisation du facteur HIF-1 α comme un outil de prédiction au mauvais pronostic dans les sarcomes des os. Ils ont mis en évidence que l'expression de HIF-1 α et le grade histologique de la tumeur sont associés à une faible survie globale et à une faible survie sans maladie. Ainsi, l'expression de HIF-1 α peut être un facteur prédictif de mauvais pronostic dans les tumeurs osseuses incluant les chondrosarcomes (Li et al., 2016).

2- Ciblage thérapeutique de l'angiogenèse

Du fait de la présence d'une microvascularisation plus importante dans les chondrosarcomes de grade II et III ainsi que de la régulation de l'expression du facteur angiogénique VEGF par le facteur HIF-1 α , la majorité des études sur le chondrosarcome se sont intéressées au ciblage de l'angiogenèse afin de bloquer la progression tumorale en inhibant la croissance cellulaire et le comportement métastatique.

Bien que l'angiogenèse soit largement régulée par les facteurs HIF-1 α et VEGF, des chimiokines et leurs récepteurs peuvent être impliqués dans l'invasion, l'angiogenèse et la formation de métastases. Parmi ces chimiokines, CXCR4 (chemokine receptor four) et son ligand SDF1 (stromal cell derived factor one) favorisent la formation de métastases en augmentant la prolifération, la migration et l'angiogenèse des cellules tumorales.

Au sein des chondrosarcomes, le facteur HIF-1 α augmente l'expression du VEGF de façon directe mais également de façon indirecte en augmentant l'expression et la signalisation de CXCR4/SDF1 (Sun et al., 2013). De plus, le facteur HIF-1 α favorise le phénotype invasif en augmentant l'expression de MMP-1 (métalloprotéase la plus abondante dans les chondrosarcomes) également par induction de l'expression de CXCR4 (Sun et al., 2010). De plus, l'utilisation d'un siRNA dirigé contre CXCR4 ou d'un inhibiteur pharmacologique de CXCR4, AMD3100, induit une inhibition de l'angiogenèse en diminuant l'expression du VEGF et la microvascularisation des tumeurs de chondrosarcome et inhibe l'invasion cellulaire par diminution de l'expression de MMP-1 (Sun et al., 2013, Sun et al., 2010).

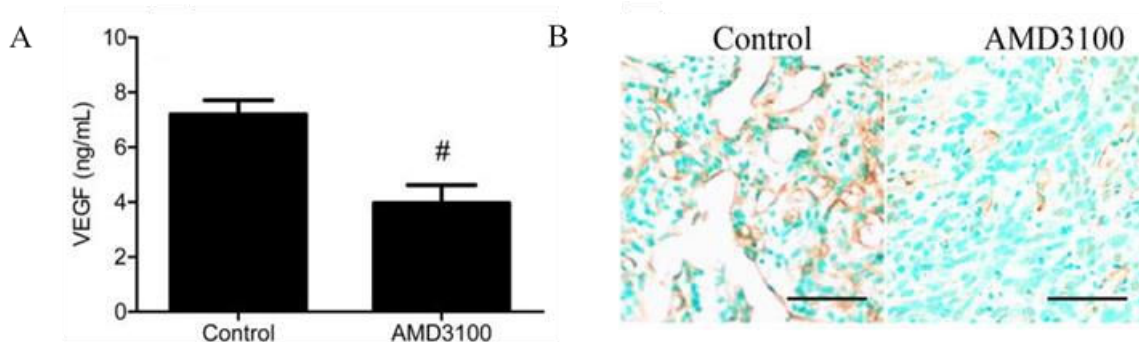


Figure 18 : L'inhibiteur de CXCR4, AMD3100, diminue l'angiogenèse dans des xénogreffes de la lignée de chondrosarcome JJ.

(A) Expression du VEGF dans les lysats de xénogreffes après 4 semaines de traitement au AMD3100. (B) Analyse immunohistochimique des micro-vaisseaux par marquage du CD31 dans les tumeurs après traitement au AMD3100 (x200), bar=100 μ M (d'après Sun et al., 2013).

Les miRNA sont de courts ARNs endogènes, non codants de 18 à 22 nucléotides qui se lient à la région 3'UTR de l'ARNm correspondant par complémentarité de bases, induisant la dégradation ou l'inhibition de la traduction. Les miRNA peuvent être des régulateurs majeurs du phénotype malin; dans ce cas, on parle d'oncomirs. Ainsi, l'identification de miRNA surexprimés dans les chondrosarcomes, particulièrement ceux impliqués dans l'angiogenèse, est importante et peut fournir une cible thérapeutique en développant des « antagomirs ».

Les chondrosarcomes de haut grade sur-expriment un puissant miRNA, miR-181a. Son expression est augmentée par l'hypoxie et il induit l'expression du VEGF (Sun et al., 2015a). Une cible de cet oncomir est la protéine RGS16 (regulator of G-protein signaling 16), un régulateur négatif de CXCR4 (Sun et al., 2015b).

L'inhibition de miR-181a par un antagomir anti-miR-181a induit une diminution du VEGF, de l'activité de MMP-1, de la croissance tumorale et de la formation de métastases pulmonaires dans des modèles de xénogreffes de chondrosarcome et restaure l'expression de RGS16 (Sun et al., 2015b).

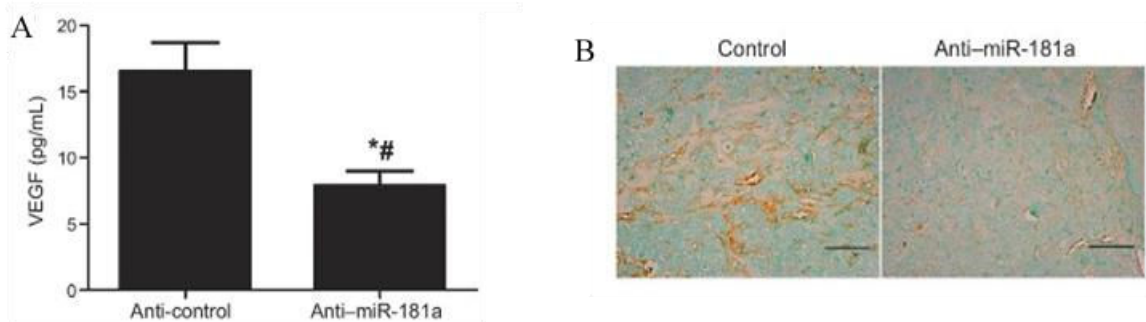


Figure 19 : L’antagomir anti-miR-181a inhibe l’angiogenèse des chondrosarcomes in vivo. (A) Expression du VEGF dans les lysats de xéno greffes. (B) Analyse immunohistochimique de l’angiogenèse par marquage du CD34, bar=100μM (d’après Sun et al., 2015b).

L’adiponectine est une hormone sécrétée par les adipocytes différenciés et dont l’expression est corrélée avec le grade de la tumeur de chondrosarcome. L’adiponectine augmente l’expression du VEGF et induit la formation de métastases dans les cellules de chondrosarcome humain à travers une cascade de signalisation impliquant HIF-1 α , mTOR, PI3K, Akt et le récepteur d’adiponectine (AdipoR) (Lee et al., 2015). L’utilisation d’un shRNA contre l’adiponectine entraîne une inhibition de l’angiogenèse par diminution de l’expression du VEGF et de la néovascularisation des chondrosarcomes in vivo (Lee et al., 2015).

III) Approches thérapeutiques contre les chondrosarcomes

A) Nouvelles options de traitement des chondrosarcomes

Depuis quelques années, l'identification des voies de signalisation dans les chondrosarcomes et des études précliniques ont mené à l'identification de cibles potentielles pour des essais cliniques (Tableau III).

1- Inhibition des voies de survie

La régulation de la voie PI3K/Akt est souvent augmentée dans les cancers et peut inhiber l'apoptose et induire la prolifération cellulaire. Au sein des chondrosarcomes, la voie PI3K/Akt est activée. Un essai clinique de phase I a été mené chez 10 patients présentant un chondrosarcome. La combinaison du perifosine, un inhibiteur du recrutement membranaire d'Akt, avec du gemcitabine a permis de diminuer la taille de la tumeur de 17% uniquement chez un patient (van Oosterwijk et al., 2013).

mTOR est un point de convergence de plusieurs voies impliquées dans la synthèse protéique et la prolifération cellulaire. Un essai clinique comprenant 10 patients atteints de chondrosarcomes non résecables traités avec du sirolimus, un inhibiteur allostérique de la voie mTOR, et du cyclophosphamide a montré un taux de contrôle de la maladie de 70% (Bernstein-Molho et al., 2012). De plus, un essai clinique de phase I/II a été mené afin de tester la capacité du temsirolimus, un autre inhibiteur de la voie mTOR, à potentialiser l'effet cytotoxique de la doxorubicine liposomale chez des patients atteints de chondrosarcome (Thornton et al., 2013).

La signalisation Src peut également induire l'expression de HIF-1 α et favoriser la survie cellulaire. Dans les chondrosarcomes, la signalisation de Src est augmentée et son inhibition par un inhibiteur tyrosine kinase, le dasatinib, induit la diminution de la prolifération cellulaire (Schrage et al., 2009). Cependant, dans un essai de phase II, aucune réponse n'a été obtenue après un traitement au dasatinib chez des patients atteints de chondrosarcome (van Oosterwijk et al., 2013).

2- Inhibition de la voie de développement Hedgehog

La signalisation hedgehog est active dans les chondrosarcomes centraux. Cette voie est un événement précoce dans la formation et la progression tumorale soulevant la possibilité que le ciblage thérapeutique des voies de signalisation hedgehog puisse être utilisé pour induire les cellules à un état plus différencié et moins agressif (Bovée et al., 2010).

Un essai clinique de phase II randomisé utilisant de l'IPI-926, un puissant analogue de la cyclopamine, un inhibiteur de la voie hedgehog, chez des patients présentant un chondrosarcome métastatique ou localement avancé a été arrêté par manque d'efficacité (van Oosterwijk et al., 2013). Un deuxième essai a été mené avec du vismodegib (GDC-0449), un inhibiteur compétitif à la cyclopamine, et a montré une certaine efficacité dans un sous-groupe de chondrosarcomes conventionnels de grade I ou II (Italiano et al., 2013).

3- Ciblage des voies de l'apoptose

Les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xL) sont augmentées dans les chondrosarcomes. Une autre protéine anti-apoptotique non apparentée à la famille Bcl-2, la survivine y est également fortement exprimée. Ces données indiquent un mécanisme de défense efficace dans lequel les cellules de chondrosarcome préviennent la mort cellulaire programmée en réponse à des signaux de stress tels que des dommages à l'ADN.

Lors d'un essai de phase I, un patient atteint d'un chondrosarcome présente une rémission complète avec un traitement au dulanermin (rhApo2L/TRAIL), un antagoniste des récepteur de mort 4 (DR4) et 5 (DR5) (Subbiah et al., 2012). L'apomab (PRO95780), un anticorps monoclonal dirigé contre DR5, réduit de 20% la maladie chez un patient atteint d'un chondrosarcome (Camidge, 2008) mais n'a aucune efficacité lors d'un essai de phase II.

Le résultat prometteur du dulanermin montre que la restauration de la machinerie apoptotique peut avoir un fort potentiel thérapeutique dans les chondrosarcomes. Cependant, du fait que les chondrosarcomes expriment fortement les protéines anti-apoptotiques, une approche multi-ciblée devrait être plus efficace.

Tableau III : Récapitulatif des différentes cibles contre les chondrosarcomes et des stratégies thérapeutiques au cours d'essais cliniques dans les chondrosarcomes (adapté de van Oosterwijk et al., 2013) .

Cible	Médicament	Mécanisme d'action	Identifiant essai clinique
PI3K/Akt	Perifosine	Inhibition du recrutement membranaire d'Akt	NCT00401388
mTOR	Sirolimus	Inhibition de la voie mTOR	
Src	Dasatinib	Inhibiteur de petite molécule kinase	NCT00464620
PDGF	Sunitinib	Inhibiteur de récepteur tyrosine kinase multi-cible	NCT00474994
	Imatinib Pazopanib	Inhibiteur compétitif tyrosine kinase Bloque l'autophosphorylation des récepteurs PDFG, VEGF, FGF-1, FGF-3	NCT01330966
Hedgehog	Saridegib (IPI-926)	Inhibition de la voie hedgehog	NCT01609179
	Vismodegib	Inhibition de la voie hedgehog	NCT01267955
Apoptose	Dulanermin rhAPO2L/TRAIL	Inhibition de l'apoptose par liaison aux récepteurs DR4 et DR5	
	PRO95780 Apomab	Anticorps monoclonal IgG1 qui déclenche la voie extrinsèque de l'apoptose via le récepteur DR5	NCT00543712
VEGF	Regorafenib	Inhibiteur de la tyrosine kinase des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3	NCT02389244
	Pazopanib	Inhibiteur de la tyrosine kinase des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3	NCT01330966 NCT02066285

De plus, des essais cliniques dirigés contre les gènes IDH1 et IDH2 et l'angiogenèse sont en cours de recrutement de patients atteints de chondrosarcome. En effet, l'inhibiteur oral d'IDH2, AG-221, est actuellement testé dans un essai multicentrique de phase I et II chez des patients atteints d'un chondrosarcome avec une mutation IDH2 (NCT02273739) et les inhibiteurs IDH, AG-881 et AG-120, sont également en cours d'essai clinique de phase I dans des chondrosarcomes avec une mutation IDH1 et/ou IDH2 (NCT02481154 / NCT02073994). Les inhibiteurs sélectifs des récepteurs tyrosine kinase multi-ciblés, pazopanib et regorafenib, inhibent, entre autres, le récepteur du VEGF. Le pazopanib est actuellement en cours d'essai de phase II chez des patients atteints de chondrosarcomes incurables ou métastatiques (NCT01330966) et de chondrosarcomes myxoïdes extra-squelettiques (NCT02066285). Le regorafenib est testé dans un essai clinique de phase II dans des chondrosarcomes intermédiaires ou de haut grade (NCT02389244) (Polychronidou et al., 2017).

B) L'épigénétique et la méthylation de H3K27

Bien que des études cliniques aient été menées sur les chondrosarcomes, l'efficacité des différentes drogues n'a pu être démontrée, et à ce jour, l'unique traitement contre les chondrosarcomes est la résection chirurgicale de la tumeur. Depuis les années 2000, une nouvelle notion a émergé, l'épigénétique, correspondant à l'ensemble des modifications de l'expression des gènes, transmissibles et réversibles, ne résultant pas d'un changement nucléotidique. L'épigénétique est une notion en pleine émergence, indispensable au contrôle des processus cellulaires tels que la différenciation, la régulation des gènes et le développement. Elle peut également intervenir dans la carcinogenèse notamment lors de l'hyperméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3) entraînant une compaction importante de l'ADN et une diminution de l'expression des gènes associés. Ainsi, l'étude des acteurs de la modification épigénétique pourrait mener au développement d'une thérapie épigénétique contre les chondrosarcomes.

1- La régulation épigénétique

Le terme épigénétique est défini par tous les changements héréditaires, méiotiques et mitotiques, de l'expression des gènes qui ne sont pas codés dans la séquence d'ADN elle-même (Egger et al., 2004). Le processus épigénétique fait appel à des composants interconnectés et dépendant les uns des autres qui induisent des changements dans l'expression des gènes :

- Les modifications post-traductionnelles de la queue des histones
- La méthylation de l'ADN
- Les ARNs non-codants et le réseau de miARNs

a. La modification des histones

Les histones sont des petites protéines, riches en acides aminés basiques, responsables de la modulation de l'ADN. elles forment un complexe octamérique autour duquel s'enroule le brin d'ADN pour former le nucléosome, unité de base du matériel génétique (Li, 2002). Il existe 5 familles d'histones : H1, H2A, H2B, H3 et H4. L'extrémité amino-terminale de la queue des histones subit des modifications post-traductionnelles dont les plus étudiées sont la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation (Figure 20). Ces

modifications modulent l'expression des gènes soit directement soit par recrutement de complexes protéique ou enzymatique (Bannister and Kouzarides, 2011).

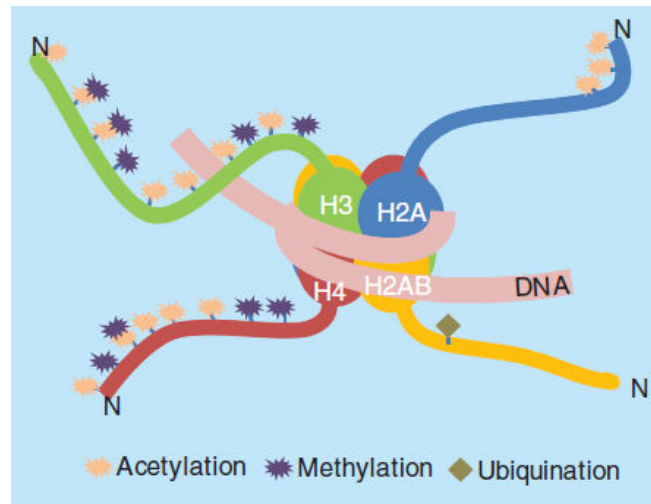


Figure 20 : Organisation du nucléosome.

L'ADN double brin s'enroule autour du noyau central de 8 protéines d'histone (octamère comprenant : 2 H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 H4) pour former le nucléosome. L'extrémité N-terminale de la queue des histones peut subir des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation ou la phosphorylation (d'après Baugé et al., 2014).

Les modifications post-traductionnelles des histones sont responsables du remodelage de la chromatine modifiant l'enroulement de l'ADN selon le code des histones. On distingue deux états de la chromatine : l'hétérochromatine correspond à une chromatine condensée où l'accès aux gènes par les facteurs de transcription est impossible et les gènes sont faiblement exprimés. L'euchromatine correspond à une chromatine ouverte permettant une expression des gènes (Baugé et al., 2014).

b. Méthylation et déméthylation des histones

La méthylation des histones est une marque épigénétique activement étudiée. Elle se produit sur tous les résidus basiques : arginine, lysine et histidine. Les arginines peuvent être monométhylées (me1) et diméthylées symétriquement (me2s) ou asymétriquement (me2a). Les

sites de méthylation de l'arginine sont H3R2, H3R8, H3R17, H3R26 et H4R3. Les lysines peuvent être soit mono-, di- (me2), ou tri- (me3) méthylées (Greer and Shi, 2012). La méthylation des histones se produit principalement sur l'histone H3 au niveau des lysines (K) 4, 9, 14, 18, 23, 27, 36 et 79 et sur la lysine 20 de l'histone H4 (Baugé et al., 2014). La monométhylation des histidines est quant à elle, plus rare. De plus, d'autres résidus basiques peuvent être méthylés sur les histones H1, H2A, H2B, H3 et H4 (Greer and Shi, 2012).

Contrairement à l'acétylation et à la phosphorylation, la méthylation des histones ne modifie pas la charge de la protéine et module la structure de la chromatine en permettant le recrutement de protéines ayant la capacité de faciliter l'activation ou la répression transcriptionnelle (Black et al., 2012; Bannister and Kouzarides, 2011) (Tableau IV). Ainsi, les histones H3K4, H3K36 et H3K79 sont associés à l'activation transcriptionnelle alors que les histones H3K9 et H3K27 sont associés à la répression transcriptionnelle (Black et al., 2012; Berger, 2007).

Tableau IV : Principales modifications des histones et leurs effets sur l'expression des gènes (d'après Baugé et al., 2014).

Code des histones	Methylation			Acetylation	Ubiquitination
	Monomethylation	Dimethylation	Trimethylation		
H2AK119	-	-	-	-	Repression
H2BK5	Activation	-	Repression	-	-
H3K4	Repression	Repression	Activation	-	-
H3K9	Activation	Repression	Repression	Activation	-
H3K14	-	-	-	Activation	-
H3K18	-	-	-	Activation	-
H3K27	Activation	Repression	Repression	Activation	-
H3K36	Repression	Activation	Activation	-	-
H3K56	-	-	-	Activation	-
H3K79	Activation	Activation	Activation, repression	-	-
H4K12	-	-	-	Activation	-
H4K20	Activation	-	Repression	-	-

La découverte en 2004 de l'histone H3K4 déméthylase, appelée LSD1 (lysine specific demethylase 1 ou KDM1A), a permis de mettre en évidence que la méthylation des histones est un évènement réversible. Il existe actuellement plus de 60 lysine-méthyltransférases et 30 lysine-déméthylases prédites dans le génome humain (Baugé et al., 2014; Greer and Shi, 2012).

Les histone méthyltransférases comportent trois familles d'enzymes permettant l'ajout d'un groupement méthyl à partir d'un donneur, la S-adenosyl méthionine (SAM) (Black et al., 2012). Les lysines sont méthylées par des protéines à domaine SET et par les protéines Dot1 like. La famille des PRMT, quant à elle, méthyle les arginines (Greer and Shi, 2012). Les histone méthyltransférases sont importantes pour le développement embryonnaire mais leur dysfonctionnement est lié à l'agressivité des cancers. En particulier, le répresseur transcriptionnel EZH2 (enhancer of zeste homologue 2), une méthylase de H3K27, est surexprimée dans de nombreux types de cancer et pourrait être un marqueur moléculaire de la progression tumorale et métastatique (Baugé et al., 2014).

Deux familles d'histone déméthylase sont responsables de la déméthylation des histones : LSD1, responsable de l'élimination directe de groupements mono- et di-méthylés sur les lysines 4 et 9 de l'histone 3 (H3K4 et H3K9) et Jumonji C (JmjC), qui enlève les trois groupements mono-, di- ou tri-méthyl (Burchfield et al., 2015). Cependant, la surexpression, l'amplification ou les interactions de plusieurs histone déméthylases sont associées à de nombreux types de tumeurs, permettant ainsi l'utilisation de ces enzymes comme outil de diagnostic ou de cibles thérapeutiques (Lim et al., 2010).

2- Triméthylation de l'histone H3K27 et ses régulateurs

a. La marque H3K27

Les di- et tri-méthylations de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me2 et H3K27me3) sont effectuées par le complexe polycomb PRC2 (polycomb repressive complex 2) comprenant une sous-unité catalytique EZH2, ou son homologue fonctionnel EZH1 et des protéines accessoires EDD (embryonic ectoderm development), SUZ12 (suppressor of zeste 12 homolog) et RbAp48 (Chen and Zhu, 2016; Ezponda and Licht, 2014) (Figure 21). Cette modification épigénétique dans les régions promotrices des gènes est associée à la répression génique (Ezponda and Licht, 2014). De plus, les protéines du complexe PRC2 sont co-localisées avec H3K27me3 sur les

promoteurs de 10-15% de tous les gènes (Conway et al., 2015) afin de réguler la différenciation, l'identité cellulaire, la plasticité des cellules souches et la prolifération (Baugé et al., 2014).

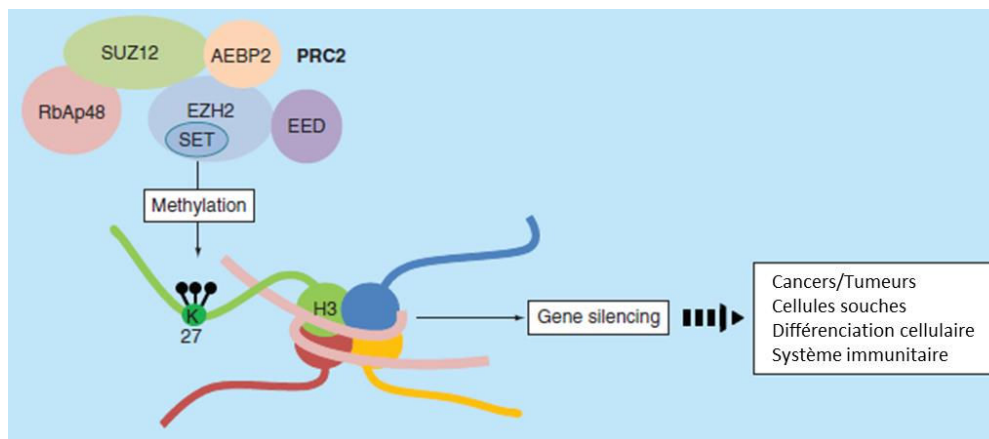


Figure 21 : Régulation transcriptionnelle de la méthylation de H3K27.

La répression transcriptionnelle est régulée par le complexe répressif PRC2 incluant la sous-unité catalytique EZH1 ou EZH2. Le complexe PRC2, comprenant les protéines EED, SUZ12, Rbp48 et EZH2, catalyse la di- et tri-méthylation de H3K27 (d'après Baugé et al., 2014).

L'élimination des groupements di- et tri-méthyl de H3K27 est effectuée par deux histone déméthylases contenant un domaine catalytique JmjC (jumonji) : UTX (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome ou KMD6A) et JMJD3 (jumonji domain-containing protein3 ou KDM6B) (Figure 22). Ces protéines sont impliquées dans l'activité transcriptionnelle, la différenciation des cellules souches embryonnaires et le contrôle de la survie cellulaire via la protéine RB (Ezponda and Licht, 2014; Yoo and Hennighausen, 2012).

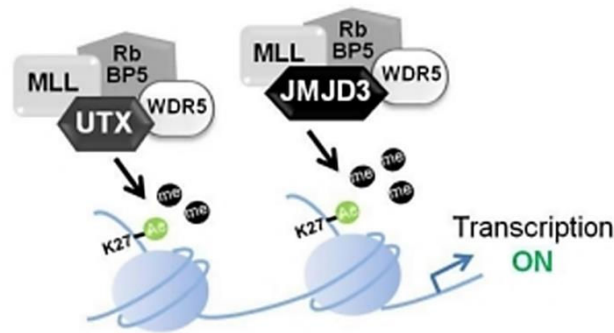


Figure 22 : Les histone déméthylases UTX et JMJD3 régulent l'activité transcriptionnelle. UTX et JMJD3 interagissent avec les protéines MLL, RbBP5 et WDR5. L'élimination des groupements méthyl de H3K27me3 conduit à une chromatine transcriptionnellement active (d'après Yoo and Hennighausen, 2012).

b. La méthyltransférase EZH2

La protéine EZH2, sous-unité catalytique du complexe PRC2, comporte un domaine SET c-terminal présentant une fonction méthyltransférase sur les lysines des histones (Tan et al., 2014). Son activité n'est possible qu'après interaction avec les autres protéines du complexe PRC2 : EDD, SUZ12 et RbAp48 (Baugé et al., 2014; Ezponda and Licht, 2014). EZH2 est exprimé dans les cellules souches embryonnaires et est essentiel pour l'induction de la pluripotence. De plus, il régule l'expression de gènes tissus-spécifiques impliqués dans la différenciation cellulaire. EZH2 est également impliqué dans la différenciation des cellules souches embryonnaires et adultes vers plusieurs types cellulaires (adipogenèse, ostéogenèse, neurogenèse...). Enfin, il joue un rôle dans le système immunitaire lors du développement des lymphocytes T et B (Baugé et al., 2014).

L'activation d'EZH2, par surexpression ou par mutation, est impliquée dans le processus de tumorigenèse. En effet, EZH2 est surexprimé dans de nombreux types de cancer tels que le cancer de la prostate, du sein ou de la vessie (Tan et al., 2014; Crea et al., 2012). Son expression est associée à un mauvais pronostic, à la formation de métastases, à la chimiorésistance et à l'agressivité de la tumeur.

En 2010, le séquençage du génome des cancers a permis l'identification de mutations hétérozygotes dans le domaine SET d'EZH2, au niveau de la tyrosine 641 (Y641N, F, S ou H), de l'alanine 677 (A677G) et de l'alanine 687 (A687V). Ces mutations « gain de fonction » sont

retrouvées dans 7% des lymphomes folliculaires et dans 22% des lymphomes diffus à grandes cellules B (GCB-DLBCL) et facilitent la conversion de la forme diméthylée vers la forme triméthylée de H3K27 (Ezponda and Licht, 2014; Tan et al., 2014; Majer et al., 2012; McCabe et al., 2012a).

EZH2 est un régulateur de la voie pRB/E2F qui contrôle le cycle cellulaire des cellules normales et tumorales. En effet, EZH2 réprime l'expression de p16, p19 et p15, activant le complexe cycline D/CDK4 ou 6 et favorisant ainsi la prolifération cellulaire (Baugé et al., 2014). De plus, la diminution de l'expression d'E-cadhérine par EZH2 en triméthylant H3K27 est corrélée à la progression tumorale, l'invasion et au stade avancé de la tumeur dans les cancers de la prostate, gastrique et du sein. EZH2 réprime le facteur de transcription FOXC1 (forkhead box transcription factor C1) induisant l'invasion des cellules cancéreuses du sein (Tan et al., 2014). Ainsi, la surexpression d'EZH2 induit une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses, la transition épithélio-mésenchymateuse, les métastases et la progression tumorale (Figure 23).

Bien qu'il ait un rôle dans la répression transcriptionnel, EZH2 peut également agir sur l'activation de gènes cibles de façon indépendante de son activité histone méthyltransférase (Tan et al., 2014). En effet, dans les cancers du sein, il a été montré qu'EZH2 peut interagir avec les récepteurs α - et β -caténines afin d'activer des gènes intervenant dans la voie de signalisation Wnt et favoriser la prolifération des cellules tumorales (Shi et al., 2007). Une autre étude a montré qu'EZH2 active l'expression de gènes cibles de NF κ B par interaction avec le complexe RelA/RelB (Lee et al., 2011).

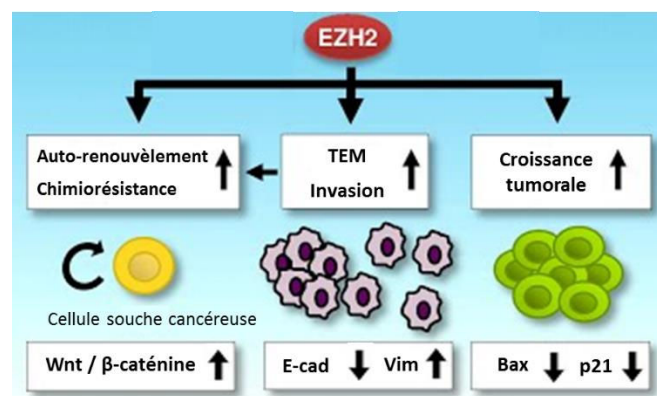


Figure 23 : EZH2 et processus tumoral.

La surexpression d'EZH2 est corrélée à la prolifération cellulaire, à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), à la migration et l'invasion cellulaire et à la chimiorésistance (E-cad : E-cadhérine, Vim : Vimentine) (adapté de Konno et al., 2014).

L'expression d'EZH2 est également contrôlée par l'hypoxie. En effet, en condition hypoxique, l'expression d'EZH2 augmente et favorise ainsi la prolifération de cellules initiatrices de tumeur mammaire. De plus, il a été mis en évidence que le VEGF augmente les niveaux d'expression d'EZH2 dans les tumeurs vascularisées. EZH2, à son tour, contribue à l'angiogenèse tumorale en inactivant le facteur anti-angiogénique, VASH1, par méthylation (Lu et al., 2010).

Enfin, EZH2 peut être associé aux phénomènes de chimiorésistance dans des cancers. En effet, la diminution d'EZH2 induit une diminution de la résistance au cisplatine dans des xénogreffes tumorales ovariennes (Hu et al., 2010).

c. Les déméthylases JMJD3 et UTX

Les déméthylases de H3K27me₃, JMJD3 et UTX, ont été découvertes récemment (2007) et ont 84% de similarité de séquence dans le domaine JmjC. La déméthylase UTX échappe à l'inactivation du chromosome X et est exprimé de façon ubiquitaire alors que JMJD3 s'exprime lors d'une inflammation et des stimuli viraux et oncogéniques.

UTX est composé de 1401 acides aminés et contient, en plus du domaine catalytique de JmjC, 6 domaines de répétition tétratricopéptidique (TPR) pour interagir avec des protéines. JMJD3 se compose de 1679 acides aminés, mais ne contient que le domaine JmjC.

Les deux déméthylases régulent les gènes homéotiques HOX (Pedersen and Helin, 2010). De plus, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que JMJD3 et UTX sont essentiels pour le développement et la différenciation. JMJD3 contrôle H3K27me₃ dans la trans-différenciation des macrophages en réponse à des stimuli inflammatoires. JMJD3 contribue à la différenciation cellulaire en activant des gènes impliqués dans la différenciation neuronale et épidermique et dans la cicatrisation. UTX favorise la myogenèse par activation des gènes myogénin et creatine kinase.

JMJD3 et UTX ont des rôles opposés dans la reprogrammation des cellules somatiques et pluripotentes induites. UTX murin favorise la reprogrammation des cellules somatiques par interaction avec les facteurs de transcription Oct4 et Nanog. JMJD3 quant à lui, inhibe la reprogrammation en régulant le locus Ink/Arf (Cdkn2a) et par ubiquitination de PHF20 via le recrutement de l'ubiquitine ligase Trim26.

Ces deux histone déméthylases peuvent également avoir un rôle dans certaines tumeurs malignes. UTX est un suppresseur de tumeur et a été initialement caractérisé comme un

répresseur de tumeurs induites par Notch et le rétinoblastome (RB) chez la drosophile et dans les cellules humaines (Lim et al., 2010; Pedersen and Helin, 2010) (Tableau V). UTX est muté dans un certain nombre de cancers dont la leucémie aiguë lymphoblastique (ALL), la leucémie myélomonocytaire chronique (CMML), l'adénocarcinome colorectal, le carcinome des cellules rénales, le myélome multiple et le cancer de la vessie (Arcipowski et al., 2016; Pedersen and Helin, 2010). Les mutations somatiques « perte de fonction » d'UTX augmentent la prolifération des cellules tumorales in vitro ainsi que la migration cellulaire et la croissance tumorale in vivo (Ezponda and Licht, 2014; Mar et al., 2012; Jankowska et al., 2011; Pedersen and Helin, 2010).

JMJD3 est un suppresseur de tumeur qui se lie et active le locus INK4A-ARF dans les fibroblastes diploïdes humains (Arcipowski et al., 2016; Lim et al., 2010; Pedersen and Helin, 2010) (Tableau V). Lorsque les cellules sont exposées au stress oncogénique, le locus devient déméthylé et actif, entraînant un arrêt du cycle cellulaire et la sénescence. L'expression de JMJD3 est réduite dans les cancers, tels que les carcinomes pulmonaires, hépatiques et les tumeurs malignes hématologiques. Le gène JMJD3 est situé sur le chromosome 17 à proximité immédiate du suppresseur de tumeur TP53, et les délétions ciblant les deux gènes se retrouvent généralement chez les cancers humains (Arcipowski et al., 2016; Lim et al., 2010; Pedersen and Helin, 2010).

Tableau V: Rôle des histone déméthylases UTX et JMJD3 dans les cancers (adapté de Lim et al., 2010).

	Activité enzymatique	Rôle transcriptionnel	Mécanisme d'action	Rôle dans le cancer
UTX/KDM6A	H3K27me2/3	Activation	Activation transcriptionnelle des protéines de liaison pRB contribuant à l'arrêt du cycle cellulaire	Suppresseur de tumeur Diminution de la régulation d'UTX dans les cancers par mutations somatiques inactivatrices
JMJD3/KDM6B	H3K27me2/3	Activation	Activation transcriptionnelle de la région INK4A/ARF induisant la sénescence	Suppresseur de tumeur Fréquemment délété dans les cancers

3- Ciblage thérapeutique des histone méthylases/déméthylases de H3K27

L'implication d'EZH2 dans la progression tumorale a conduit au développement de petites molécules inhibitrices de l'expression ou de l'activité d'EZH2. De même, dû au rôle des histone déméthylases dans les cancers, des inhibiteurs sélectifs à UTX et JMJD3 ont été également développés.

a. Inhibiteurs de la méthylase EZH2

Le premier inhibiteur d'EZH2 décrit est un analogue du 3-deazaadenosine, appelé le 3-deazaneplanocine A (DZNep). Cette molécule agit indirectement sur EZH2 en inhibant l'activité de la S-adénosyl-l-homocystéine (SAH) hydrolase, entraînant une accumulation cellulaire de SAH qui, à son tour, réprime l'activité histone lysine méthyltransférase (Figure 24).

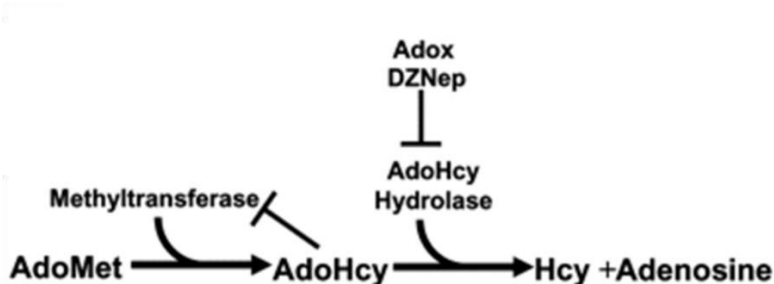


Figure 24 : Métabolisme de la S-adénylhomocystéine (AdoHcy) et son inhibition par le 3-deazaneplanocine A (DZNep).

La S-adénylméthionine (AdoMet) est un donneur de méthyl métabolisé en S-adénylhomocystéine par les méthyltransférases. AdoHcy est ensuite convertie en adénosine et homocystéine (Hcy) par la S-adénylhomocystéine hydrolase (AdoHcy hydrolase). Le DZNep inhibe l'AdoHcy hydrolase induisant une accumulation d'AdoHcy qui à son tour inhibe l'histone lysine méthyltransférase (adapté de Miranda et al., 2009).

Le DZNep réduit le niveau d'expression d'EZH2 et la triméthylation de H3K27 conduisant à la réactivation des gènes cibles d'EZH2. Il permet donc, *in vitro*, l'induction de l'apoptose, l'inhibition de l'invasion cellulaire et la sensibilisation à la chimiothérapie dans les cellules tumorales mais pas dans les cellules normales (Tan et al., 2007). Ainsi, le DZNep induit l'apoptose en réactivant l'effecteur apoptotique FBOX32 (Tan et al., 2007) mais également la

sénescence en réactivant les deux régulateurs de la sénescence p16 et p21 (Li et al., 2013). De plus, le DZNep réduit la migration et l'invasion cellulaire en augmentant l'expression de l'E-cadhérine (Liu et al., 2016).

Du fait que le DZNep a une faible toxicité *in vivo* (Tan et al., 2007), son action a été largement étudiée dans différents types de cancers tels que les cancers du poumon et gastrique, le myélome, la leucémie myéloïde aiguë et le lymphome (Baugé et al., 2014), faisant du DZNep un candidat prometteur contre le cancer.

Cependant, le DZNep n'étant pas spécifique de la triméthylation de H3K27 (Miranda et al., 2009), d'autres inhibiteurs ayant une meilleure sélectivité pour EZH2 ont été développés. En 2012, des inhibiteurs compétitifs de la S-adénosylméthionine ont vu le jour (Figure 25) :

- Le composé EPZ005687 a une affinité 50 fois plus grande pour EZH2 que pour EZH1. De plus, il peut inhiber la méthylation de H3K27 induite par les mutants EZH2 Y646 et A682 et tuer sélectivement les cellules cancéreuses de lymphome en ayant un effet minimal sur les cellules normales (Baugé et al., 2014; Tan et al., 2014).
- EPZ-6438 (ou tazemetostat) possède le même mécanisme d'action, la même spécificité et la même activité cellulaire que l'EPZ005687. *In vitro*, il réduit les niveaux globaux de H3K27me3 dans des lignées de lymphome humain exprimant EZH2 muté ou non. *In vivo*, EPZ-6438 présente une bonne biodisponibilité orale dans les modèles animaux et présente une activité anti-tumorale dans un modèle de xénogreffe. Il est actuellement étudié dans un essai clinique de phase I/II chez des patients atteints de tumeurs solides avancées ou de lymphomes à cellules B (Baugé et al., 2014).
- Le GSK126 diminue la méthylation globale de H3K27 et inhibe la prolifération des lignées cellulaires de lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) dans lesquelles EZH2 est muté. *In vivo*, le GSK126 inhibe la croissance des xénogreffes dans un modèle murin (McCabe et al., 2012b).
- UNC1999 est un analogue du GSK126 qui réduit le niveau de H3K27me3 et induit la mort des lignées cellulaires DLBCL ayant une mutation Y641N. Cet inhibiteur présente une biodisponibilité par voie orale chez la souris permettant l'étude du rôle d'EZH2 et de son inhibition dans des modèles animaux (Konze et al., 2013).

Le développement d'un peptide appelé SAH-EZH2 (stabilized α -helix of EZH2) a permis d'inhiber de façon sélective la triméthylation de H3K27 en perturbant la liaison entre EZH2 et la sous-unité EED qui induit une diminution du niveau protéique d'EZH2. De plus, le peptide

SAH-EZH2 induit un arrêt de la croissance dans des cellules de leucémie MLL-AF9, dépendante de PRC2 (Kim et al., 2013).

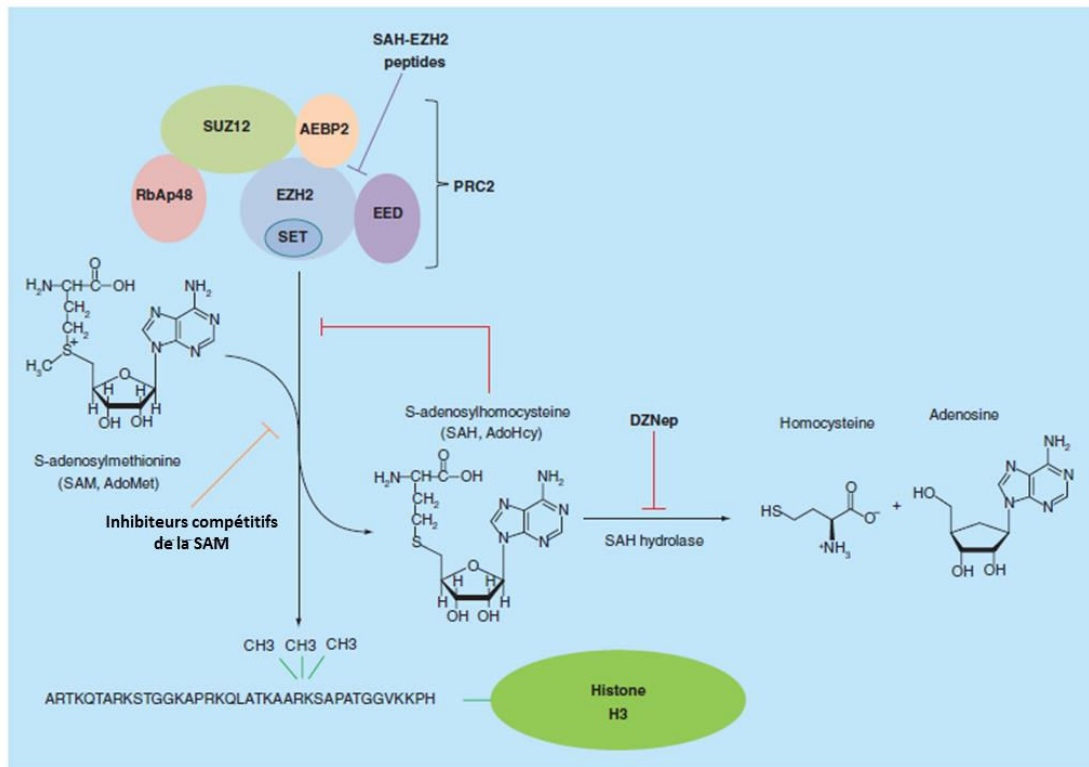


Figure 25 : Différents modes d'inhibition de la sous-unité catalytique EZH2 du complexe PRC2.

Trois types d'inhibiteurs sont impliqués : le DZNep comme inhibiteur de la S-adénylhomocystéine (SAH) hydrolase, les inhibiteurs compétitifs de la S-adénylméthionine (SAM) et les peptides SAH-DZNep qui rompent les contacts entre EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) et EED (Embryonic ectoderm development) (PRC : Polycomb repressive complex 2 ; SUZ12 : Suppressor of zeste 12 homolog ; AEBP2 : Adipocyte enhancer-binding protein 2) (d'après Baugé et al., 2014).

b. Inhibiteurs des déméthylases UTX et JMJD3

Les histone déméthylases de la famille Jumonji sont des oxygénases dépendantes des ions Fe^{2+} et de l' α -cétoglutarate, essentiels à l'activité enzymatique. Le GSK-J1 est un inhibiteur compétitif de ces deux cofacteurs, empêchant ainsi l'interaction entre JMJD3 ou UTX et H3K27me3 en se liant au site actif de ces enzymes sans compromettre leur conformation

(Kruidenier et al., 2012). Ainsi, le GSK-J1 est un inhibiteur des déméthylases JMJD3 et UTX, induisant une augmentation de H3K27me2 et H3K27me3. Cependant, le groupement carboxyle du GSK-J1 est hautement polaire limitant sa perméabilité aux cellules. Le remplacement de ce groupement par un ester éthylique confère une activité cellulaire à l'inhibiteur appelé GSK-J4 (Kruidenier et al., 2012). Le GSK-J4 a le même mécanisme d'action que celui du GSK-J1 et est un puissant inhibiteur des histone déméthylases JMJD3 et UTX cependant son action n'est pas spécifique à ces deux déméthylases. Il a été montré que le GSK-J4 inhibe également les déméthylases KDM5B et KDM4C augmentant ainsi les niveaux de H3K4me2 et H3K9me3 respectivement (Heinemann et al., 2014).

Le GSK-J4 a des propriétés anti-tumorales (Figure 26). In vitro, le GSK-J4 diminue la viabilité et la croissance cellulaire, induit un arrêt du cycle cellulaire, augmente l'apoptose et diminue la formation de colonies dans des lignées cellulaires de gliome du tronc cérébral avec une mutation K27M (Hashizume et al., 2014) et de leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T (Ntziachristos et al., 2014). In vivo, le GSK-J4 réduit la croissance des xénogreffes de cellules du gliome du tronc cérébral avec une mutation K27M en diminuant la prolifération cellulaire et en augmentant l'apoptose (Hashizume et al., 2014).

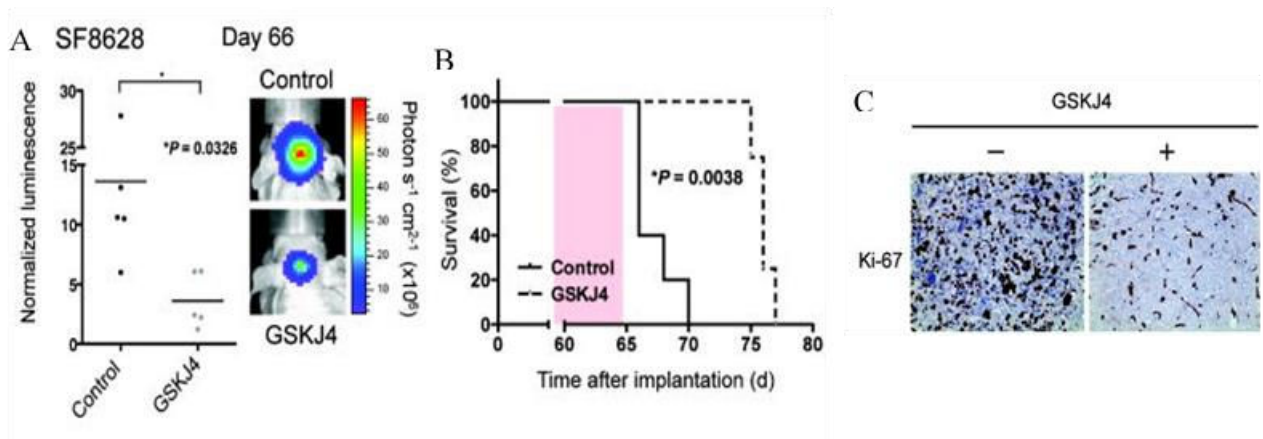


Figure 26 : Le GSK-J4 présente un effet anti-tumoral in vivo.

Un traitement au GSK-J4 dans des xénogreffes de cellules de gliome du tronc cérébral avec une mutation K27M induit (A) Une diminution de la taille de la tumeur, (B) Une augmentation de la survie et (C) Une diminution de la prolifération cellulaire (d'après Hashizume et al., 2014).

OBJECTIFS

Les chondrosarcomes sont des tumeurs malignes osseuses se développant dans un environnement hypoxique. La prise en charge thérapeutique de ces tumeurs à matrice cartilagineuse est principalement chirurgicale car les chondrosarcomes sont chimio- et radio-résistants. Dans ce contexte, ce travail de thèse avait pour objectif de mieux comprendre le rôle de l'hypoxie dans la résistance de ces tumeurs à la chimiothérapie et à la radiothérapie (projet 1) et d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques (projet 2) afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints d'un chondrosarcome de haut grade ou de localisation chirurgicale difficile, comme les chondrosarcomes à la base du crâne.

Bien que plusieurs études cliniques aient associé l'hypoxie tumorale à une résistance aux traitements, peu d'études ont été menées dans les chondrosarcomes pour étayer cette hypothèse. Ainsi, dans un premier projet, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'hypoxie sur les mécanismes de résistance des chondrosarcomes à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Mon étude a été menée sur quatre lignées cellulaires de chondrosarcome (Tableau VI) que nous avons cultivées en normoxie (21% d'O₂) ou en hypoxie (1% d'O₂). La chimiothérapie a été mimée par un traitement au cisplatine et la radiothérapie a été mimée par irradiation aux rayons X in vitro. Le but de ce travail a été de valider l'implication de l'hypoxie dans la radio- et la chimiorésistance des chondrosarcomes.

Tableau VI : Caractéristiques des lignées cellulaires de chondrosarcome.

Lignée cellulaire	CH2879	SW1353	JJ012	FS090
Grade	III	II	II	II
Age (ans)	35	72	57	66
Sexe	Femme	Femme	Homme	Homme
Origine	Côte	Humérus	Humérus	Non renseigné
Provenance	Pr Llombart-Bosch (Valence, Espagne)	ATCC	Pr Block (Chicago, USA)	Pr Block (Chicago, USA)
Références	(Gil-Benso et al., 2003)		(Scully et al., 2000)	(Scully et al., 2000)
Rayons X : D ₁₀ (Gy)	3,4 ± 0,1	5,4 ± 0,4	5,4 ± 0,1	8 ± 0,9
Cisplatine : IC ₅₀ (µM)	1,7 ± 0,4	6,3 ± 0,5	2,3 ± 0,4	5,6 ± 1,3

La D₁₀ correspond à la dose de radiation nécessaire pour tuer 90% des cellules et l'IC₅₀ correspond à la dose de cisplatine nécessaire pour réduire de 50% le nombre de cellules.

Le second projet a été d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. Tout d'abord, je me suis intéressée plus particulièrement à une molécule pharmacologique appelée 3-deazaneplanocine A (DZNep), ciblant la méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27). En effet, notre équipe avait montré que cet inhibiteur de la S-adénosylhomocystéine hydrolase, connu pour inhiber EZH2, induisait la mort des chondrosarcomes par apoptose in vitro (Girard et al., 2014). Nous avons poursuivi ce travail en étudiant le mécanisme d'action du DZNep, puis en analysant in vivo son effet anti-tumoral dans un modèle de xénogreffes chez des souris nude ainsi qu'en évaluant ses effets néfastes potentiels sur les différents tissus sains in vivo. Par ailleurs, j'ai également évalué si cette molécule pouvait être utilisée en combinaison, notamment avec le cisplatine afin d'augmenter leur efficacité.

Enfin, une autre molécule pharmacologique, appelée GSK-J4, a été récemment identifiée pour induire la mort cellulaire de certains gliomes pédiatriques du tronc cérébral et dans des leucémies lymphoblastiques aiguës (Hashizume et al., 2014; Ntziachristos et al., 2014). Aussi, mon dernier objectif a été d'évaluer son potentiel thérapeutique seul ou en association avec le cisplatine dans les chondrosarcomes.

RESULTATS

PROJET I

IMPACT DE L'HYPOXIE SUR LA REPOSE DES CHONDROSARCOMES
A LA CHIMIOOTHERAPIE ET A LA RADIOTHERAPIE

Introduction du projet I :

Il est communément admis que l'environnement hypoxique au sein de la tumeur affecte négativement la réponse à la radiothérapie et à la chimiothérapie induisant une tolérance aux traitements. Les chondrosarcomes sont des tumeurs hypoxiques avec un gradient d'oxygène de 7% à la périphérie jusqu'à 1% au cœur de la tumeur (Reed et al., 1989). Toutefois, peu d'études ont été menées afin de confirmer le rôle de l'hypoxie dans la résistance des chondrosarcomes aux traitements conventionnels. C'est pourquoi, dans ce premier projet, nous avons étudié son effet *in vitro* sur la réponse des chondrosarcomes à la chimiothérapie et à la radiothérapie.

Nous avons choisi de fixer le pourcentage d'oxygène en hypoxie à 1% pour plusieurs raisons. Tout d'abord, comme précisé précédemment, le pourcentage d'O₂ au cœur des chondrosarcomes est d'environ 1% (Reed et al., 1989). De plus, cette teneur en oxygène est nécessaire pour induire l'expression du facteur HIF-1 α . En effet, il a été montré qu'à un niveau plus élevé d'oxygène (5% d'O₂), le niveau protéique de la prolyl-hydroxylase 2 (PHD2), responsable de la phosphorylation de HIF-1 α , est fortement réduit, limitant ainsi l'expression de HIF-1 α (Holmquist-Mengelbier et al., 2006).

En premier lieu, nous avons incubé les chondrosarcomes en normoxie (21% d'O₂) ou en hypoxie (1% d'O₂) pendant 7 jours. Puis, les cellules ont été traitées par le cisplatine ou irradiées aux rayons X en normoxie ou en hypoxie. Enfin, nous avons étudié la survie cellulaire par numération et nous avons analysé le cycle cellulaire et l'apoptose (suivi d'Apo2.7, une protéine mitochondriale exprimée lors des phases précoces de l'apoptose) par cytométrie en flux.

Ce premier projet est composé de deux parties. Une première partie présentée sous forme d'un article en préparation sur la réponse au cisplatine, et une seconde partie, concernant les rayons X, est présentée sous forme traditionnelle.

I) Effet de l'hypoxie sur la réponse des chondrosarcomes au cisplatine

Article en préparation

Hypoxia differentially modulates the response of chondrosarcomas to cisplatin

Eva Lhuissier¹, Juliette Aury-Landas¹, Martine Boittin¹, Catherine Baugé¹, Karim Boumediene¹

¹ EA7451 BioConnecT, Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France

Address for correspondence:

Karim Boumediene

EA7451 BioConnecT

Université de Caen Normandie

14032 CAEN

France

Phone: +33 (0)2 31 06 82 18

Fax: +33 (0)2 31 06 82 24

Abstract

Chondrosarcoma is a rare bone tumor, resistant to radio- and chemotherapy. This resistance to conventional treatments is generally explained by the hypoxic feature of these tumors. However, few studies have directly evaluated the involvement of hypoxia in the resistance to treatments in that cells. In this study, we investigated the effect of hypoxia on the response to cisplatin in chondrosarcoma.

Four common cell lines derived from human chondrosarcomas have been used (JJ012, SW1353, CH2879 and FS090). Survival curves were established after cisplatin treatment under normoxia (21% O₂) and hypoxia (1% O₂). Cell cycle was determined by flow cytometry. Apoptosis was estimated through PARP cleavage by western-blot and Apo2.7 expression by flow cytometry. Finally, microarray analysis was performed to compare gene expression in JJ012 cell line treated or not with cisplatin under hypoxia or normoxia.

Unexpectedly, hypoxia increased resistance to cisplatin in only JJ012 cell line, and had no effect in other cell lines. This resistance was associated to a reduction of apoptosis. Also, microarray analysis followed by gene-annotation enrichment analysis showed hypoxia regulated enriched genes in biological processes and molecular function involved in angiogenesis, migration and activation of ERK1/2 signalling pathway.

In conclusion, we showed that hypoxia have dual role to modulate the resistance of chondrosarcomas to chemotherapy.

Introduction

After osteosarcoma, chondrosarcoma is the second primary bone cancer, representing 20% of bone malignancies. It usually grows in bone (chest, long, basin) and mainly affects adults over 30 years. It forms a heterogeneous family characterized by expression of cartilage-like matrix (Bovéé et al., 2005). There are three degrees of chondrosarcoma (grade 1 to 3) defined by cytological criteria (cellularity, size of nuclei, mitoses ...) and architectural (organization lobules of different sizes, irregular, extension to the soft parts ...) (Evans et al., 1977). Chondrosarcomas are known to have local aggressive behaviour. They may induce pulmonary metastases and become fatal. The survival rate is around 60-70% at 5 years, and the risks of metastasis and local recurrence are correlated with histological grade.

Chondrosarcoma treatment has only few changes over the past 30 years because they are resistant to radiation and conventional chemotherapy (Rosenberg et al., 1999). The standard treatment is surgical resection of the tumor (Kubo et al., 2008). A main hypothesis explaining chondrosarcomas resistance to chemotherapy is the hypoxic microenvironment around these tumors (Onishi et al., 2011).

It is well established that hypoxia acts mainly through intracellular mediators called Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 and -2, which are expressed in chondrosarcomas (at least in high-grade) (Kubo et al., 2008). These are essential transcription factor for maintaining the homeostasis of the cell and oxygen for adaptation hypoxic environment. They are involved in angiogenesis, tumor invasion, glucose metabolism, pH regulation, control of cell proliferation and drug resistance (Zeng et al., 2011).

Hypoxia is an essential feature of a solid tumor microenvironment and is associated with increased malignancy and poor prognostic. Many mechanisms allow hypoxic tumoral cells to modulate glycolysis, cell proliferation, and invasion (Shannon et al., 2003). Hypoxia plays a

role in chemotherapy resistance. Indeed, it increases the activity of DNA repair enzymes, the loss of apoptotic potential by mutation of the p53 gene as well as the creation a pH gradient which inhibits intracellular accumulation of the drugs (Shannon et al., 2003).

In this study we examined the role of hypoxia in the resistance to chemotherapy and most particularly to cisplatin. This drug is used for treatment of various tumours as a single agent or combined to other anticancer agents. The main mechanism is generation of DNA lesions and activation of DNA damages followed by induction of mitochondrial apoptosis (Galluzzi et al., 2012). However, cancer cells develop an acute resistance to cisplatin which limits its use in patients (Galluzzi et al., 2014). The mechanisms of cisplatin resistance are not fully understood yet. We show that hypoxia increases the resistance to cisplatin in chondrosarcoma cell line dependent manner. We suggest that this resistance is associated to a reduction of apoptosis.

Material and Methods

Cell culture

Human chondrosarcoma cell line SW1353 was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The human JJ012 and FS090 cell lines were kindly provided by Dr. Joel A. Block (Rush University medical center; Scully et al., 2000). They were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and antibiotics (10,000 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin in 0.9% NaCl). The cell line CH2879 was kindly provided by Pr. A. Llombart-Bosch (University of Valencia, Spain; Gil-Benso et al., 2003), cultured in Roswell Park

Memorial Institute 1640's medium (Lonza AG, Verviers, Belgium) supplemented with 10 % FBS (Invitrogen) and antibiotics (penicillin and streptomycin).

Protein extraction and Western blot

Proteins were extracted using RIPA lysis buffer and western blot was performed as previously described (Girard et al., 2014). Antibodies specific for HIF-1 α (610959) was obtained from BD biosciences, EPAS-1 (sc-13596) and β -actin (sc-47778) were obtained from Santa Cruz biotechnology and PARP (#9542) was provided by Cell signalling.

Cell survival and proliferation

Viable cells were counted using Countess II (Life Technologies) after trypan blue exclusion. Each count was performed twice, and independent experiments were done three times.

Clonogenicity assay

Cells were seeded at 200 cells/cm² to proliferate as colonies, due to the distance of the cells. After 10-15 days (around 8 doubling), cell cultures were fixed and colorated with 1 mg/mL of Crystal Violet in PBS-Ethanol 0.5% (Sigma). Colonies of more 50 cells were counted after 2 washing with PBS 1X to eliminate the excess of dye.

Cell cycle analysis

Cells were fixed with cold 70% ethanol and kept at 4°C. Then, cells were washed twice with PBS and resuspended in 10 μ g/mL RNase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 50 μ g/ μ L propidium iodide (PI) (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Labelled DNA content was measured using Gallios (Beckman Coulter, Villepinte, France) on the technical platform of SFR

146 (Structure Federative de Recherche 146, Caen, France). 20,000 events were counted. Results were analyzed with Kaluza 1.5a software.

Apoptosis assay

Treated and control cells were immunostained with Apo2.7-PE conjugated antibody, as described by the manufacturer (Beckman Coulter), and analyzed by cytometer (20,000 events were counted). Apo2.7 specifically detects the Mr 38,000 mitochondrial membrane antigen 7A6, which is exclusively exhibited on the cell membrane of apoptotic cells and can therefore be used as an early apoptotic marker in non permeabilized cells. Results were analyzed with Kaluza 1.5a software.

Total RNA Isolation

Total RNA was isolated from cell cultures using NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Hoerd, France), according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality were measured on a MultiSkan GO spectrophotometer with a μ Drop Plate (ThermoFisher Scientific). RNA integrity was assessed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Uls, France) using RNA 6000 Nano (Agilent Technologies), according to the manufacturer's instructions. RNA integrity numbers above 8 were considered suitable for microarray analysis.

Gene expression microarray analysis

Two-color microarray-based gene expression analysis was performed, according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies) as previously described (Aury-Landas et al., 2017). Briefly, 100 ng of total RNA were amplified and labelled using Low input Quick Amp Labelling kit, Two-color (Agilent Technologies), and hybridized to a SurePrint G3 Human Gene

Expression 8x60K Microarray (design ID 072363, Agilent Technologies). Slides were scanned on a SureScan Microarray scanner G2600D (Agilent Technologies). Raw data were extracted and Lowess normalized using Feature Extraction software (v. 10.7.3, Agilent Technologies), and analyzed using GeneSpring GX software (v. 14.8, Agilent Technologies). Microarray probes with a signal that is not positive and significant or not above the background were filtered out. Genes with a p-value ≤ 0.05 and a fold-change ≥ 2 were considered differentially expressed (DEGs).

Gene-annotation enrichment analysis

Gene-annotation enrichment among the gene showing significant differential expression was performed with the Functional annotation tool of the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (v. 6.8, DAVID) tool (Huang et al., 2009) considering the biological processes option (GOTERM_BP_FAT), the cellular compartment option (GOTERM_CC_FAT), the molecular function option (GOTERM_MF_FAT). Enrichments with a p-value < 0.05 were considered as significant.

Statistical analysis

For each analysis, three different experiments were performed. The values are means \pm SEM. Statistical significance was determined with Student' test. Two-way ANOVA with repeated measurements was performed. P-values were considered as statistically significant when less than 0.05.

Results

Hypoxia differentially increased the resistance to cisplatin by decreasing apoptosis

First, we compared the effect of cisplatin on survival of four chondrosarcoma cell lines (JJ012, FS090, CH2879 and SW1353) under hypoxia (1% O₂). Unexpectedly, we observed that hypoxia increased the resistance of JJ012 cells to cisplatin and had no effect on others cell lines tested (figure 1A). This indicates a response heterogeneity between chondrosarcoma cell lines.

We suggest that hypoxia affects cisplatin-induced apoptosis in chondrosarcomas and we investigated this hypothesis. We showed that hypoxia decreased the percentage of SubG1 cells, the percentage of Apo2.7 positive cells and PARP cleavage only in JJ012 (figure 1B-D), confirming that hypoxia modulates the response to cisplatin with cell line dependent manner.

We also analyzed senescence, autophagy and necroptosis through SA- β -gal staining, Beclin-1 and RIP-1 expression, respectively. No effect of oxygen tension was revealed in all chondrosarcoma cell lines tested (data not shown).

All chondrosarcoma cell lines responded to hypoxia

We next suggest that hypoxia induces differential effects on the response to cisplatin due to a difference in behaviour between chondrosarcoma cell lines. We investigated this hypothesis by evaluating cell proliferation, colonies size and expression of HIF factors. We showed that hypoxia increased cell proliferation with different kinetics and the colonies size in all chondrosarcoma cell lines (figures 2A-2B). It also increased the protein level of HIF-1 α and HIF-2 α in four cell lines (figure 2C). Hypoxia provokes the same behavioural changes in chondrosarcoma studied. However, it causes a greater increase in proliferation and colony size in line JJ012 compared to the three others.

Hypoxia may induce resistance to cisplatin in JJ012 by affecting genes involved in MAPK signalling pathway

To better understand mechanism responsible for chemoresistance induced by hypoxia in JJ012 cell line, we performed microarray experiment. Differential profiles of gene expression in JJ012 cell line in response to cisplatin were compared between hypoxia and normoxia. Global gene expression changes are shown in the form of a volcano plot, with a threshold of 2-fold-change and a significance threshold of $p \leq 0.05$. A total of 766 genes were identified to be differentially expressed between normoxia and hypoxia in response to cisplatin. Among these genes, 345 were up-regulated and 421 were down-regulated by hypoxia compared to normoxia (figure 3A). Dendrogram identified 6 groups of gene differently regulated by hypoxia in response to cisplatin depending on their expression level (figure 3B).

Gene Ontology analysis (figure 4, table 1) showed that this genes are enriched in molecular functions and biological processes which can be regrouped in four clusters with enrichment score ≥ 1 . These enriched gene in molecular functions and biological processes namely “positive regulation of angiogenesis”, “positive regulation of blood vessel endothelial cell migration”, “peptidyl-tyrosine phosphorylation”, “positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade” and “Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity”. These data are agreement with literature since hypoxia has been reported to regulate several biological processes including angiogenesis, cell proliferation, survival and migration (Patlar and Harris, 2006). Moreover, hypoxia phosphorylate kinase pathways including the MAP Kinases ERK (Minet et al., 2001).

Discussion

The resistance of chondrosarcoma to chemotherapy is often explained by the hypoxic environment of this tumor. However, few studies were conducted to validate this hypothesis. This was the aim of our study where, we investigated the role of hypoxia on the response to cisplatin in chondrosarcoma. We showed that hypoxia is not always responsible for the resistance of chondrosarcomas to chemotherapy. We reported that hypoxia (1% O₂) increases resistance to cisplatin only in JJ012 but not in other cell lines tested (SW1353, FS090 and CH2879).

In order to understand this differential response, we investigated whether hypoxia modulates cell proliferation and apoptosis. First, we showed that hypoxia increases the expression of HIF-1 and HIF-2 factors in all chondrosarcoma cell lines studied. Second, apoptosis is decreased in response to cisplatin under hypoxia but only in the JJ012 cell line. Moreover, cell proliferation is increased more importantly in this cell line. These data confirm that hypoxia induces resistance to cisplatin in the JJ012 cell line and suggest that it could increase its aggressiveness. It has been shown that hypoxia induced resistance to cisplatin in a number of tumor cell types by increasing cell proliferation in non-small cell lung cancer (Song et al., 2006) or by decreasing apoptosis in osteosarcoma (Adamski et al., 2013). Furthermore, hypoxia promotes invasion, migration (Sun et al., 2010) and angiogenesis (Lin et al., 2004) in JJ012 cell line. In addition, our transcriptomic data showed that, cisplatin, under hypoxia, regulates several genes enriched in biological processes involved in angiogenesis and migration. These data strongly suggest that hypoxia promotes the aggressiveness of the JJ012 cell line.

We showed that hypoxia induced resistance to cisplatin in JJ012 cell line by decreasing apoptosis. This decrease could be explain by a differential regulation of genes involved in

apoptosis under hypoxia. Indeed, transcriptomic analysis showed that these genes were enriched in biological processes and molecular functions involved in peptidyl-tyrosine phosphorylation, Ras activity and positive regulation of ERK1/2 cascade. The extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 (ERK1/2) are members of the mitogen-activated protein kinase superfamily and are activated by a cascade comprised of small G protein Ras-Raf family member (Ras-1, A-Raf and B-Raf) followed by MEK1/2 (Mitogen-activated protein kinase kinase) (Lu and Xu, 2006). The ERK1/2 cascade regulates a variety of cellular processes by phosphorylation of multiple target proteins involved in proliferation, differentiation, survival and transformation (Deschênes-Simard et al., 2014). Activation of ERK1/2 has been shown to inhibit apoptosis in response to a large number of extracellular stimuli such as radiation, osmotic stress, hypoxia or chemotherapeutic agent (Lu and Xu, 2006). The mechanism by which ERK1/2 activation inhibits apoptosis is complicated and varies, depending on the cell and tissue type and the cellular regulatory (Lu and Xu, 2006). In JJ012 chondrosarcoma cell line, hypoxia increases the phosphorylation of ERK1/2 (Sun et al., 2010). In melanoma metastases, ERK1/2 is phosphorylated and protects cells from cisplatin-induced-apoptosis (Mirmohammadsadegh et al., 2007) and in ovarian carcinoma, cisplatin causes an induction of ERK1/2 in a dose-dependent manner (Persons et al., 1999).

In conclusion, these data could suggest that hypoxia induces phosphorylation of the RAS/ERK signalling pathway, which, once activated, may inhibit apoptosis and increase cell proliferation in the JJ012 cell line, and may explain its resistance to cisplatin under hypoxia.

Acknowledgements

We thank Quentin Bruey, Marion Berthelot and Julien Pontin (EA 7451 BioConnect, Unicaen, Caen, France) for technical assistance. We also thank Joel Block (Rush University Medical Center, Chicago, USA) and Antonio Llombart-Bosh (University of Valencia, Valencia, Spain) for chondrosarcoma cell line gift. This work was financially supported by Ligue contre le cancer.

References

- Adamski, J., Price, A., Dive, C., and Makin, G. (2013). Hypoxia-Induced Cytotoxic Drug Resistance in Osteosarcoma Is Independent of HIF-1Alpha. *PLOS ONE* *8*, e65304.
- Aury-Landas, J., Bazille, C., Allas, L., Bouhout, S., Chesneau, C., Leclercq, S., Boumédiène, K., Baugé, C. (2017). Anti-inflammatory and chondroprotective effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor 3-Deazaneplanocin A, in human articular chondrocytes. *Scientific Reports*. *In press*.
- Bové, J.V.M.G., Cleton-Jansen, A.-M., Taminiau, A.H.M., and Hogendoorn, P.C.W. (2005). Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment. *Lancet Oncol.* *6*, 599–607.
- Deschênes-Simard, X., Kottakis, F., Meloche, S., and Ferbeyre, G. (2014). ERKs in Cancer: Friends or Foes? *Cancer Res.* *74*, 412–419.
- Evans, H.L., Ayala, A.G., and Romsdahl, M.M. (1977). Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer* *40*, 818–831.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., and Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* *31*, 1869–1883.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., Castedo, M., and Kroemer, G. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* *5*, e1257.
- Gil-Benso, R., Lopez-Gines, C., López-Guerrero, J.A., Carda, C., Callaghan, R.C., Navarro, S., Ferrer, J., Pellín, A., and Llombart-Bosch, A. (2003). Establishment and characterization of a continuous human chondrosarcoma cell line, ch-2879: comparative histologic and genetic studies with its tumor of origin. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *83*, 877–887.
- Girard, N., Bazille, C., Lhuissier, E., Benateau, H., Llombart-Bosch, A., Boumediene, K., and Bauge, C. (2014). 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase

EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells. *PLoS One* 9, e98176.

Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57.

Jagasia, A.A., Block, J.A., Diaz, M.O., Nobori, T., Gitelis, S., Inerot, S.E., and Iyer, A.P. (1996). Partial deletions of the CDKN2 and MTS2 putative tumor suppressor genes in a myxoid chondrosarcoma. *Cancer Lett.* 105, 77–90.

Kubo, T., Sugita, T., Shimose, S., Matsuo, T., Arihiro, K., and Ochi, M. (2008). Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J. Bone Joint Surg. Br.* 90, 364–370.

Lin, C., McGough, R., Aswad, B., Block, J.A., and Terek, R. (2004). Hypoxia induces HIF-1 α and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 22, 1175–1181.

Lu, Z., and Xu, S. (2006). ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 58, 621–631.

Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Raes, M., and Michiels, C. (2001). Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 847–855.

Mirmohammadsadegh, A., Mota, R., Gustrau, A., Hassan, M., Nambiar, S., Marini, A., Bojar, H., Tannapfel, A., and Hengge, U.R. (2007). ERK1/2 Is Highly Phosphorylated in Melanoma Metastases and Protects Melanoma Cells from Cisplatin-Mediated Apoptosis. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2207–2215.

Onishi, A.C., Hincker, A.M., and Lee, F.Y. (2011). Surmounting chemotherapy and radioresistance in chondrosarcoma: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Sarcoma* 2011, 381564.

Patiar, S., and Harris, A.L. (2006). Role of hypoxia-inducible factor-1 α as a cancer therapy target. *Endocr. Relat. Cancer* 13 Suppl 1, S61-75.

Persons, D.L., Yazlovitskaya, E.M., Cui, W., and Pelling, J.C. (1999). Cisplatin-induced Activation of Mitogen-activated Protein Kinases in Ovarian Carcinoma Cells: Inhibition of Extracellular Signal-regulated Kinase Activity Increases Sensitivity to Cisplatin. *Clin. Cancer Res.* 5, 1007–1014.

Rosenberg, A.E., Nielsen, G.P., Keel, S.B., Renard, L.G., Fitzek, M.M., Munzenrider, J.E., and Liebsch, N.J. (1999). Chondrosarcoma of the base of the skull: a clinicopathologic study of 200 cases with emphasis on its distinction from chordoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 23, 1370–1378.

Scully, S.P., Berend, K.R., Toth, A., Qi, W.N., Qi, Z., and Block, J.A. (2000). Marshall Urist Award. Interstitial collagenase gene expression correlates with in vitro invasion in human chondrosarcoma. *Clin. Orthop.* 291–303.

Shannon, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., Condrón, C.M., and Toomey, D. (2003). Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat. Rev.* 29, 297–307.

Song, X., Liu, X., Chi, W., Liu, Y., Wei, L., Wang, X., and Yu, J. (2006). Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 α gene. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58, 776–784.

Sun, X., Wei, L., Chen, Q., and Terek, R.M. (2010). CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol. Cancer* 9, 17.

Zeng, W., Wan, R., Zheng, Y., Singh, S.R., and Wei, Y. (2011). Hypoxia, stem cells and bone tumor. *Cancer Lett.* 313, 129–136.

Figure legends

Figure 1: Hypoxia increased resistance to cisplatin and decreased apoptosis only in JJ012 cell line

Chondrosarcoma cell lines were pre-incubated 7 days under hypoxia (1% O₂) or normoxie.

(A) Then, cells were treated for 3 days with different doses of cisplatin (5-10 μ M) under hypoxia (1% O₂) or normoxie. Cell adherents were counted at the end of experiment. Data are expressed as means \pm SEM (n=3). *: p-value < 0.05.

(B) Then, cells were treated to cisplatin (10 μ M) under hypoxia (1% O₂) or normoxie for 3 days cells were fixed and cell cycle determined by flow cytometry. Histograms represent fraction of cells in Sub-G1 phase. Data are expressed as means \pm SEM (n=3). **: p-value < 0.01.

(C) Cells were treated as previously. Then, they were stained with Apo 2.7 antibody coupled to phycoerythrin and analyzed by flow cytometry (n=3). *: p-value < 0.05.

(D) JJ012 and CH2879 cell lines were treated to cisplatin (10 μ M) for 3 days under normoxia or hypoxia (1% O₂). The cleavage of PARP was analyzed by western-blot. β -actin was used to compared protein loading. A representative figure of three independent experiment is shown.

Figure 2: Hypoxia increased proliferation and induced expression of HIF- α factors in chondrosarcomas

JJ012, CH2879, SW1353 and FS090 chondrosarcoma cell lines were incubated under hypoxia (1% O₂) for 7 days. (A) Adherent cells were regularly counted by trypan blue exclusion of dead cells. Data are expressed as means \pm SEM (n=3). *: p-value < 0.05. (B) At day 7, adherent cells were stained with Cristal Violet. Representative pictures are shown. Magnification: x4 (n=3). (C) Chondrosarcoma cell lines were incubated under hypoxia (1% O₂) for 24h. HIF-1 α and HIF-2 α expressions were analyzed by western-blot. β -actin was used to compared protein loading. A representative figure of two independent experiment is shown.

Figure 3: Transcriptomic analysis reveals differences in response to cisplatin treatment between normoxia and hypoxia in JJ012 cell line.

(A) Among 58341 entities, Volcano plot showing 766 differentially expressed genes (DEG), up-regulated (red, n=345) and down-regulated (blue, n=421) genes in response to cisplatin treatment in hypoxia as compared with normoxia (paired T-test p-value<0.05; Fold change \geq 2). (B) Dendrogram obtained by hierarchical clustering of the 766 differentially expressed genes (DEG) in response to cisplatin treatment between hypoxia and normoxia. Hypoxia 1 and normoxia 1 correspond to condition of samples 1 and hypoxia 2 and normoxia 2 correspond to condition of samples 2.

Figure 4: Functional annotation clustering determined using DAVID Bioinformatics Resources.

The representative groups with an enrichment score >1 are presented. Only gene ontology terms are considered. *: p-value < 0.05 and **: p-value < 0.01.

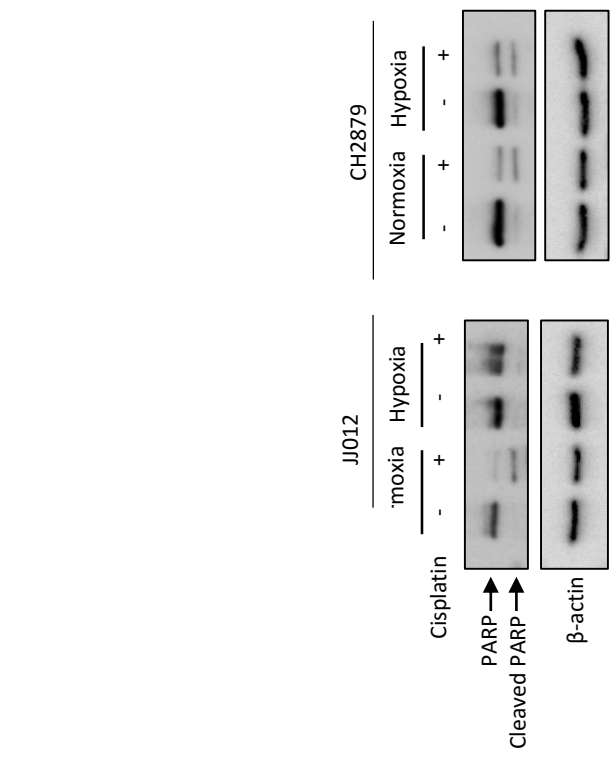
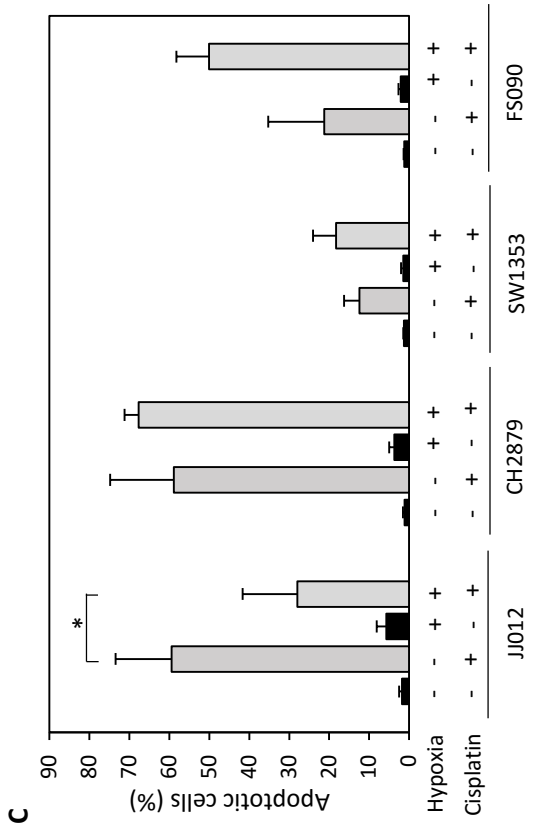
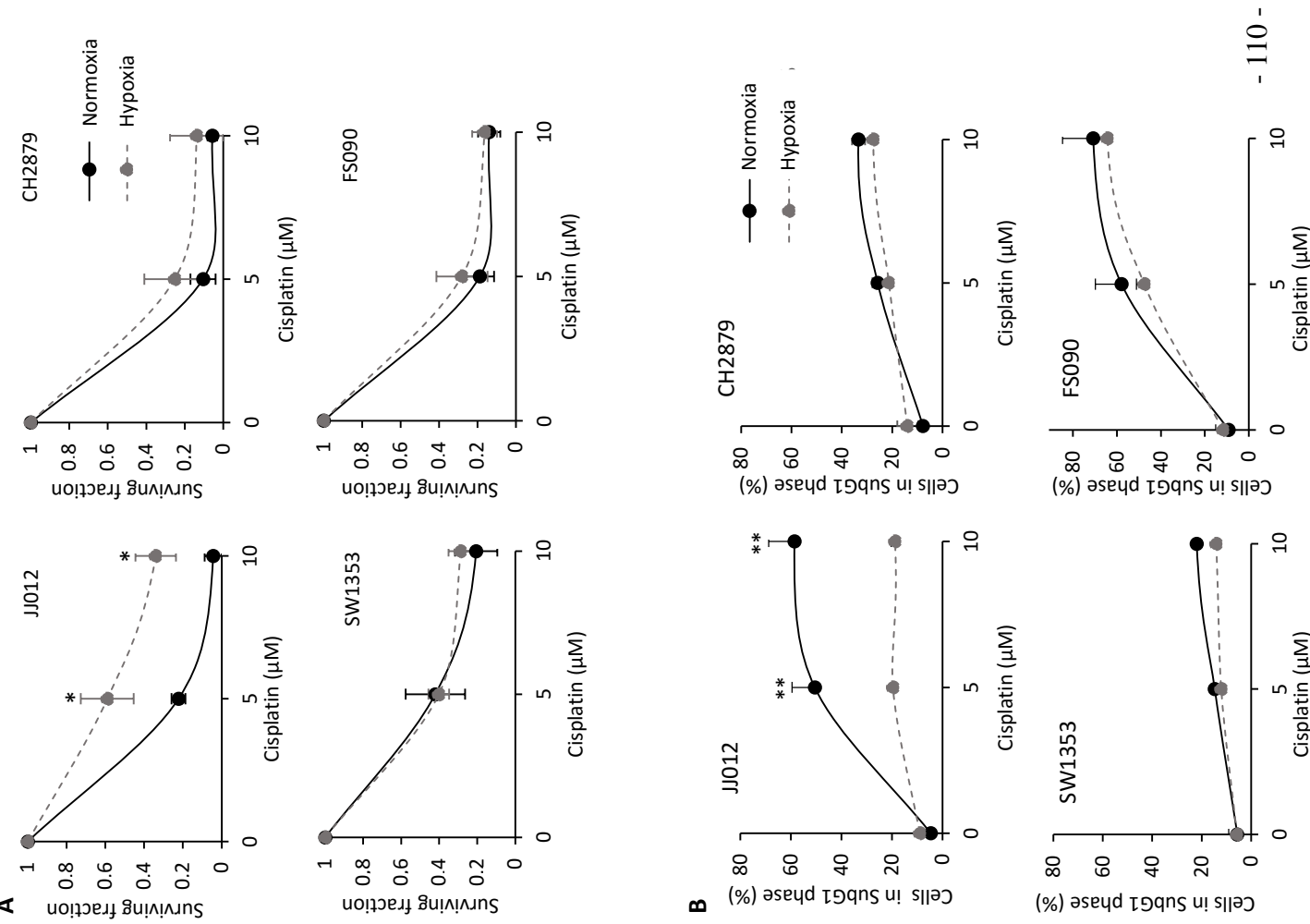
Table

Table 1: Enrichment analysis from regulated genes by hypoxia in response to cisplatin in JJ012 cell line

Analysis considering the biological processes option in DAVID (GOTERM_BP_FAT) or the molecular function option (GOTERM_MF_FAT) as indicated in first column.

Category	Term	Genes	Fold enrichment	p-value
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045766~positive regulation of angiogenesis	PRKCA, ADM, BTG1, CCBE1, ZC3H12A, THBS1, FGF2	2.97	0.031
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043536~positive regulation of blood vessel endothelial cell migration	PRKCA, ANGPT1, THBS1, FGF2	10.28	0.006
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005524~ATP binding	ZAK, PFKFB2, FPGT-TNNI3K, CASK, HLCS, ABCA1, MTHFD1L, EPHB2, GPHN, LACE1, CAMK2D, DCLK2, TLK1, STK39, STK38L, DHX58, AKT3, KIF13B, MAP2K5, PRKCA, GUCY2F, ALPK1, CSNK1G1, ACTA1, MYO1E, NLRP8, PIM1, DGKI, KIF16B, NME7, STK3, MAST4, NAV2, GTF2F2, PDGFRA, GK, TSSK3, UBE2E2, ACSM5, MYLK, KIF26B, KALRN, CAMK1D	1.40	0.023
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006468~protein phosphorylation	PRKCA, GUCY2F, ALPK1, ZAK, PIM1, FPGT-TNNI3K, CASK, STK3, TGFB2, RSRC1, CAMK2D, TLK1, STK39, TSSK3,	2.03	0.006

		STK38L, MYLK, AKT3, CAMK1D, KALRN		
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005088~Ras guanyl- nucleotide exchange factor activity	FGF8, GRIN2C, PDGFRA, CAMK2D, ANGPT1, NRG1, GDNF, FGF2	3.38	0.009
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0001759~organ induction	FGF8, GDNF, FGF2	12.20	0.024
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0018108~peptidyl- tyrosine phosphorylation	FGF8, FGFR1OP2, PDGFRA, CUX1, NRG1, FGF2, MAP2K5, EPHB2	2.55	0.038
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0070374~positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	PRKCA, FGG, FGF8, TNF, CCR1, PDGFRA, CAMK2D, ANGPT1, PDGFC, FGF2	2.79	0.01
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005088~Ras guanyl- nucleotide exchange factor activity	FGF8, GRIN2C, PDGFRA, CAMK2D, ANGPT1, NRG1, GDNF, FGF2	3.38	0.09
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0042060~wound healing	WNT5B, FGFR1OP2, PDGFRA, NRG1, FGF2, TGFB2	3.66	0.024



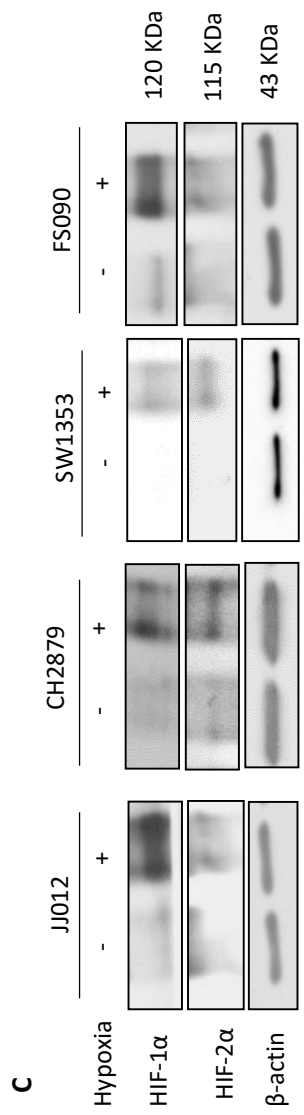
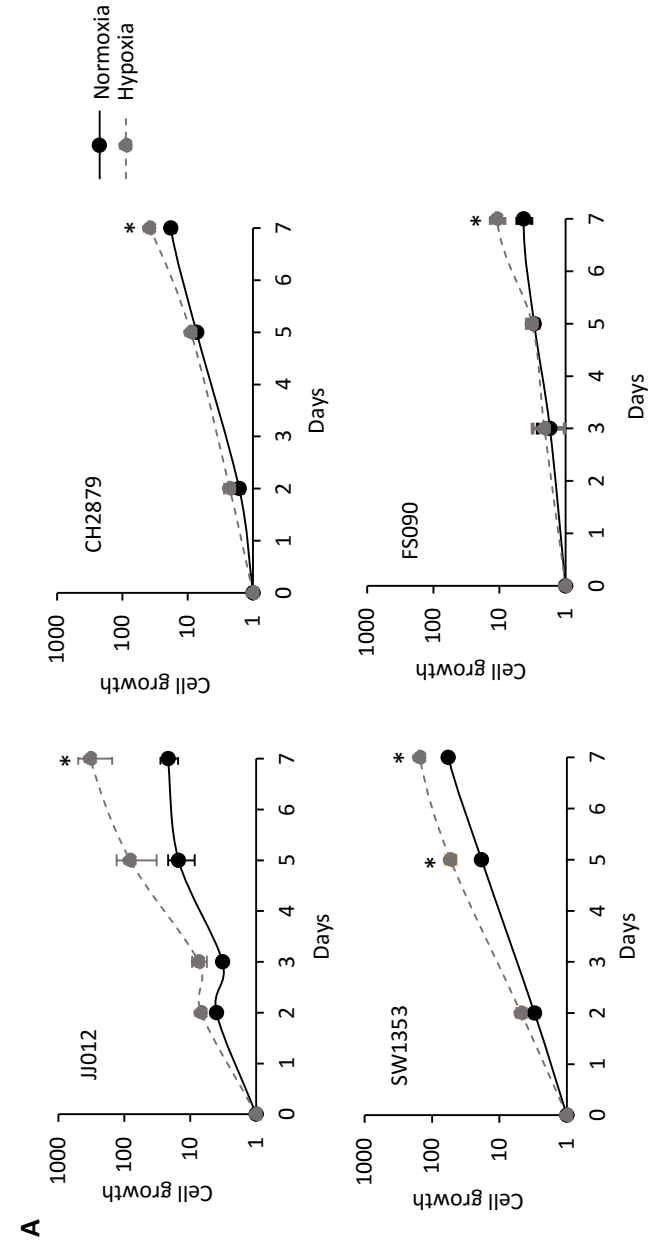
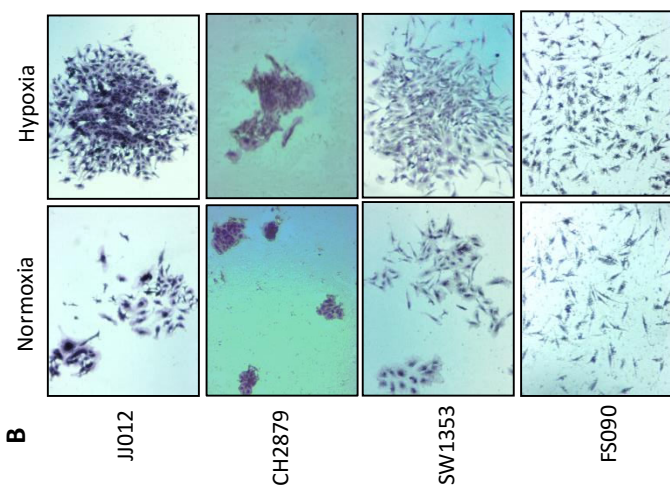
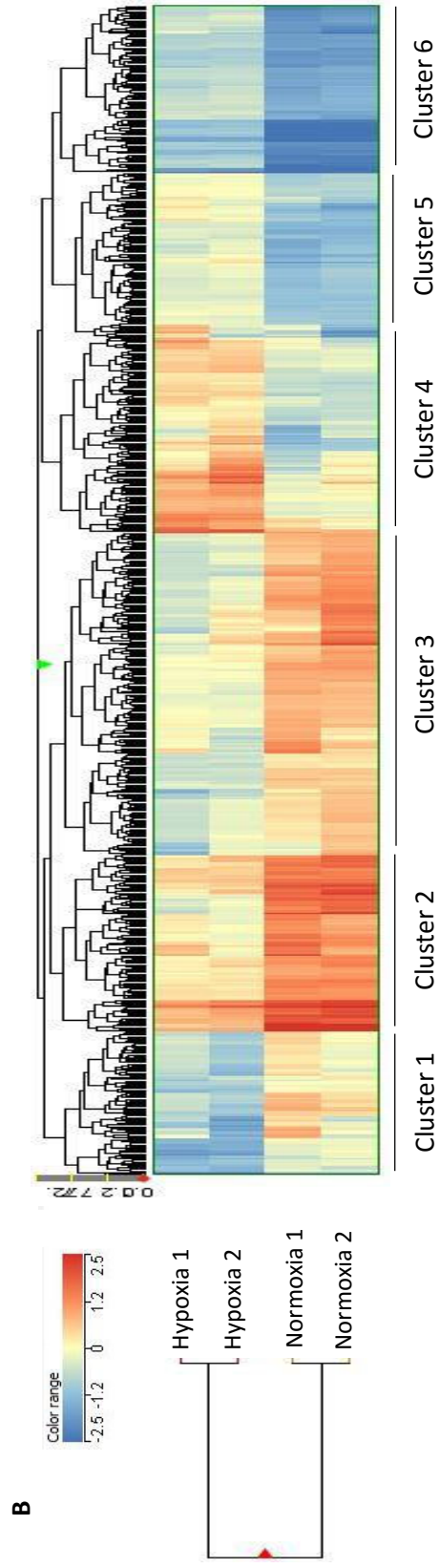
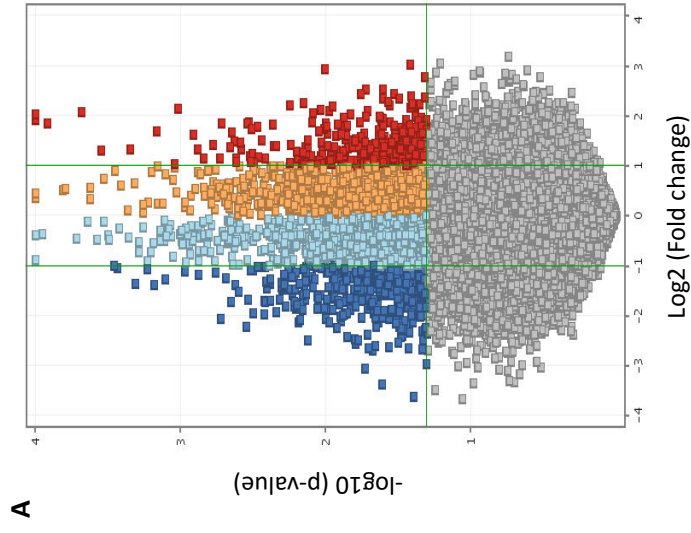
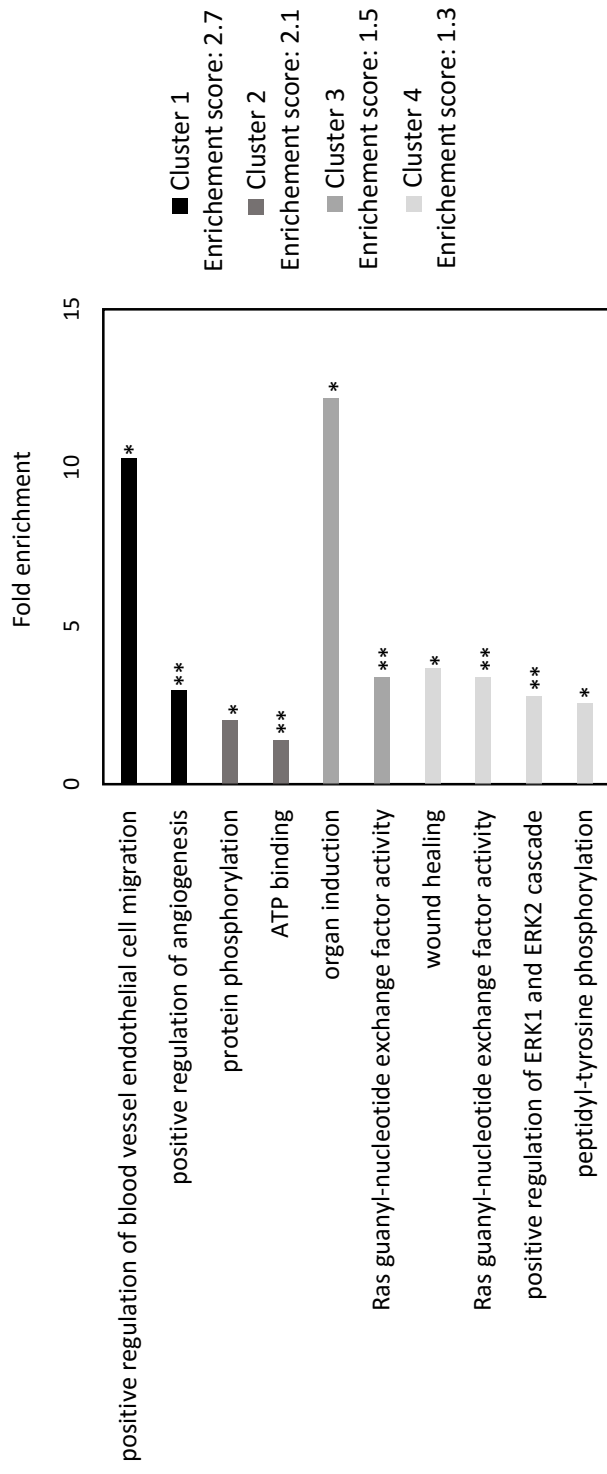


Figure 2





II) Effet de l'hypoxie sur la résistance des chondrosarcomes aux rayons X

Contexte :

Nous avons montré précédemment que les chondrosarcomes ont une hétérogénéité de réponse à l'hypoxie après un traitement au cisplatine. Nous avons mis en évidence que l'hypoxie augmente la résistance au cisplatine uniquement dans la lignée JJ012. Nous souhaitons savoir si cet effet est spécifique au cisplatine ou s'il peut être généralisé à un traitement induisant des cassures à l'ADN. C'est pourquoi nous avons étudié l'impact de l'hypoxie sur la résistance des chondrosarcomes aux rayons X.

Matériel et méthodes :

Culture cellulaire

Quatre lignées de chondrosarcomes ont été utilisées. La lignée CH2879, établie par le Pr Llombart-Bosch (Gil-Benso et al., 2003), est cultivée dans du RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, Lonza AG) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 min et d'un cocktail d'antibiotiques. La lignée SW1353 provient de l'ATCC (American Type and Culture Collection). Les lignées FS090 et JJ012 ont été établies au sein du laboratoire du Pr Block (Scully et al., 2000). Ces trois lignées sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's modification of eagle's minimum essential medium, Lonza AG) avec 10% de SVF préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 min et d'un cocktail d'antibiotiques. Un passage est effectué avec un ratio 1 pour 3, tous les 3 jours. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ et 21% d'O₂ (normoxie) ou 1% d'O₂ (hypoxie). Les cellules sont incubées pendant 7 jours en normoxie ou en hypoxie, 24h après ensemencement. Elles sont ensuite irradiées aux rayons X puis maintenues en normoxie ou en hypoxie avant le début de chaque expérience.

Irradiations

Les irradiations aux rayons X sont effectuées sur l'irradiateur Cegelec XRAD 225 CX. Les boîtes de culture sont placées à l'horizontale et subissent une irradiation uniforme (2,25 MeV) de 1,32 Gy par minute. Le débit, la dose et le temps d'irradiation sont gérés par ordinateur.

Test de clonogénicité

Les cellules sont ensemencées à très faible densité dans des plaques 6 puits (176 ou 76 cellules par cm²) de façon à proliférer sous forme de colonies, du fait de l'éloignement des cellules les unes par rapport aux autres. Après 8 doublements soit environ 10 jours, les cultures cellulaires sont fixées et colorées au crystal violet (Sigma) (1mg/mL de crystal violet dans du PBS-Ethanol 0,5%). Les colonies de plus de 50 cellules sont dénombrées après deux rinçages au PBS 1X afin d'éliminer l'excès de colorant.

Cycle cellulaire

Les cellules sont récoltées avant confluence. Elles sont rincées au PBS, décollées puis centrifugées à 700 g. Les culots cellulaires sont fixés dans de l'éthanol 70% froid (stocké à -20°C). Les cellules sont conservées à 4°C avant passage en cytométrie en flux. L'éthanol est éliminé par rinçage au PBS puis les cellules sont incubées avec une solution contenant de la RNase (20 µg/mL) et de l'iodure de propidium (IP) (50 µg/mL) pendant 1h à 37°C à l'obscurité. Les cellules sont ensuite analysées au cytomètre (Gallios, Beckman Coulter) sur la plateforme SFR 146 ICORE (Caen), et 20000 évènements sont comptés. L'analyse est effectuée avec le logiciel Kaluza 1.5a (Beckman Coulter).

Etude de l'apoptose

Les cellules sont marquées avec un anticorps conjugué Apo2.7-PE (IM2088M), comme décrit par le fabricant (Beckman Coulter) et sont analysées par cytométrie en flux. Les cellules Apo2.7 positives correspondent aux cellules apoptotiques. Les résultats ont été analysés avec le logiciel Kaluza 1.5a (Beckman Coulter).

Etude de la sénescence

Le kit de dosage de sénescence cellulaire (Cellular Senescence Assay, KAA002RF, Meck Millipore) a été utilisé selon le protocole du fabricant. Les cellules sont fixées et incubées avec une solution de marquage de la SA-β-Gal toute la nuit à 37°C. Les cellules positives à la SA-β-Gal correspondent aux cellules sénescents et sont colorées en bleu puis observées sous microscope (Scope.A1 Zeiss) et photographiées (Axiocam 105 color, Zeiss).

Résultats :

I- Effet de l'hypoxie sur la survie cellulaire des lignées de chondrosarcome après irradiation aux rayons X

Le chondrosarcome est une tumeur hypoxique résistante aux irradiations par rayons X. Afin de savoir si l'hypoxie est responsable de cette radiorésistance, nous avons évalué la survie cellulaire, par test de clonogénicité, des quatre lignées de chondrosarcome après irradiation aux rayons X sous hypoxie. En premier lieu, en absence d'irradiation, l'hypoxie augmente la prolifération des lignées de chondrosarcome en augmentant le nombre et la taille des colonies (Figure 27). De plus, l'hypoxie augmente la sensibilité aux rayons X des lignées JJ012 et SW1353 et n'a pas d'effet significatif sur les lignées CH2879 et FS090 (Figures 27 et 28).

Par la suite, les expérimentations ont été réalisées sur les lignées JJ012 et SW1353 afin de déterminer si cette diminution de la survie est associée à un blocage du cycle cellulaire.

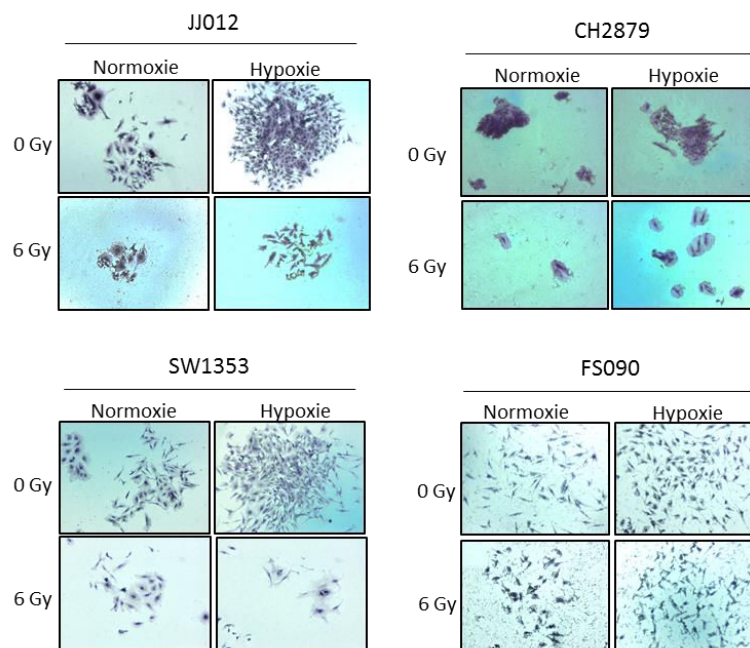


Figure 27 : Evaluation de la croissance cellulaire des chondrosarcomes après irradiations aux rayons X sous hypoxie.

Les cellules sont incubées en normoxie (21% d'O₂) ou en hypoxie (1% d'O₂). Cinq jours après irradiation aux rayons X à 6Gy, les cellules sont colorées au crystal violet. Vues représentatives des colonies (objectif x4). Trois expériences indépendantes ont été effectuées.

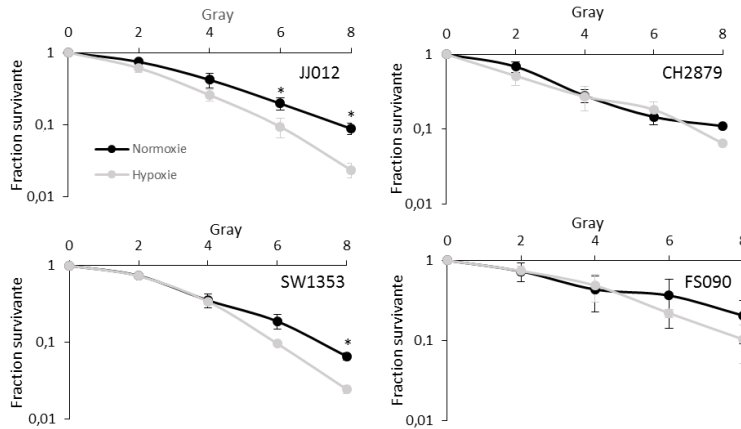


Figure 28 : Evaluation de la survie des chondrosarcomes après irradiation aux rayons X sous hypoxie.

Les cellules sont incubées sept jours en hypoxie ou en normoxie avant irradiation puis maintenu en hypoxie ou normoxie. Les cellules sont comptées cinq jours après irradiation aux rayons X (0-8Gy). Les valeurs sont rapportées au contrôle (absence d'irradiation). Les courbes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes \pm SEM. * : p-value \leq 0,05.

II- Effet de l'hypoxie sur le cycle cellulaire des lignées de chondrosarcome après irradiation aux rayons X

L'hypoxie seule ne modifie pas le cycle cellulaire. En revanche, les irradiations aux rayons X provoquent des effets différents sur les deux lignées (Figure 29) : elles induisent un blocage du cycle cellulaire en phase S de la lignée JJ012 et n'ont pas d'effet sur la lignée SW1353, que ce soit en normoxie ou en hypoxie.

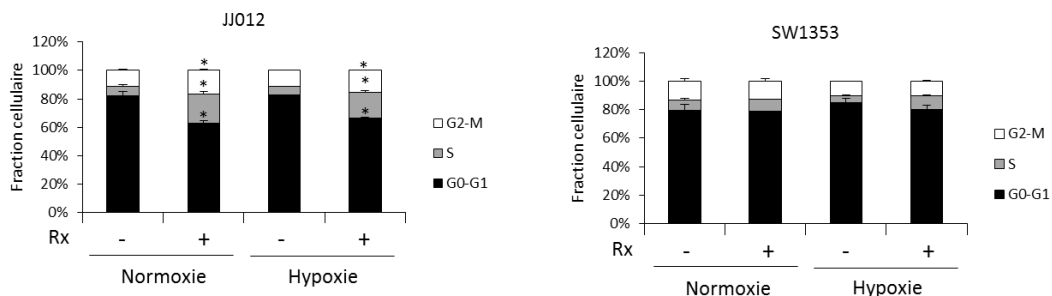


Figure 29 : Evaluation du cycle cellulaire après irradiation aux rayons X sous hypoxie dans les lignées cellulaires de chondrosarcome JJ012 et SW1353.

Les cellules sont incubées sous hypoxie ou normoxie. Cinq jours après irradiation à 6Gy, les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes \pm SEM. * : p-value \leq 0,05.

III- Effet de l'hypoxie sur l'apoptose et la sénescence des lignées de chondrosarcome après irradiation aux rayons X

Les irradiations aux rayons X provoquent une augmentation du pourcentage de cellules en Sub-G1 dans les lignées JJ012 et SW1353. L'hypoxie seule induit une légère augmentation de cette fraction dans les deux lignées. Par contre, elle augmente significativement l'effet des irradiations uniquement dans la lignée JJ012 (Figure 30), suggérant que l'hypoxie augmente l'apoptose en réponse aux rayons X dans cette lignée mais pas dans la lignée SW1353.

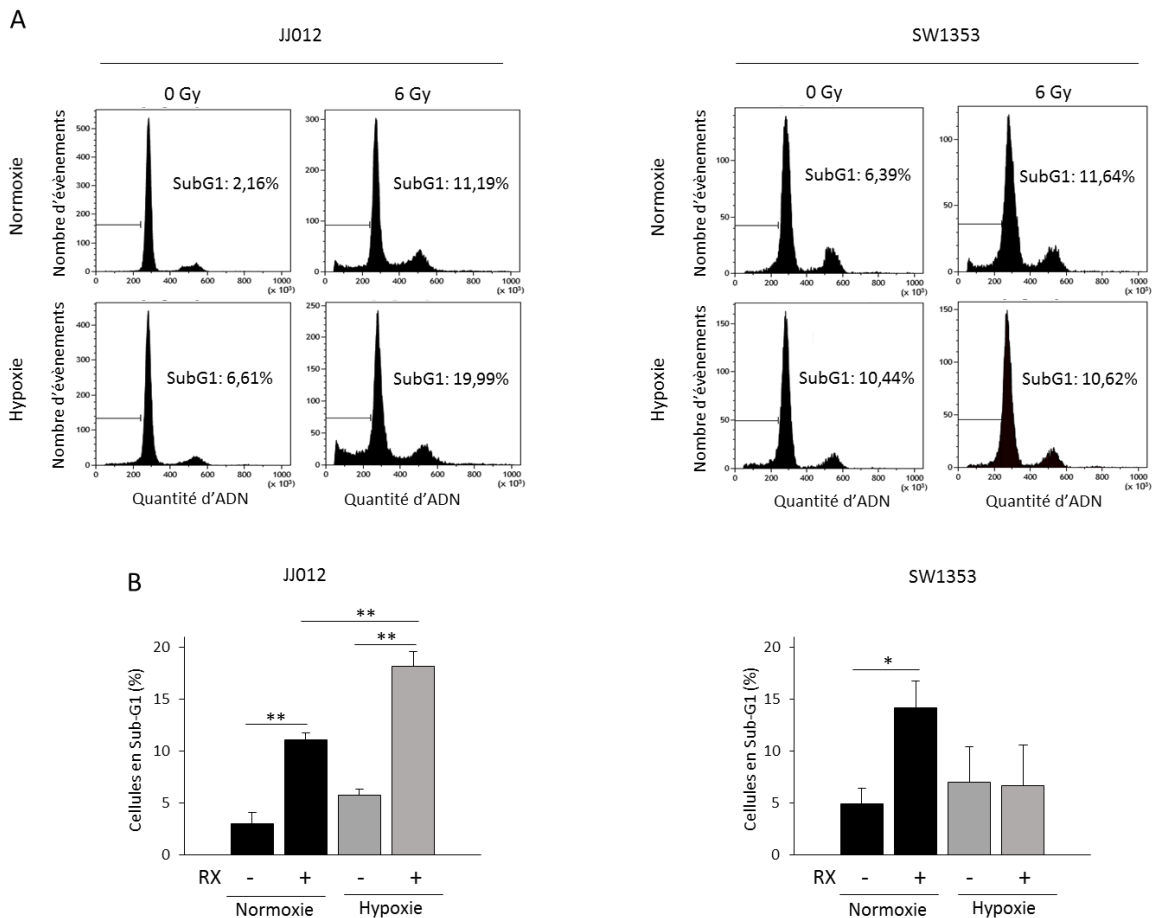


Figure 30 : Evaluation de l'apoptose par étude du pourcentage de cellules en Sub-G1 dans les lignées cellulaires de chondrosarcome JJ012 et SW1353 irradiées aux rayons X en hypoxie.

Les cellules sont incubées en normoxie (21% d'O₂) ou en hypoxie (1% d'O₂). Cinq jours après irradiation à 6Gy, le contenu en ADN des cellules est analysé par cytométrie en flux. A- Résultat d'une expérience représentative. B- Les histogrammes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ± SEM. * : p-value ≤ 0,05 et ** : p-value ≤ 0,01.

L'analyse de l'apoptose par marquage Apo2.7 confirme que les irradiations aux rayons X ont des effets variables selon les lignées de chondrosarcome : les rayons X (6Gy) induisent l'apoptose uniquement dans la lignée JJ012. Néanmoins, l'hypoxie ne modifie pas le niveau d'apoptose (Figure 31).

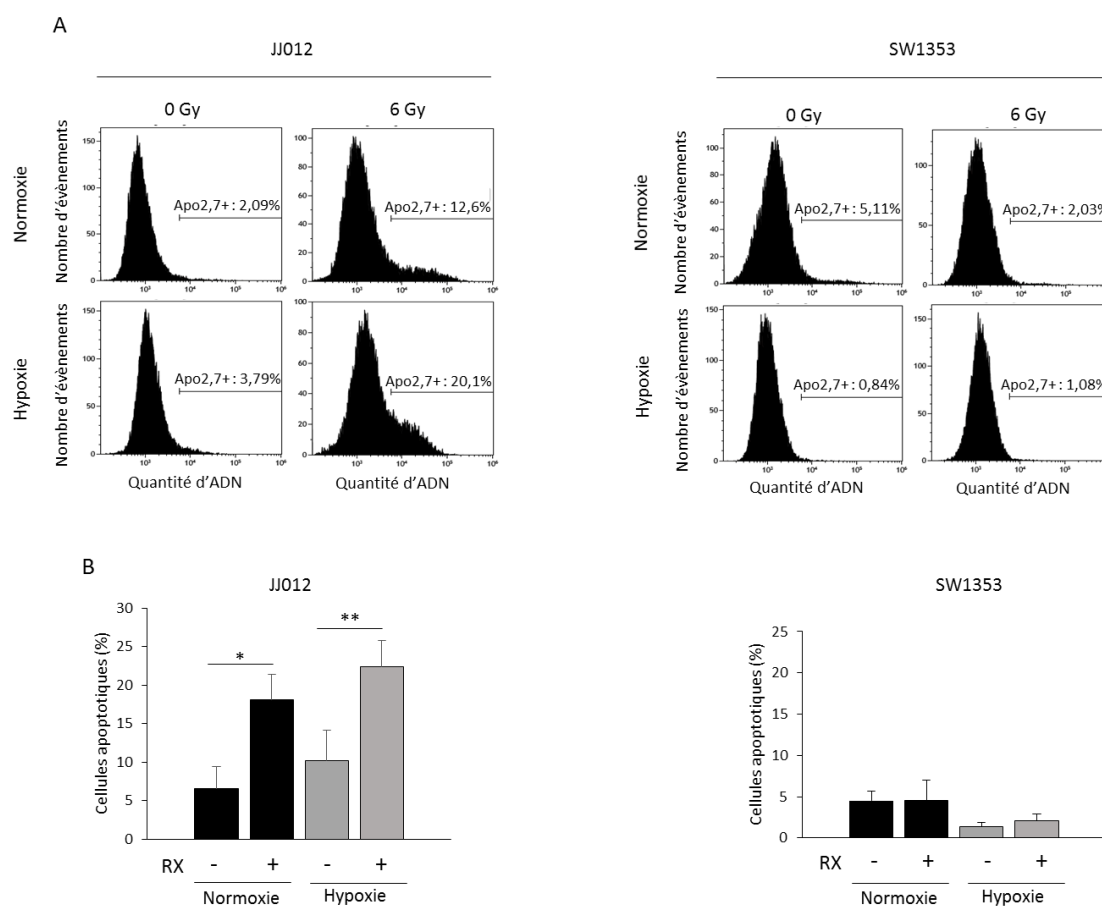


Figure 31 : Evaluation de l'apoptose par étude du pourcentage de cellules Apo 2.7+ après irradiation aux rayons X en hypoxie dans les deux lignées cellulaires de chondrosarcome. Les cellules sont incubées sous hypoxie (1% d'O₂) ou normoxie (21% d'O₂). Cinq jours après irradiation aux rayons X (6Gy), les cellules sont marquées avec un anticorps dirigé contre Apo2.7 puis la quantité de cellules marquées ou non avec Apo2.7 est évaluée par cytométrie en flux. A- Résultat d'une expérience représentative. B- Les histogrammes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ± SEM. * : p-value ≤ 0,05 ; ** : p-value ≤ 0,01.

La mesure de la sénescence montre également une hétérogénéité de réponse entre les lignées. En effet, les irradiations aux rayons X ne provoquent pas de sénescence dans la lignée JJ012 contrairement à celle observée dans la lignée SW1353. L'hypoxie ne modifie pas ces résultats (Figure 32).

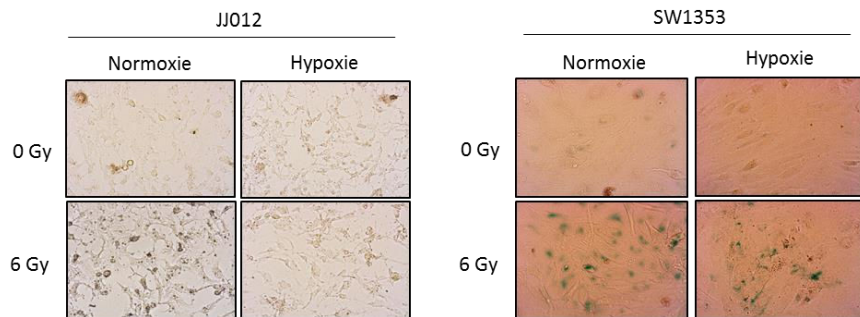


Figure 32 : Evaluation de la sénescence après irradiation aux rayons X sous hypoxie dans les lignées cellulaires de chondrosarcome JJ012 et SW1353.

Les cellules sont incubées sept jours en hypoxie ou en normoxie avant irradiation puis maintenu en hypoxie ou normoxie. Cinq jours après irradiation aux rayons X (6Gy), les cellules ont été colorées avec la SA- β -gal afin de visualiser les cellules sénescents en bleu. Une photographie représentative est montrée pour chaque condition (objectif : x20). Trois expériences indépendantes ont été effectuées.

Discussion :

Au cours de ce travail, j'ai montré que l'hypoxie augmente la sensibilité aux rayons X uniquement dans la lignée JJ012. Cet effet est dû à une diminution de la croissance cellulaire, caractérisée par un blocage des cellules en phase S du cycle cellulaire, et à une augmentation du pourcentage de cellules en Sub-G1. Cet effet radiosensibilisateur n'était pas attendu car la majorité des études associe l'hypoxie à la résistance aux rayons X notamment en réduisant la formation de ROS (Onishi et al., 2011). De plus, nous avons observé précédemment que l'hypoxie augmente la résistance au cisplatine de cette même lignée. Cependant, quelques études ont montré que l'hypoxie pouvait augmenter la sensibilité des cellules aux rayons X. Ainsi, l'équipe de Chan a montré une corrélation entre l'hypoxie chronique et l'augmentation de la radiosensibilité dans une lignée cellulaire de carcinome de poumon. Cette corrélation est due à une diminution de la synthèse de protéines impliquées dans les voies de réparation de l'ADN et notamment la protéine RAD51, un médiateur clé de la recombinaison homologue

(Chan et al., 2008). Il a également été montré, dans d'autres modèles cancéreux, une diminution de l'expression de la protéine RAD51 en condition hypoxique (Bindra et al., 2005). Cette diminution de RAD51 est corrélée à une instabilité génétique induite par la dérégulation des mécanismes de réparation de l'ADN (Bindra et al., 2005). Aussi, il serait intéressant d'étudier l'expression protéique de RAD51 dans les différentes lignées de chondrosarcome après une exposition aux rayons X.

L'hypoxie diminue la survie cellulaire de la lignée JJ012 après irradiation aux rayons X. Cependant, nous n'avons pas observé de modification ni de l'apoptose ni de la sénescence. Néanmoins, nous avons mis en évidence une augmentation du pourcentage de Sub-G1, caractéristique de l'apoptose. Cette augmentation peut s'expliquer par le fait que l'hypoxie active la voie extrinsèque de l'apoptose dans la lignée JJ012 en réponse aux rayons X. En effet, cette dernière a été détectée par marquage d'Apo2.7, une protéine mitochondriale intervenant dans la voie intrinsèque de l'apoptose. Aussi, il sera nécessaire d'étudier le clivage des caspases 8 et 10, spécifiques de la voie extrinsèque, par western blot.

De plus, d'autres types de mort cellulaire restent encore à être identifiés. En effet, la nécrose peut être induite par des irradiations aux rayons X mais elle reste peu fréquente et semble être dose dépendante (Kim et al., 2015). Ce mécanisme de mort incontrôlée est caractérisé par une vacuolisation nucléaire et une dégradation aléatoire de l'ADN (Kim et al., 2015). La catastrophe mitotique est une forme de mort cellulaire peu connue qui, avec l'apoptose, est majoritairement induite en réponse aux irradiations. Ce type de mort est déclenché par des mitoses aberrantes et mis en place soit lors de la mitose, soit pendant l'interphase suivante. Elle s'accompagne d'altérations nucléaires (micronucléation et multinucléation), utilisées comme marqueur morphologique de la catastrophe mitotique. Son induction par les irradiations est associée à une augmentation de l'expression de la cycline B1 et à l'activité kinase de Cdc2 (Kim et al., 2015). Ainsi, l'analyse de ces deux autres types de mort cellulaire dans les différentes lignées de chondrosarcome après une exposition aux rayons X sera nécessaire.

Conclusion :

Les chondrosarcomes possèdent des réponses différentes aux rayons X selon la teneur en oxygène. En effet, l'hypoxie a un effet radiosensibilisateur ou n'a pas d'effet en fonction de la lignée de chondrosarcome. Cet effet radiosensibilisateur est caractérisé par une diminution de la survie cellulaire et par une augmentation du pourcentage de cellules en Sub-G1. Cependant, il ne semble pas être associé à l'apoptose ni à la sénescence mais pourrait être dû à un autre type de mort cellulaire.

Conclusion du projet I :

Dans ce premier travail, nous avons mis en évidence que l'hypoxie induit des réponses différentes en fonction du traitement mais également entre les lignées de chondrosarcome. Ainsi, nous montrons que, contrairement à ce qui est communément admis, l'hypoxie n'a pas d'effet sur la sensibilité au cisplatine dans certaines lignées de chondrosarcome alors qu'il augmente la résistance à cette drogue dans la lignée JJ012. Cette résistance est associée à la réduction de l'apoptose. Mais, nous montrons que l'hypoxie augmente la sensibilité aux rayons X de cette même lignée. Cet effet est dû à une diminution de la croissance cellulaire, alors que nous n'avons pas observé de modification ni de l'apoptose ni de la sénescence. Une hypothèse pour expliquer cette différence de réponse à l'hypoxie peut être due au fait qu'elle diminue le nombre de cassures à l'ADN induites par le cisplatine ou l'augmente en réponse aux irradiations par rayons X. Pour y répondre, nous évaluerons le nombre de cassures à l'ADN induites par les deux traitements dans les quatre lignées de chondrosarcome en normoxie et en hypoxie, en étudiant l'histone phosphorylé γ H2AX, une protéine intervenant dans le recrutement des protéines de remodelage de la chromatine et de réparation au niveau des sites de cassures double-brin, par cytométrie en flux.

L'analyse des données de transcriptomique suggère que l'hypoxie augmente la résistance de la lignée JJ012 au cisplatine en activant la voie de signalisation ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase). Cette voie intervient dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. Tout d'abord, il sera nécessaire de valider, par RT-PCR en temps réel, l'expression des gènes qui sont impliqués dans la voie ERK et induits par l'hypoxie en réponse au cisplatine. Ensuite, si l'hypoxie régule l'expression de ces gènes uniquement dans la lignée JJ012, nous étudierons leur expression protéique et nous effectuerons des tests fonctionnels afin de valider leur implication ou non dans l'augmentation de la résistance au cisplatine induite par l'hypoxie dans cette lignée.

Ces résultats montrent que les chondrosarcomes utilisent des mécanismes de régulation cellulaire différents, d'où l'importance de mener des études sur plusieurs lignées cellulaires de chondrosarcome afin de mieux prédire la réponse aux traitements dans cette famille de tumeurs hétérogènes.

PROJET II

STRATEGIE THERAPEUTIQUE INNOVANTE DES
CHONDROSARCOMES :

EVALUATION DE NOUVELLES MOLECULES PHARMACOLOGIQUES

Introduction du projet II :

Comme nous venons de le voir, les chondrosarcomes sont résistants à un traitement par le cisplatine ou aux rayons X. C'est pourquoi, il est nécessaire d'identifier de nouvelles thérapies. Au sein du laboratoire, il a été mis en évidence que les chondrosarcomes de haut grade expriment la protéine méthyltransférase EZH2. Les chondrosarcomes de bas grade, les enchondromes (tumeurs cartilagineuses bénignes) et le cartilage adulte normal quant à eux, l'expriment peu. De plus, il a été établi *in vitro* que le DZNep inhibe l'expression protéique d'EZH2, réduit la triméthylation de H3K27, induit l'apoptose et réduit la migration cellulaire dans les lignées de chondrosarcome CH2879 et SW1353 (Girard et al., 2014).

Afin d'élargir ce travail de thèse à d'autres chondrosarcomes et de mieux caractériser les effets observés, mes objectifs pour ce second projet étaient :

- de tester les effets pro-apoptotiques du DZNep sur d'autres lignées cellulaires et sur des cultures primaires de chondrosarcome dans un modèle de culture cellulaire en monocouche et en trois dimensions.
- d'analyser les effets du DZNep *in vivo* sur des xéno greffes de chondrosarcome et ses effets secondaires après injections chroniques dans des souris.
- d'étudier si l'effet pro-apoptotique du DZNep est lié à l'inhibition d'EZH2 car certaines études ont montré que le DZNep pouvait induire l'apoptose dans les cellules tumorales par un mécanisme indépendant de cette méthylase (Xie et al., 2011).
- d'étudier l'effet du DZNep en association avec le cisplatine. En effet, le DZNep semble avoir un effet sensibilisateur à la chimiothérapie (Unland et al., 2015; Nakagawa et al., 2014; Avan et al., 2012; Abbosh et al., 2006).
- d'évaluer le potentiel thérapeutique du GSK-J4, un inhibiteur des histone déméthylases UTX et JMJD3, seul ou en association avec le cisplatine car il a récemment été identifié comme un agent anti-tumoral efficace (Hashizume et al., 2014; Ntziachristos et al., 2014).

Ce deuxième projet est présenté sous forme de cinq articles :

- Identification of an easy-to use 3D culture model to investigate invasion and anticancer drug response in chondrosarcomas (BMC Cancer 2017 17:490).

- The antitumoral effect of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaneplanocin A, does not require EZH2 inhibition in chondrosarcomas (en cours de soumission).
- Effect of chronic injections of S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaneplanocin A on male immunocompetent mouse: Behaviour and tissue analysis (en cours de soumission).
- The S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaneplanocin A (DZNep) enhances the response to platinum-based therapy in chondrosarcomas (en préparation).
- Impact of H3K27 demethylase inhibitor GSKJ4 on chondrosarcoma cells in combination with cisplatin (en cours de soumission).

I) Validation de l'effet du DZNep dans un modèle de culture en trois dimensions

Contexte :

Depuis de nombreuses années, il a été montré que l'effet des traitements en monocouche sur des cellules cancéreuses était surestimé par rapport aux études in vivo du fait de la différence du microenvironnement cellulaire et de la matrice extracellulaire. Par ailleurs, cette matrice joue un rôle important dans la réponse aux agents thérapeutiques dans les chondrosarcomes puisqu'il a été montré que la diffusion de la doxorubicine dans ces tumeurs était fortement limitée due à la formation d'un réseau de fibres de collagène (Monderer et al., 2013). Aussi, avant de tester l'effet du DZNep in vivo, nous avons voulu valider son efficacité dans un modèle d'étude en 3D. En effet, les cellules cultivées in vitro dans un modèle tridimensionnel sont capables de mimer un microenvironnement naturel et de sécréter une matrice extracellulaire. Au cours de ce travail, nous avons testé la capacité d'une culture cellulaire en alginate à permettre l'expression d'une matrice cartilagineuse par les chondrosarcomes, sachant que ce modèle a été validé sur les chondrocytes (Duval et al., 2012), et nous avons évalué l'efficacité du DZNep. Les effets ont ensuite été comparés aux résultats in vivo.

Résultats :

Les lignées cellulaires de chondrosarcome CH2879, SW1353 et JJ012 ont été cultivées en monocouche ou dans des billes d'alginate. L'étude de la prolifération cellulaire par comptage cellulaire et par mesure de l'ATP a montré que les lignées SW1353 et JJ012 prolifèrent moins vite que la lignée CH2879 dans les billes d'alginate pendant quatre semaines. De plus, l'analyse par RT-PCR des gènes de la matrice extracellulaire a mis en évidence que les lignées cultivées dans des billes d'alginate expriment davantage de matrice hyaline qu'en monocouche, en augmentant l'expression du collagène de type II et de COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein).

L'invasion cellulaire des chondrosarcomes a été évaluée par numération des cellules s'étant échappées des billes et ayant adhéré au plastique. Nous avons montré que la lignée CH2879 a une capacité d'invasion beaucoup plus importante que les lignées SW1353 et JJ012, en cohérence avec le grade des tumeurs d'origine.

Enfin, la réponse au traitement des chondrosarcomes par le cisplatine ou par le DZNep a été évaluée en monocouche et dans des cultures 3D de lignées cellulaires. Alors que les trois lignées sont sensibles en monocouche au cisplatine, ce dernier ne réduit pas la survie cellulaire et n'induit pas d'apoptose en 3D, suggérant un rôle de la matrice dans la réduction de l'accessibilité aux drogues, comme dans le stroma des chondrosarcomes in vivo, permettant ainsi de valider notre modèle d'étude. En revanche, le DZNep réduit la survie cellulaire et induit l'apoptose des lignées de chondrosarcome cultivées dans des billes d'alginate mais de manière moins importante qu'en monocouche. Ces résultats ont été confirmés in vivo sur la lignée JJ012.

Conclusion :


La culture 3D des chondrosarcomes encapsulés dans des billes d'alginate permet de reconstituer un microenvironnement physiologique se rapprochant du modèle in vivo. Ce système permet aux chondrosarcomes de produire une matrice hyaline et constitue un moyen simple de tester l'invasion et la survie cellulaire dans des cultures à long terme. De plus, ce modèle permet de tester l'efficacité d'agents thérapeutiques. Ainsi, l'utilisation de billes d'alginate comme modèle de culture 3D nous a permis de tester l'efficacité du DZNep avant de réaliser des expériences in vivo.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Identification of an easy to use 3D culture model to investigate invasion and anticancer drug response in chondrosarcomas

Eva Lhuissier¹, Céline Bazille^{1,2}, Juliette Aury-Landas¹, Nicolas Girard¹, Julien Pontin¹, Martine Boittin¹, Karim Boumediene¹ and Catherine Bauge^{1*} 

Abstract

Background: Cytotoxic efficacy of anticancer drugs has been widely studied with monolayer-cultured cancer cells. However, the efficacy of drugs under two-dimensional (2D) culture condition usually differs from that of three-dimensional (3D) one. In the present study, an *in vitro* tumor tissue model was constructed using alginate hydrogel, and *in vitro* cytotoxic efficacy of two anticancer drugs (cisplatin and DZNep) was investigated in chondrosarcomas, and compared to *in vivo* response.

Methods: Three cell lines derived from human chondrosarcomas, CH2879, JJ012 and SW1353, were embedded in alginate hydrogel. Proliferation and survival were assayed by ATP measurement using Cell Titer-Glo luminescent cell viability assay kit, and by counting viable cells in beads. Collagen and COMP expression was determined by RT-PCR. Invasion/migration was estimated by counting cells leaving alginate beads and adhering to culture dish. Then, chondrosarcoma response to cisplatin and DZNep was compared between cells cultured in monolayer or embedded in alginate, and using chondrosarcoma xenografts in nude mice.

Results: Chondrosarcomas survived at least for 8 weeks, after embedment in alginate. However, only CH2879 cells could proliferate. Also, this cell line is more invasive than SW1353 and JJ012, which was coherent with the grade of their respective primary tumors. Furthermore, the expression of type II collagen was higher in chondrosarcomas cultured in 3D than in 2D. Interestingly, this 3D culture system allows to validate the absence of response of chondrosarcomas to cisplatin, and to predict the efficiency of DZNep to reduce chondrosarcoma growth *in vivo*.

Conclusions: This study validates alginate beads as a relevant 3D model to study cancer biology and tumor responses to biological treatments.

Keywords: Alginate, Chondrosarcomas, Cancer, 3 dimensional culture, Antitumoral drug

* Correspondence: catherine.bauge@unicaen.fr

¹Normandie Université, UNICAEN, EA7451 BioConnecT, 14032 Caen, France
Full list of author information is available at the end of the article

Background

Chondrosarcoma (CHS) is a malignant tumor characterized by the presence of a cartilaginous extracellular matrix. It represents the second most common primary bone tumor, and generally arises in adults aged between 30 to 70 years. The treatment consists on resection of the tumor, because of its resistance to conventional radiotherapy and chemotherapy [1, 2]. This resistance is linked to endogenous and external factors, such as mutations of genes involved in DNA repair and apoptosis [3, 4], or tumoral microenvironment [5]. In particular, the cartilaginous extracellular matrix (ECM) around chondrosarcomas reduces drug diffusion, restraining their delivery to the tumor cells [6].

Most studies aiming to investigate chondrosarcoma biology and response to anticancer drugs are done using chondrosarcoma cell lines cultured in monolayer. Whereas this method is useful to understand some processes and mechanisms, it often fails to mimic the natural tumor microenvironment, which is an important parameter in tumor signaling and drug response [7, 8]. In two-dimensional (2D) culture systems, cells are forced to adopt a planar morphology [9], which may alter cell proliferation, migration, invasion, apoptosis, as well as matrix production. As a result, cells generally display a dramatic reduction of malignant phenotype when compared to the tumor [10], and do not respond to drugs as in *in vivo* conditions. In addition, in the case of chondrosarcomas, cells fail to produce their characteristic abundant hyaline extracellular matrix. Therefore, the traditional 2D cell cultures cannot ideally recapitulate *in vivo* physiological conditions [6, 11].

At contrary, three-dimensional (3D) cell culture systems are more likely to mimic natural tumor microenvironment *in vitro* [12]. Cells can migrate and have cell-matrix interactions and cell-cell contacts in all directions, allowing cell responses that more closely mimic events occurring *in-vivo* during cancer formation and progression [12]. Thereby, tumoral cells that grow in a 3D environment, tend to develop shapes and phenotypes observed *in vivo* [13, 14], display higher aggressiveness, overexpress pro-angiogenic growth factors and acquire drug resistance [15, 16]. That is why 3D culture models are becoming essential tools in cancer research, notably for testing the efficacy of anticancer drugs.

Several 3D models are developed in oncology field, such as spheroids or matrix-embedded tumor cells [17, 18]. Spheroids which constitute the simplest *in vitro* 3D model, are known to permit endogenous ECM deposition, cell-cell matrix interactions, and to mimic physiological barriers to drug delivery *in vivo*. Another 3D culture model consists to embed cells in

natural or synthetic substrates. Biomaterials such as matrigel, alginate or collagen I are biologically active scaffolds that provide exogenous biological signals regulating cell growth and response to drugs. Synthetic and inert matrices are also able to sustain cultures in close proximity, and enable accumulation of newly secreted and defined ECM proteins by the embedded cells. All these models offer the possibility to simultaneously incorporate different cell types, such as fibroblasts, endothelial cells, adipocytes or immune cells. These co-culture systems, as tumor slices or explant cultures, permit to mimic tumor heterogeneity. Indeed, in addition to tumor cells, these cancer-associated cell types produce the non-cellular fraction of the tumor microenvironment, composed by the extracellular matrix, growth factors, cytokines, chemokines and exosomes, and interact with tumoral cells to impact biological features such as proliferation, migration as well as cellular response to drugs. These co-culture systems combining stromal and tumoral cells seem to be the best methods to model heterotypic cell-cell interactions. However, the implementation of standardized co-cultures that include different cell types remains challenging, and reducing the tumor ecosystem to a few of the main components that are expected to be involved in the tumor biology may be enough to establish models with superior predictive power over the conventional 2D mono-cultures of tumor cells [18, 19].

Only two studies used 3D culture for investigate chondrosarcoma drug responses have been published [4, 6]. Both of them used chondrogenic three-dimensional pellet model, which consists to culture high density cells in pellets in a chondrogenic medium composed in particular of growth factors, such as TGF β 3 or BMP6. This culture condition allows long term culture and permits cells to differentiate toward chondrogenic phenotype characterized by synthesis of a hyaline matrix. However, this model required the addition of exogenous growth factors which may interfere with chondrosarcoma biology and drug response. That is why we looked for another 3D culture which does not require the addition of growth factors, but which allows chondrogenic differentiation and provide a pathophysiological context that could replicate the chondrosarcoma microenvironment compared to monolayer cultures in 2D system.

Interestingly, chondrocytes (normal cartilaginous cells) encapsulated in alginate present characteristics closer to native cartilage cells than that cultured in 2D [20]. They re-express an extracellular matrix rich in aggrecan and collagen type II, characteristic of hyaline cartilage tissue [21–24], suggesting that this natural biomaterial may be used for 3D culture of chondrosarcomas. Alginate scaffold has advantages as an animal-free product, non-

toxic, biodegradable, and easily usable for embedding and next recovering cells, and with significant stability at room temperature [25]. It is a polysaccharide hydrogel composed of β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid obtained from particular brown algae species. Alginate comprises 99% of water, but still retains high plasticity and mechanical strength. Gelling occurs almost instantaneously by cross-linking with divalent ions, like Ca^{2+} , allowing cell entrapment under physiological conditions [26]. Another advantage of alginate hydrogel is the possibility to recover cells from scaffold with a non-enzymatic solution that dissolves alginate within few minutes, but leaves the cells intact for further processing and/or analysis.

Since we have previously shown the benefit to use 3D alginate culture to favor chondrocyte differentiation and to study their biology, we hypothesized that a similar model could permit to culture chondrosarcomas and preserve their chondrogenic phenotype. In the present study, we evaluated the use of this 3D culture system to study chondrosarcoma biology and predict drug response. We validated as null hypothesis that cisplatin has no cytotoxicity in this 3D model, before testing another putative anti-tumoral drug, namely DZNep, which has been shown to induce apoptosis in chondrosarcomas cultured in monolayer. Cytotoxicity in 3D models was compared to *in vivo* results.

Methods

Cell culture

CH2879 [27], JJ012 [28], and SW1353 (from ATCC) chondrosarcoma cell lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640's medium (RPMI 1640) or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza AG, Verviers, Belgium), respectively, supplemented with 10% (*v/v*) fetal bovine serum (FBS) (Lonza AG), penicillin and streptomycin, and then incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . Cells were passaged twice a week.

For 3D culture, cells were suspended at a density of 2×10^6 cells/mL in sodium alginate. Beads were formed as previously described [20–22] by dispensing drops of the suspension from a 22-gauge needle in sterile CaCl_2 100 mM. Thereafter, the beads were washed with NaCl 0.15 M and incubated in DMEM or RPMI according to chondrosarcoma cell lines. Photographies were taken using AxioCam MRc5 camera (Zeiss) under VisiScope series 400 microscope (VWR). For some experiments, beads were dissolved using a dissociation solution (55 mM sodium citrate, 150 mM NaCl) before cell harvesting by centrifugation.

Viability and proliferation assay

Viability and proliferation of chondrosarcomas were estimated for 8 weeks after cell-embedding in alginate beads

by measurement of ATP, using the Cell Titer-Glo luminescent cell viability assay kit (Promega, Charbonnières les bains, France). Cells were lysed directly inside beads according to the manufacturer's instructions. Luminescence was measured using Victor 3 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France). All experiments were repeated 4 times.

Alternatively, cells were counted after bead dissociation. Ten alginate beads were dissolved, and cells were gently harvested. Then, viable cells were counted using Countess II (Life Technologies) after trypan blue exclusion. Three independent experiments were performed.

Apoptosis assay

After dissolution of alginate, cells were stained with phycoerythrin (PE)-conjugated antibody directed against APO2.7 (clone 2.7 7A6) according to the manufacturer's condition (Beckman Coulter, Villepinte, France) as previously reported [29]. Cell fluorescence was measured using Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) on the technical platform of SFR 146 (Structure Federative de Recherche 146, Caen, France). A minimum of 10,000 events were analyzed in each sample using Kaluza 1.5a software. Three independent experiments were performed.

RNA isolation and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA were extracted using Trizol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). For monolayer cultures, Trizol was directly added to cell layer in the culture dish. For 3D culture, ten alginate beads were dissolved in 55 mM sodium citrate, 150 mM NaCl and gently centrifuged, before adding Trizol on the cell pellet. Next, extraction was performed according to the manufacturer's conditions (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Thereafter, RNA (1 μg) was treated with DNase-I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), and reverse transcribed into cDNA in the presence of oligodT and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT). The reaction was carried out at 37 °C for 1 h followed by a further 10-min step at 95 °C. Amplification of the generated cDNA was performed by real-time PCR in Step One Plus Real Time PCR apparatus (Applied Biosystems) with appropriate primers. The relative mRNA level was calculated with the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method.

Cell invasion assay

To evaluate invasion ability of chondrosarcomas, cells were embedded in alginate beads. After 1, 2 or 3 weeks of 3D cultures, beads were transferred in a new culture dishes (15 or 20 beads/well), then incubated for

additional 4 days. At the end of that culture period, cells adhering to the bottom of the culture dishes were counted. Invasion ability was evaluated as the number of adherent cells divided by number of beads present in the culture dish. All experiments were repeated three times.

Drug treatments and cell viability

Cisplatin [*cis*-diammineplatinum(II) dichloride] was purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France) and dissolved in DMSO. DZNep-HCl was purchased from Tocris (Lille, France) and dissolved in PBS.

Based on previous works, cells were treated for 3 days with cisplatin (10 μM), or for 14 days with DZNep (1 μM). The medium was changed twice during the treatment of DZNep (day 5 and 10). This condition has been defined as dose and time-treatment sufficient to induce apoptosis in chondrosarcomas. Experiments were performed in 96-well plates (1 bead per well).

After treatments, cell viability was estimated using the Cell Titer-Glo luminescent cell viability assay kit. Luminescence was measured using Victor 3 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France).

Xenograft of chondrosarcomas in nude mice

Animal experimental procedures were performed according to local legislation, and procedures were approved by ethics committee (Comité d’Ethique de Normandie en Matière d’Expérimentation Animale, agreement #03968.01). Mice were provided and kept in the animal facility (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Caen, France) under controlled temperature and light conditions (temperature 23 ± 2 °C, 12 h reversed light-dark cycle). Animals had ad libitum access to food and water. Each animal was humanely handled throughout the experiment in accordance with internationally accepted ethical

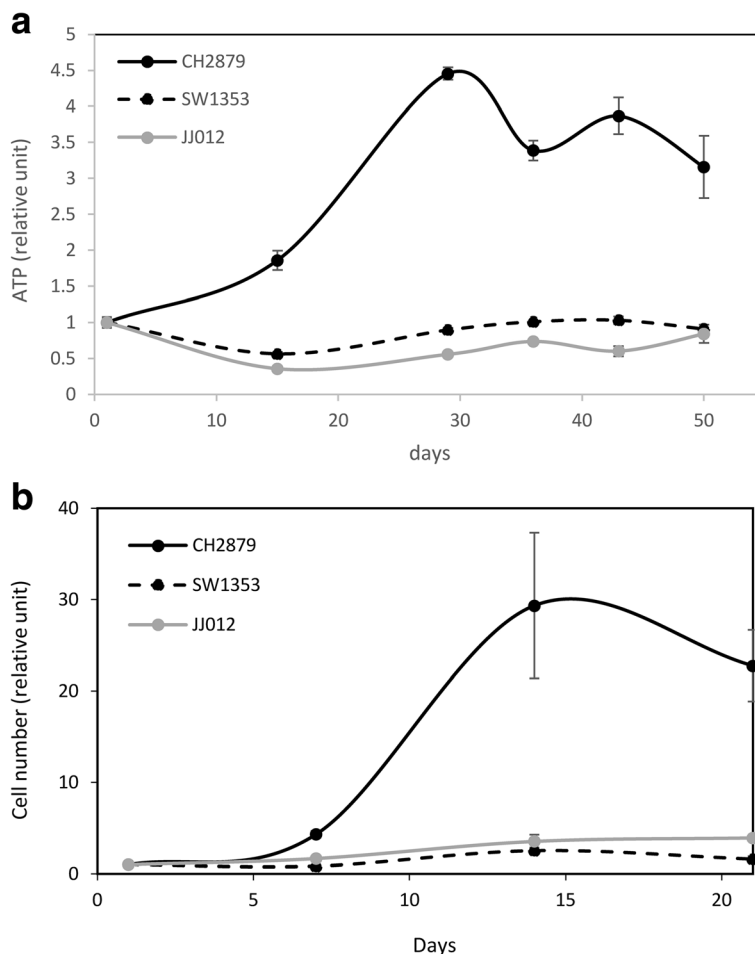


Fig. 1 Chondrosarcomas survives in alginate beads. Chondrosarcomas were embedded in alginate beads and viability were evaluated for several weeks. **a** Metabolic activity was evaluated by ATP assay using Cell Titer-Glo luminescent cell viability assay kit (Promega). For each cell line, values were normalized to luminescence values obtained at day 1. Graph shows means ± SEM of 4 independent beads. **b** Viable cells inside beads were also counting. Cell number was normalized to values obtained at day 1. Graph shows means ± SEM of 3 independent experiments

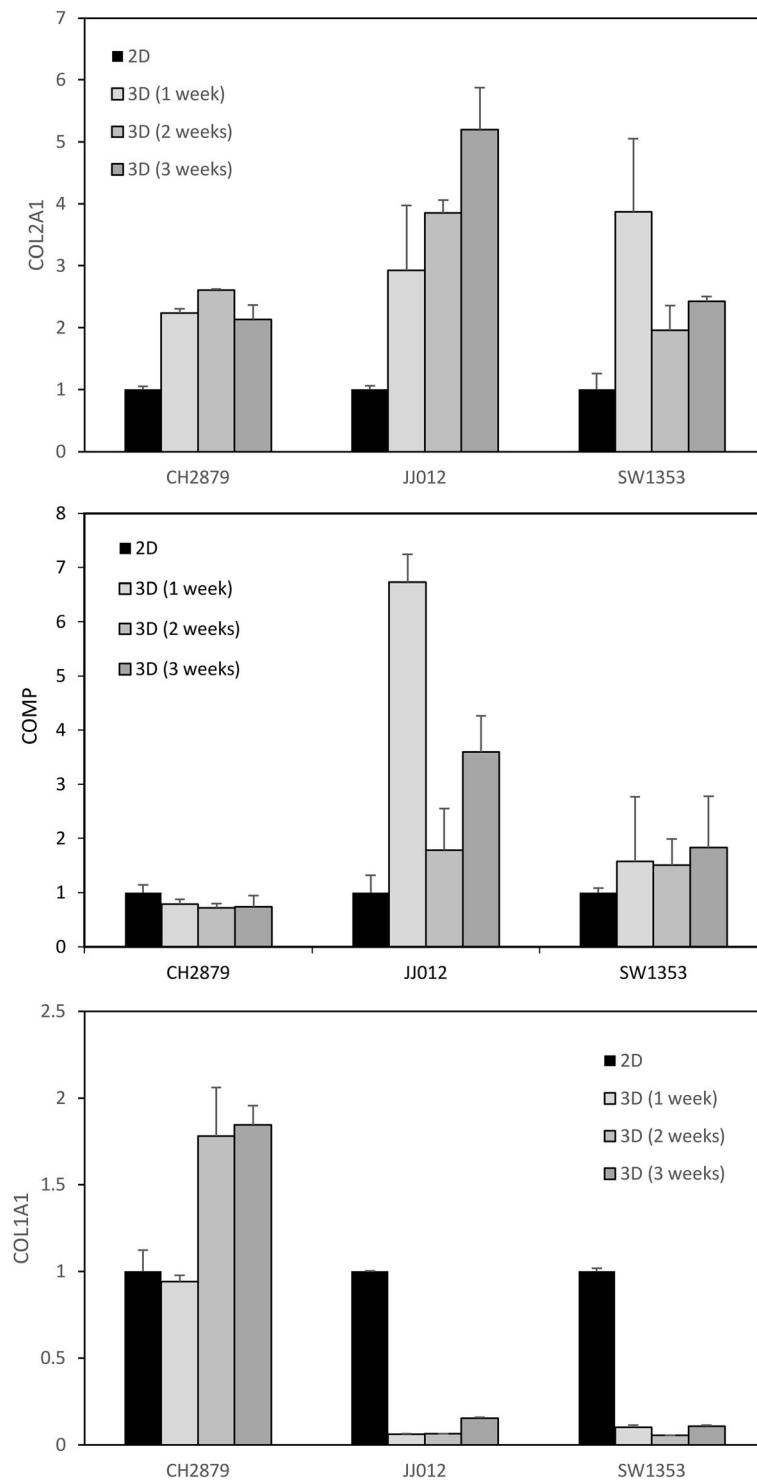


Fig. 2 3D culture in alginate favors expression of collagen type II by chondrosarcomas. Chondrosarcomas were cultured in monolayer, or embedded in alginate for 1, 2 or 3 weeks. Then, alginate was dissolved and RNA extracted. Collagen type II and type I, and COMP mRNA levels were assayed by real-time RT-PCR after normalization to RPL13 signal. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments

principles for laboratory animal use and care, and all efforts were made to minimize animal suffering. Euthanasia was performed using CO₂ inhalation.

Nude mice (11 weeks old, males) were injected subcutaneously with 100 µl of matrigel containing 10⁶ JJ012 cells. When the tumors were palpable, mice were treated by peritoneal injection for 25 days. Tumors were measured by a caliper and tumoral volume calculated by

the following eq. $(L \times w^2) / 2$ (with L corresponding to length and w to width).

Results

Chondrosarcomas embedded in alginate survived for at least two months

First, we investigated the proliferation of chondrosarcomas embedded in alginate. Three different cell lines

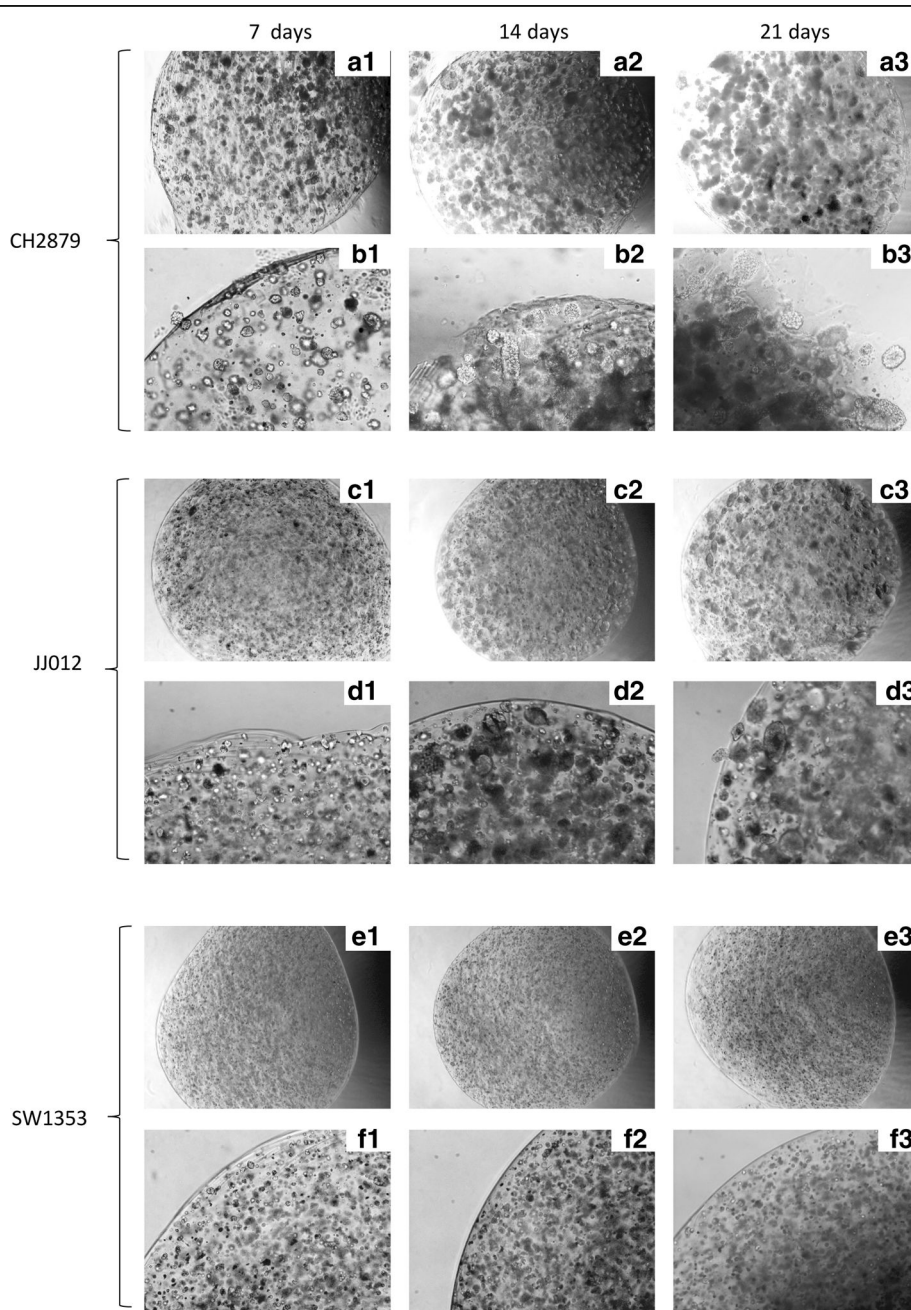


Fig. 3 Morphology of beads containing CH2879 differs from other beads. Chondrosarcomas CH2879 (a and b), JJ012 (c and d) and SW1353 (e and f) were cultured in alginate beads for 1, 2 or 3 weeks. Beads were photographed each week. Representative pictures (magnification ×4 (a, c and e) and ×10 (b, d, and f)) are showed for each cell line

(CH2879, JJ012 and SW1353) were embedded at 2 million cells/mL alginate. Then, viability was evaluated by metabolic assay (ATP measurement). All cell lines survived for at least 8 weeks. However, they did not proliferate in beads, except for CH2879 which did it for 4 weeks (Fig. 1a). Counting of viable cells inside beads corroborated that CH2879 cells proliferated faster than the other chondrosarcoma cell lines (Fig. 1b).

Chondrosarcomas embedded in alginate produced a hyaline matrix

Macroscopically, we observed a clouding/opacification of beads cellularized with JJ012 and SW1353 cells. This white appearance of beads suggests that these chondrosarcomas produced a hyaline-like matrix. To validate this hypothesis, we investigated the expression of the major marker of hyaline cartilage matrix, namely type II collagen. In agreement with macroscopic observation, chondrosarcomas embedded in alginate expressed higher level of type II collagen (Fig. 2a). In addition, JJ012 and SW1353 also increased the expression of cartilage oligomeric matrix protein (COMP, also known as thrombospondin-5), a hyaline ECM gene also known to be more expressed in chondrosarcoma tumors than in tumor derived-cells cultured in monolayer [6]. In contrast, the expression of collagen type I, which is expressed in dedifferentiated chondrocytes and

fibrocartilage, was lower in JJ012 and SW1353 beads cultured in 3D compared to 2D. This indicates that 3D culture of CHS in alginate favors the production of a hyaline-like matrix compared to 2D culture, and permits re-expression of genes which are normally present in tumor.

Alginate culture model allows evaluation of cell invasion or migration ability

Bead observations revealed that CH2879 cells tended to escape from beads, suggesting invasion or migration abilities (Fig. 3). To investigate this hypothesis, we compared the number of cells outgoing from the beads after 1, 2 and 3 weeks (Fig. 4). This assay revealed a strong heterogeneity of invasion/migration ability according to chondrosarcoma cell lines. Whatever the time of culture, CH2879 cells were much more invasive than the two other cell lines tested. This is consistent with the grade of chondrosarcomas. CH2879 is, indeed, derived from a grade 3 chondrosarcoma (which is known to be very invasive), whereas SW1353 and JJ012 are derived from grade 2 chondrosarcomas (less invasive).

Chondrosarcomas cultured in 3D were resistant to cisplatin

Next, we compared the sensitivity of chondrosarcomas to drugs as a function of their culture methods. First, we

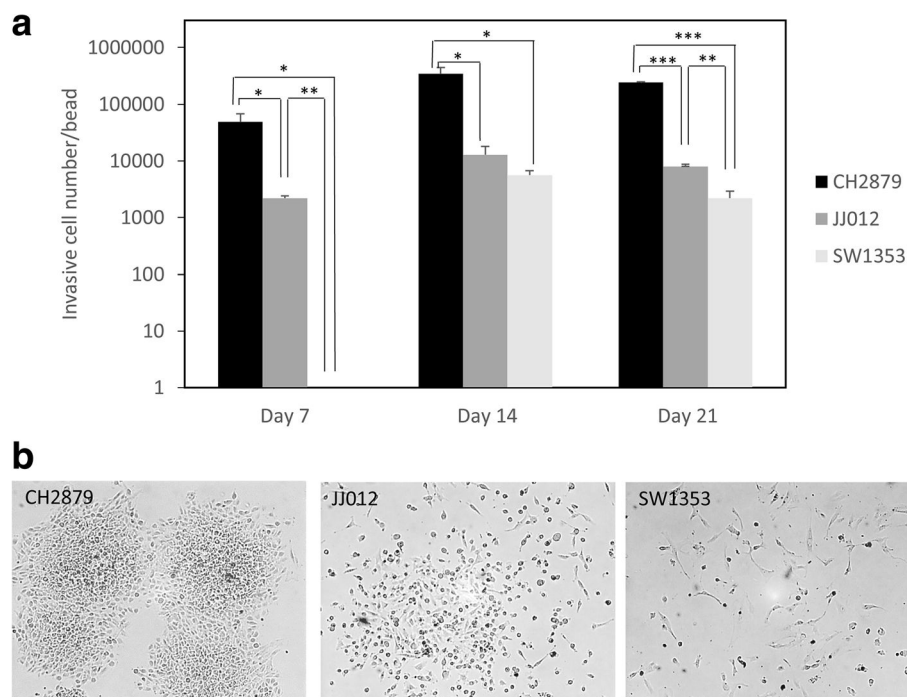


Fig. 4 CH2879 cells are more invasive than JJ012 and SW1353. Chondrosarcomas were cultured in alginate beads for 3 weeks. Next, beads were transferred in a new well, and four days later, adherent cells were counted (**a**) and photographed (**b**). Values represent means \pm SEM of three independent wells containing each 15–20 beads. *: p -value <0.05; **: p -value <0.01; ***: p -value <0.001

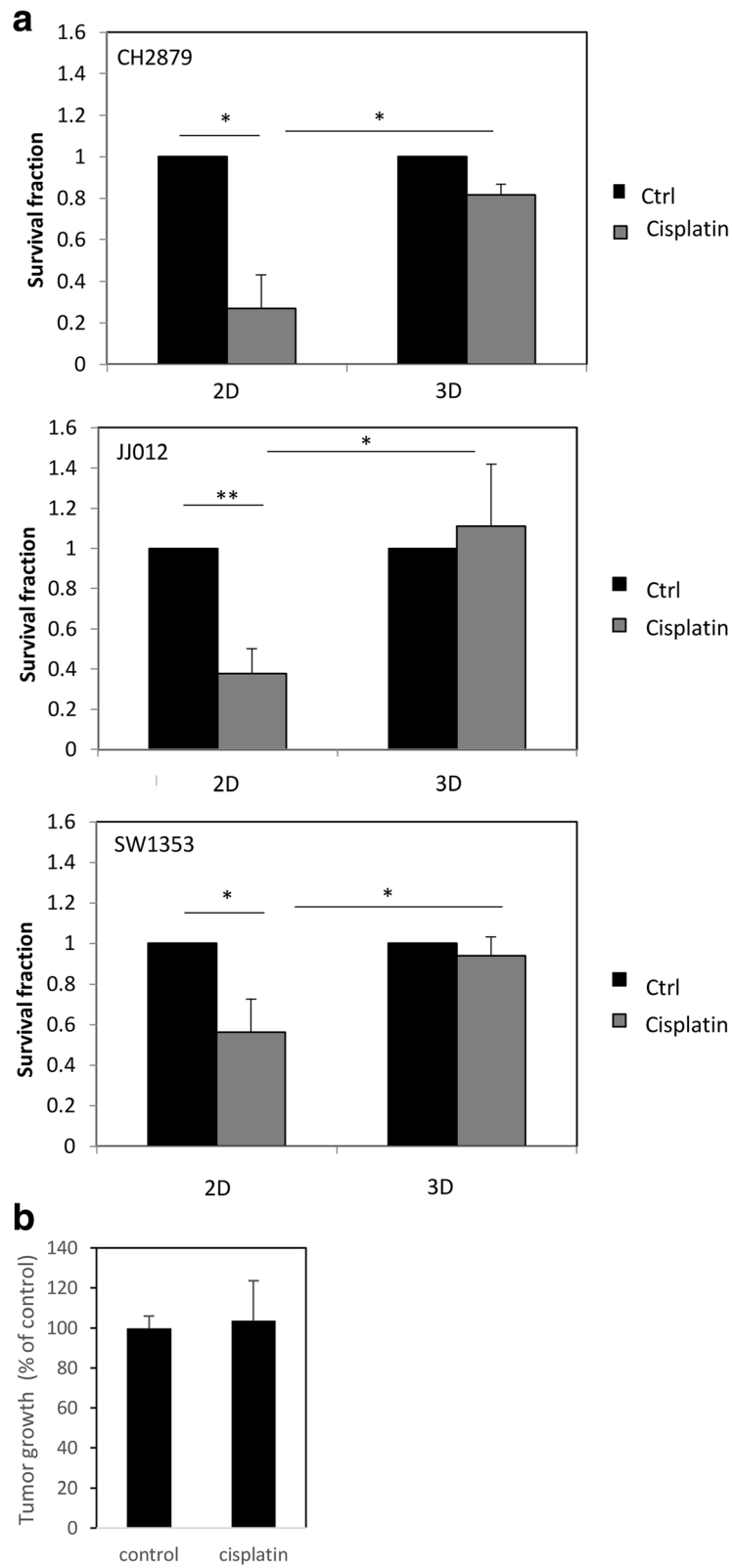


Fig. 5 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 5 Cisplatin does not reduce the viability of chondrosarcomas embedded in alginate or engrafted in nude mice. **a** Chondrosarcomas cultured in monolayer or embedded in alginate for at least 2 weeks were treated with cisplatin (10 μ M) for 3 days. Then, viability was evaluated and compared to untreated cells. Values represent means \pm SEM of 3 independent experiments. *: p -value <0.05; **: p -value <0.01. **b** Nude mice were injected with 100 μ l of matrigel containing 10^6 chondrosarcoma cells. When the tumors were palpable, mice were treated for 25 days with cisplatin (i.p., 2 mg/kg, three times per week). Tumors were measured by a caliper and tumoral volume calculated by the following eq. ($L \times w^2$) / 2 (with L corresponding to length and w to width)

assayed the toxicity of a widely used chemotherapeutic agent for solid tumors, namely cisplatin. Cisplatin ($\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$, as called cis-diamminedichloroplatinum(II)) is a platinum-based drug, approved as an anticancer agent since 1978, which causes apoptosis by DNA cross-linking. Whereas it is efficient against many cancers, it is not able to treat chondrosarcomas. This resistance has been attributed to the production of an abundant matrix by chondrosarcomas that cannot be mimicked in monolayer cultures [4, 6]. So, we initially tested the null hypothesis that cisplatin has no toxicity in chondrosarcomas cultured in 3D [6]. We then compared cell survival of chondrosarcomas cultured in monolayer or embedded in alginate (Fig. 5a). As expected, cell viability was strongly reduced by cisplatin when chondrosarcomas were cultured in 2D, but not in 3D. Accordingly, cisplatin-induced apoptosis was strongly reduced when cells were embedded in alginate compared to monolayer cultures (Table 1). This is consistent with the absence of toxicity of cisplatin observed in chondrosarcoma xenografts in *nude* mice (Fig. 5b).

DZNep reduced survival of chondrosarcomas, even cultured in 3D

We pursued by testing the effect of 3-deazaneplanocin (DZNep), a new anticancer drug (still in preclinical stage), on chondrosarcoma survival [29, 30]. This adenosine analog is a potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, resulting in cellular accumulation of S-adenosylhomocysteine, which in turn causes inhibition of S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases, particularly enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), leading to apoptosis of tumoral cell by a mechanism not yet totally elucidated [29, 30].

Interestingly, in contrast to cisplatin treatment, DZNep reduced cell survival and induced apoptosis in

chondrosarcomas cultured in 3D (Fig. 6a and Table 2). These results are coherent with *in vivo* observations showing that DZNep is able to reduce tumoral volume of chondrosarcoma xenograft in nude mice (Fig. 6b).

Discussion

Cancer researchers typically rely on 2D *in-vitro* studies and small animal models to investigate the complex mechanisms of tumor invasion and anticancer drug response. However, 2D culture systems often fail to mimic the natural tumor microenvironment, such as cell–cell communication and cell–extracellular matrix interaction, which is essential in tumorigenesis and drug response. Meanwhile, animal models are more accurate representative of tumor environment, but are difficult to use when several conditions are required. That is why there is need to develop relevant preclinical models reproducing natural tumor microenvironment, and easily usable for large scale screening. In particular, chondrosarcomas, as chondrocytes, tend to lose their ability to produce hyaline cartilaginous matrix in monolayer cell cultures. In this paper, we describe a new 3-dimensional culture method using alginate beads, which has advantage to permit hyaline cartilage production by chondrosarcomas without adding any growth factor, and to easily investigate invasion/migration ability and drug response of tumor cells. This model provided a predictive *in vitro* cell-based assays to study cancer drug efficacy in chondrosarcomas.

Based on our previous works showing the benefit to culture cells in alginate scaffold to favor production of hyaline cartilage matrix [21, 22], we developed a close strategy for *in vitro* reconstruction of chondrosarcoma microenvironment. We demonstrated here that alginate microencapsulation of chondrosarcoma cells offers numerous advantages. First, it is a robust culture system that allows long term culture, which permits the re-expression of a hyaline-like matrix by chondrosarcomas. Also, this scaffold is easy to use. Cells can be quickly embedded inside alginate, and next used for analyses. Invasion/migration ability as well as drug toxicity can be easily evaluated. Also, if necessary, cells can be recovered by alginate dissociation using a non-enzymatic solution, for additional analysis.

Other scaffolds, such as type I collagen or matrigel, could be used for chondrosarcoma cells. However, they

Table 1 Comparison of apoptosis induced by cisplatin in chondrosarcomas cultured in 2D and 3D cultures

	Apoptotic cell fraction		p -value (cisplatin Vs control)	p -value (cisplatin 3D Vs cisplatin 2D)
	Control	Cisplatin		
2D	1.8 \pm 0.4%	59.4 \pm 9.1%	0.009	
3D	25.8 \pm 1.9%	38.8 \pm 1.9%	0.02	0.03

Chondrosarcoma cells were cultured in monolayer (2D) or embedded in alginate (3D). Then, cells were treated with 10 μ M cisplatin. Three days later, apoptosis was assayed. Values represent means \pm SEM of 3 experiments

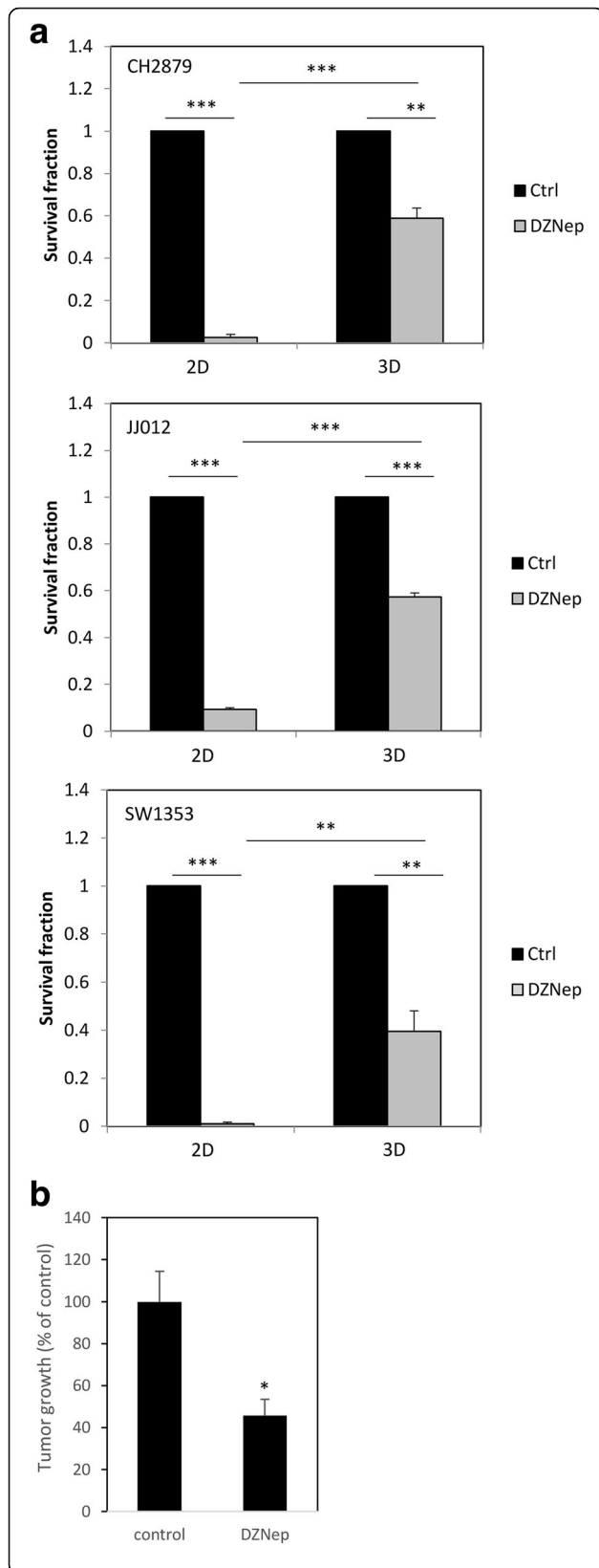


Fig. 6 DZNeP reduces viability of chondrosarcomas embedded in alginate and engrafted in mice. **a** Chondrosarcomas cultured in monolayer or embedded in alginate for at least 2 weeks were treated with DZNeP (1 μ M) for 14 days. Then, viability was evaluated and compared to untreated cells. Values represent means \pm SEM of 3 independent experiments. **: p -value <0.01; ***: p -value <0.001. **b** Tumors were implanted as previously (Fig. 4b) and treated with DZNeP (i.p., 2 mg/kg, three times per week). Tumors were measured by a caliper and tumoral volume is showed. *: p -value <0.05

have limitations, including batch-to-batch variation and an incomplete understanding of their impact on cell behavior [31, 32]. In contrast, hydrogels such as alginate present many advantages over bioactive scaffolds due to their inert properties, biocompatible gelation and ease of cell recovery. Thus, analysis of gene expression or cell survival can be done directly from beads or after alginate dissolution. In addition, we developed here a simple strategy permitting to easily evaluate invasion ability of tumor cells, directly by counting cells escaping from alginate beads.

Alginate hydrogels also provide the possibility of conjugation with defined adhesion ligands or delivery of specific biomolecules (growth factors, pro-angiogenic factors, amongst others) [32], and can be used to co-cultured cells. For instance, Brito and collaborators developed alginate embedded culture of epithelial tumor cells aggregated together with human fibroblasts [33]. Such modifications and co-cultures may be made, in the future, to improve this 3D culture system in order to get again closer to natural tumoral microenvironment.

In this report, we show that 3D culture using alginate hydrogel, permits to evaluate invasion/migration ability of chondrosarcomas, and drug toxicity. Thereby, we evaluated toxicity of two anticancer drugs in chondrosarcomas. First, we used cisplatin, which is a common and effective anticancer drug used to in a large variety of tumors (ovaries, testes, lung, solid tumors...), but not efficient to treat chondrosarcomas [34]. Cisplatin is a potent DNA damaging inducer, leading apoptosis in cancer cells [35]. Mechanisms of chondrosarcoma resistance to cisplatin are not yet completely understood, but it is

Table 2 Comparison of apoptosis induced by DZNeP in chondrosarcomas cultured in 2D and 3D cultures

	Apoptotic cell fraction		p -value (DZNeP Vs control)	p -value (DZNeP 3D Vs DZNeP 2D)
	Control	DZNeP		
2D	0.73 \pm 0.3%	29.6 \pm 1.4%	0.001	
3D	21.7 \pm 1.4%	86.8 \pm 1.7%	0.001	0.001

Chondrosarcoma cells were cultured in monolayer (2D) or embedded in alginate (3D). Then, cells were treated with 1 μ M DZNeP. Fourteen days later, apoptosis was assayed. Values represent means \pm SEM of 3 experiments

generally admitted that this resistance is linked, at least in part, to the abundant hyaline cartilage matrix rounding chondrosarcoma cells, which strongly reduces drug accessibility to cells [5, 6]. As expected, chondrosarcomas encapsulated in alginate, produce a hyaline-like matrix and are not sensitive to cisplatin, contrary to cells cultured in monolayer (2D).

Next, we tested efficiency of DZNep. This drug has recently been used for its ability to inhibit EZH2 methylase and induce death of tumoral cells *in vitro* and *in vivo* [30]. We have previously shown that this pharmacological molecule induces apoptosis of chondrosarcomas cultured in 2D [29]. Before performing *in vivo* experiments using xenograft mouse model, we wanted to test its efficiency in our more accurate *in vitro* model with especially hyaline like-matrix production. We observed that DZNep reduced chondrosarcoma survival in this model, suggesting that, contrary to cisplatin, DZNep could be efficient *in vivo* despite the presence of hyaline matrix. This was confirmed by xenograft experiments in mice showing that, while cisplatin does not modify tumor growth, DZNep is able to reduce it *in vivo*.

Conclusion

Three-dimensional *in vitro* cultures are recognized for recapitulating the physiological microenvironment and exhibiting high concordance with *in vivo* conditions. Taking the advantages of 3D culture using alginate hydrogel, we have developed an *in vitro* tumor model for anticancer drug screening. This system has advantages to permit chondrosarcoma cells to produce a hyaline like-matrix, and offers an easy way to assay cell invasion and survival in long term cultures. The developed model system can be transferred across other type of tumors and will provide a new tool for characterization of tumor progression, drug resistance mechanisms and screening new anticancer drugs *in vitro*.

Abbreviations

2D: Two-dimensional; 3D: Three-dimensional; CHS: Chondrosarcoma; COMP: Cartilage oligomeric matrix protein; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; DZNep: 3-deazaneplanocin; ECM: Extracellular matrix; EZH2: Enhancer of zeste homolog 2; FBS: Fetal bovine serum; MMLV-RT: Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase; PE: Phycocerythrin; RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640's medium; RT-PCR: Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

Acknowledgments

We thank Joel BLOCK (Rush University Medical Center, Chicago, USA) and Antonio LLOMBART-BOSH (University of Valencia, Valencia, Spain) for gracious chondrosarcoma gifts. We also thank Benoit HAELEWYN (Cyceron, Caen, France), Charlotte MARIE (CURB, Caen), Valentine BOUET and Thomas FRERET (UNICAEN, Caen) for their help and advice for animal experiments. We thank Marion BERTHELOT (BioConnect, Unicaen, Caen, France), Marilynne GUILLAMIN (SFR 146 ICORE, Unicaen, Caen), for technical assistance for *in vitro* experiments and cytometry, respectively.

Funding

This work was supported by Ligue contre le Cancer (Normandy committee). The funding body has no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Authors' contributions

EL, CBaz and CBau designed the experiments. CBaz, EL, NG, JP, MB and JAL did and analyzed experiments. CBaz, EL, JAL, MB, KB and CBau interpreted the data. KB and CBau wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Not applicable.

Ethics approval

Animal experimental procedures were performed according to local legislation, and procedures were approved by ethics committee (Comité d'Éthique de Normandie en Matière d'Expérimentation Animale, agreement #03968.01).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Normandie Université, UNICAEN, EA7451 BioConnect, 14032 Caen, France. ²Service d'Anatomie Pathologique, CHU de Caen, Caen, France.

Received: 12 July 2016 Accepted: 10 July 2017

Published online: 18 July 2017

References

- Nota SPFT, Braun Y, Schwab JH, van Dijk CN, Bramer JAM. The identification of prognostic factors and survival statistics of conventional central chondrosarcoma. *Sarcoma*. 2015;2015 doi:10.1155/2015/623746.
- Bovée JV, Cleton-Jansen A-M, Taminiau AH, Hogendoorn PC. Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment. *Lancet Oncol*. 2005;6:599–607.
- Samuel AM, Costa J, Lindskog DM. Genetic alterations in chondrosarcomas - keys to targeted therapies? *Cell Oncol Dordr*. 2014;37:95–105.
- Van Oosterwijk JG, Herpers B, Meijer D, Briaire-de Bruijn IH, Cleton-Jansen AM, Gelderblom H, et al. Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma *in vitro*: BCL-2 family members cause chemoresistance. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2012;23:1617–26.
- Bovée JVMG, Hogendoorn PCW, Wunder JS, Alman BA. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:481–8.
- Monderer D, Luseau A, Bellec A, David E, Ponsolle S, Saiagh S, et al. New chondrosarcoma cell lines and mouse models to study the link between chondrogenesis and chemoresistance. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 2013;93:1100–14.
- Ekert JE, Johnson K, Strake B, Pardinas J, Jarantow S, Perkinson R, et al. Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic compound responsiveness *in vitro* - implication for drug development. *PLoS One*. 2014;9:e92248.
- Weigelt B, Ghajar CM, Bissell MJ. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;0:42–51.
- Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, et al. *In vitro* cell migration and invasion assays. *Mutat Res*. 2013;752:10–24.

10. Chen L, Xiao Z, Meng Y, Zhao Y, Han J, Su G, et al. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials*. 2012;33:1437–44.
11. Becker JL, Blanchard DK. Characterization of primary breast carcinomas grown in three-dimensional cultures. *J Surg Res*. 2007;142:256–62.
12. Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol*. 2005;15:365–77.
13. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007;130:601–10.
14. Fischbach C, Chen R, Matsumoto T, Schmelzle T, Brugge JS, Polverini PJ, et al. Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nat Methods*. 2007;4:855–60.
15. Leung M, Kievit FM, Florczyk SJ, Veisoh O, Wu J, Park JO, et al. Chitosan-alginate scaffold culture system for hepatocellular carcinoma increases malignancy and drug resistance. *Pharm Res*. 2010;27:1939–48.
16. Dit Faute MA, Laurent L, Ploton D, Poupon M-F, Jardillier J-C, Bobichon H. Distinctive alterations of invasiveness, drug resistance and cell-cell organization in 3D-cultures of MCF-7, a human breast cancer cell line, and its multidrug resistant variant. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19:161–8.
17. Halfter K, Mayer B. Bringing 3D tumor models to the clinic - predictive value for personalized medicine. *Biotechnol J*. 2017;12.
18. Santo VE, Rebelo SP, Estrada MF, Alves PM, Boghaert E, Brito C. Drug screening in 3D in vitro tumor models: overcoming current pitfalls of efficacy read-outs. *Biotechnol J*. 2017;12.
19. Horman SR, Hogan C, Delos Reyes K, Lo F, Antczak C. Challenges and opportunities toward enabling phenotypic screening of complex and 3D cell models. *Future Med Chem*. 2015;7:513–25.
20. Duval E, Leclercq S, Elissalde J-M, Demoor M, Galéra P, Boumédiène K. Hypoxia-inducible factor 1 α inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1 α -dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2009;60:3038–48.
21. Duval E, Baugé C, Andriamanalijaona R, Bénateau H, Leclercq S, Dutoit S, et al. Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;33:6042–51.
22. Duval E, Bigot N, Hervieu M, Kou I, Leclercq S, Galéra P, et al. Asporin expression is highly regulated in human chondrocytes. *Mol Med Camb Mass*. 2011;17:816–23.
23. Andriamanalijaona R, Duval E, Raoudi M, Lecourt S, Vilquin JT, Marolleau JP, et al. Differentiation potential of human muscle-derived cells towards chondrogenic phenotype in alginate beads culture. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc*. 2008;16:1509–18.
24. Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res*. 1994;212:97–104.
25. Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A*. 2003;65A:489–97.
26. Sun J, Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials*. 2013;6:1285–309.
27. Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Lopez-Guerrero JA, Carda C, Callaghan RC, Navarro S, et al. Establishment and Characterization of a Continuous Human Chondrosarcoma Cell Line, ch-2879: Comparative Histologic and Genetic Studies with Its Tumor of Origin. *Lab Invest*. 83:877–87.
28. Scully SP, Berend KR, Toth A, Qi WN, Qi Z, Block JA. Marshall Urist Award. Interstitial collagenase gene expression correlates with in vitro invasion in human chondrosarcoma. *Clin Orthop*. 2000:291–303.
29. Girard N, Bazille C, Lhuissier E, Bénateau H, Lombart-Bosch A, Boumédiène K, et al. 3-deazaneplanocin (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, Induces Apoptosis and Reduces Cell Migration in Chondrosarcoma Cells. *PLoS ONE*. 2014;9:e98176.
30. Baugé C, Bazille C, Girard N, Lhuissier E, Boumédiène K. Histone methylases as novel drug targets: developing inhibitors of EZH2. *Future Med Chem*. 2014;6:1943–65.
31. Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Khan WS. Evaluation of biological protein-based collagen scaffolds in cartilage and musculoskeletal tissue engineering—a systematic review of the literature. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7:302–9.
32. Sung KE, Beebe DJ. Microfluidic 3D models of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;79–80:68–78.
33. Estrada MF, Rebelo SP, Davies EJ, Pinto MT, Pereira H, Santo VE, et al. Modelling the tumour microenvironment in long-term microencapsulated 3D co-cultures recapitulates phenotypic features of disease progression. *Biomaterials*. 2016;78:50–61.
34. Tinoco G, Wilky AW, Paz-Mejia AP, Rosenberg A, Trent JC. A Role For Targeting Isocitrate Dehydrogenase. *J Clin Oncol: The Biology and Management of Cartilaginous Tumors*; 2015. <http://meetinglibrary.asco.org/content/11500648-156>. Accessed 12 Feb 2016
35. Wu H-M, Jiang Z-F, Ding P-S, Shao L-J, Liu R-Y. Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Sci Rep*. 2015;5 doi:10.1038/srep12291.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



II) Le DZNep induit l'apoptose dans les chondrosarcomes in vitro et in vivo par un mécanisme indépendant d'EZH2

Contexte :

Après avoir validé l'efficacité du DZNep in vitro sur trois lignées de chondrosarcome, à la fois en monocouche et dans un modèle de culture en 3D, nous avons voulu tester son efficacité sur d'autres lignées et sur des cultures primaires de chondrosarcome, puis valider son efficacité sur une deuxième lignée in vivo et comprendre son mécanisme d'action.

Résultats :

Dans un premier temps, avec l'aide de N. Girard (doctorant BioConnect) et en collaboration avec le GMPc, nous avons étudié l'effet du DZNep in vivo dans des xénogreffes sous-cutanées de la lignée CH2879 chez des souris nude et montré que son injection intra-péritonéale (2mg/kg, 3 fois par semaine) induit une diminution du volume tumoral et la mort cellulaire par apoptose.

Dans un second temps, in vitro, nous avons évalué la croissance cellulaire après traitement au DZNep ou avec d'autres inhibiteurs plus récents d'EZH2 (GSK126 et EPZ-6438, aussi appelé tazemetostat) par numération dans quatre lignées cellulaires de chondrosarcome (CH2879, SW1353, JJ012 et FS090) et trois cultures primaires de chondrosarcomes issues de biopsies humaines. Nous avons déterminé l'apoptose par évaluation du clivage de PARP par western-blot ou par suivi d'Apo2.7 en cytométrie en flux, et montré qu'il induit l'apoptose dans les lignées cellulaires et les cultures primaires de chondrosarcome. Cependant, cet effet n'est pas associé à l'inhibition de l'activité histone méthylase d'EZH2. En effet, la réduction de la triméthylation de H3K27 induite par le GSK126 ou l'EPZ-6438 n'induit pas la mort des chondrosarcomes signifiant que l'apoptose induite par le DZNep est indépendante de l'activité méthylase d'EZH2.

Enfin, nous avons quantifié la S-adénosylhomocystéine (SAH) par test Elisa. Comme attendu, le DZNep induit son accumulation, confirmant sa capacité à inhiber la SAH hydrolase. Par la suite, nous avons recherché par analyse transcriptomique, avec J. Aury-Landas (post-doctorante BioConnect), les gènes régulés par le DZNep dans les chondrosarcomes et les chondrocytes normaux et identifié 1194 gènes augmentés ou diminués par le DZNep. L'analyse in silico des interactions entre les protéines issues de ces gènes a permis d'établir un réseau dans lequel la

voie Rho β /EGFR semble jouer un rôle central. Cependant son importance dans l'induction de l'apoptose dans les chondrosarcomes reste à confirmer.

Conclusion :

Ces résultats montrent, de manière inattendue, que l'histone méthyltransférase EZH2 n'est pas une cible thérapeutique efficace pour le traitement des chondrosarcomes. En revanche, le DZNep induit l'apoptose des chondrosarcomes in vitro et in vivo, par un mécanisme qui pourrait être lié à l'axe Rho β /EGFR.

Article en cours de soumission

The antitumoral effect of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-Deazaneplanocin A, does not required EZH2 inhibition in chondrosarcomas.

Juliette Aury-Landas^{1*}, Nicolas Girard^{1*}, Eva Lhuissier^{1*}, Céline Bazille^{1,2}, Valentine Bouet³,
Martine Boittin¹, Thomas Fréret⁴, Karim Boumediene¹ and Catherine Bauge^{1#}

* These authors equally contributed to this work.

¹ BioConnect, Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France

² Service d'Anatomie Pathologique, CHU de Caen, Caen, France

³ EA4259 Groupe Mémoire et Plasticité comportementale (GMPC), Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France

⁴ Behavioral Research Platform - Centre Universitaire de Ressources Biologiques (BRP - CURB), Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France

Address for correspondence:

Catherine BAUGE

BioConnect

Université de Caen Normandie

14032 CAEN

FRANCE

Phone : +33 (0)2 31 06 82 18

E-mail : catherine.bauge@unicaen.fr

Running title: Antitumoral effect of DZNep

Keywords: S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, EZH2, apoptosis, EGFR, RhoB

Additional information:

Financial support: This project was supported by grants from Région Basse-Normandie, Ligue Contre le Cancer, and Cancéropôle Nord-Ouest. NG, JAL and EL were recipient of a fellowship from Conseil Régional de Basse-Normandie and French Ministry of Research, respectively.

Conflict of interest: The authors have no conflicting financial interests.

Word count: 4551

Number of figures: 6

Number of supplementary tables: 7

Abstract

3-Deazaneplanocin, DZNep, has been reported to decrease the expression of histone methylase EZH2, and the trimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27me3), and induce cell apoptosis in two chondrosarcoma lines. The present study aims to test DZNep anti-tumoral effect *in vivo*, and to understand the mechanistic in chondrosarcomas (CS).

Antitumoral effect of DZNep was evaluated *in vivo* using chondrosarcoma xenografts in *nude* mice. *In vitro*, cell growth was evaluated by counting adherent cells in several CS cell lines and primary cultures treated with DZNep, or with more recent EZH2 inhibitors. Apoptosis was investigated using PARP cleavage by Western-Blot, or Apo2.7 expression by flow cytometry. S-adenosylhomocysteine was quantified by ELISA. Differentially expressed genes in treated-chondrosarcomas and chondrocytes were researched by microarray analysis.

DZNep induced apoptosis in chondrosarcomas both *in vivo* and *in vitro*. However, this effect was not correlated to EZH2 methylase expression nor activity, and the reduction of H3K27me3 induced by GSK126 or tazemetostat (EPZ-6438) did not provoke chondrosarcoma death, indicating that DZNep-induced apoptosis was independent of EZH2 activity. However, as expected DZNep induced S-adenosylhomocysteine accumulation. Further, microarray analysis suggests a key role of EGFR and RhoB in DZNep-induced apoptosis in chondrosarcomas.

In conclusion, EZH2 methylase is not an adequate target for chondrosarcoma treatment. However, S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibition by DZNep induces death in chondrosarcomas *in vitro* and *in vivo*, by a mechanism likely mediated through RhoB/EGFR axis. Consequently, it would be worth initiating clinical trials to evaluating efficiency to S-adenosylhomocysteine hydrolase or EGFR inhibitors in patients with chondrosarcomas.

Introduction

Chondrosarcomas (CS) are malignant bone mesenchymal tumors that represent about 25% of bone tumors. Potentially fatal, their 10-year survival rates vary between 30% and 80% according to CS grade. Their treatment has not progressed for 30 years, mainly due to the fact that chondrosarcomas are resistant to radio- and chemo-therapy (1,2). Thus, to date, therapeutic strategy consists in a surgical approach, with tumor curettage or wide resection. Therefore, we still need to identify efficient therapies to improve life quality of patients with chondrosarcomas.

We previously showed that high grade chondrosarcomas express high level of the histone-lysine N-methyltransferase EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) compared to enchondromas or normal cartilages (3). This observation led us to assess the effect of DZNep, an S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) inhibitor known to deplete EZH2 protein expression and reduce H3K27 trimethylation, on the survival of chondrosarcomas. Using two chondrosarcoma cell lines, CH2879 and SW1353, we demonstrated that, *in vitro*, DZNep reduces EZH2 expression and H3K27me3, and induces apoptosis (3). To validate the concept that EZH2 inhibition could be an innovative approach to treat chondrosarcomas, additional experiments are required. In particular, we wanted to investigate several points.

First, it is well known that chondrosarcomas produce an abundant extracellular matrix reducing drug accessibility to tumors. This is one of the major mechanisms underlying chondrosarcoma chemoresistance (4). Consequently, before envisaging to use drugs such as DZNep in clinics, it is required to validate its efficiency *in vivo*. Secondly, since it is now admitted that some tumors are resistant to DZNep (5–7), it becomes essential to test its effect on a larger number of chondrosarcomas. Thirdly, the mechanism of DZNep is not well known.

This carbocyclic adenosine analog was initially described as an EZH2 inhibitor. This was in line with our previous results showing that DZNep reduces EZH2 protein expression, and H3K27me levels in CH2879 and SW1353 chondrosarcomas (3). However, it is now admitted that this effect is indirect, and that, actually, DZNep inhibits S-adenosylhomocysteine (SAH) hydrolase resulting in SAH accumulation and thus overall reduction of S-adenosylmethionine (SAM), causing the indirect inhibition of the EZH2 methyltransferase activity. DZNep also causes EZH2 degradation probably through the ubiquitin-proteasome system (8). In addition, several studies suggest that DZNep could induce apoptosis of tumoral cells by an EZH2 methylase independent mechanism (6).

In this context, we tested the effect of DZNep on chondrosarcoma growth *in vivo* using a xenograft model in immunoincompetent nude mice, and investigated the mechanism involved in DZNep-induced death. We showed that, *in vivo*, DZNep reduces tumor growth and induces apoptosis in tumoral cells. Next, by extending the *in vitro* study to other CS cell lines and primary cultures, we demonstrated that DZNep inhibits SAHH activity, but acts independently to its ability to reduce H3K27 trimethylation and EZH2 expression. Also, microarray analysis followed by construction of protein-protein interaction network suggests a putative role of *EGFR* and *RhoB* in DZNep-induced apoptosis.

Materials and methods

Cell culture

Human chondrosarcoma cell line SW1353 was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The human JJ012 and FS090 cell lines were kindly provided by Dr. J.A. Block (Rush University medical center) (9,10). They were cultured in

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and antibiotics. CH2879 cell line was kindly provided by Pr. A. Llombart-Bosch (University of Valencia, Spain), cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640's medium (Lonza AG, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FBS (Invitrogen) and antibiotics (11). The identity of cell lines was confirmed using STR profiling with the GenePrint 10 System (Promega, Charbonnières les bains, France).

Primary chondrosarcomas and chondrocytes were obtained from biopsies of CS during resection, and from femoral heads of patients undergoing arthroplasty, respectively. Protocols have been accepted by local ethical committee (Comité de Protection des Personnes Nord Ouest III). Clinical characteristics of chondrosarcomas are in supplementary table (supplementary table S1). Cells were released by digestion with type I collagenase (2 mg/mL for 15 hours) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). After seeding, cells were incubated in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics. Experiments were done between passages 2 and 4 for primary chondrosarcomas, or without passage for chondrocytes.

All cultures were done at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cell cultures were regularly tested for mycoplasma contamination, by PCR detection of mycoplasma DNA.

Animals

Animal experimental procedures were performed according to local legislation, and procedures were approved by ethics committee (Comité d'Éthique de Normandie en Matière d'Expérimentation Animale, agreement #03968.01). Mice were provided and kept in the animal facility (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Caen, France) under controlled temperature and light conditions (temperature 23± 2°C, 12h reversed light-dark cycle).

Animals had *ad libitum* access to food and water. Each animal was humanely handled throughout the experiment in accordance with internationally accepted ethical principles for laboratory animal use and care, and all efforts were made to minimize animal suffering. Euthanasia was performed using CO₂ inhalation.

Xenograft of chondrosarcomas in nude mice

For first round of *in vivo* experiments, *nude* mice (11 weeks old, males) were injected subcutaneously with 100 µl of matrigel containing 10⁶ CH2879 cells which had, in advance, been treated or not with DZNep (1µM, 5 days). Mice were euthanized 46 days after injection. A total of 10 mice were used (5 pre-treated and 5 controls).

For the second set of experiments, 22 *nude* mice (11 weeks old, males) were injected subcutaneously with 10⁶ CH2879 cells (100 µl of matrigel) on their back (between scapulas) and separated in two groups. When the tumor volume reached 300 mm³, DZNep or vehicle was administered intraperitoneally three times per week at 2 mg/kg.

During all these experiments, tumors were measured three times per week by a caliper and tumoral volume calculated by the following equation $(L \times w^2) / 2$ (with L corresponding to length and w to width). At the end of the experiments, tumors and various organs were resected, weighted, measured, and photographed.

Cell growth experiments

Cells were seeded at 750 cells/cm². The day after, they were treated with inhibitors for two weeks. Regularly, adherent cells were counted. Each count was performed twice, and independent experiments were done at least three times.

Protein extraction and Western blot

Total proteins were extracted using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl; pH 7.5; 1% IGEPAL; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1 mM NaF; 0.25% Na deoxycholate) supplemented with phosphatase (10 μ L/mL Na₃VO₄) and protease inhibitors (1 μ L/mL leupeptin, 1 μ L/mL aprotinin, 1 μ L/mL pepstatin and 4 μ L/mL phenylmethylsulfonyl fluoride) (Sigma). Western-blot experiments were performed as previously described (3). Briefly, protein samples were loaded onto acrylamide gels for Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and thereafter the proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Biorad). The following primary antibodies were used: β -actin (sc-47778) and GAPDH (sc-25778) from Santa Cruz Biotechnology, and EZH2 (#3147), H3 (#4499), H3K27me3 (#9733) and PARP (#5246) from Cell signaling. The membranes were probed with a corresponding secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. Signals were revealed with Western Lightning[®] Plus-ECL (Perkin Elmer) and exposed to X-ray film (Santa Cruz biotechnology). β -actin, histone H3 or GAPDH were used to verify that similar amounts of proteins were loaded in all lanes.

S-adenosylhomocysteine quantification

S-adenosylhomocysteine (SAH) was quantified in cell layers using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, 50 μ g of proteins extracted with RIPA were loaded in

wells, then protocols were followed as described by manufacturer (*Cell Biolabs*, Clinisciences, Nantes, France).

Apo2.7 staining

For apoptosis assay, cells were stained with phycoerythrin (PE)-conjugated antibody directed against APO2.7 (clone 2.7 7A6) according to the manufacturer's condition (Beckman Coulter, Villepinte, France) as previously reported (3). Cell fluorescence was measured using Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) on the technical platform of SFR 146 (Structure Federative de Recherche 146, Caen, France). A minimum of 10,000 events were analyzed in each sample using FlowJo software. At least, three independent experiments were performed.

Total RNA Isolation

Total RNA was isolated from cell cultures using NucleoSpin RNA (*Macherey-Nagel*, Hoerd, France), according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality were measured on a MultiSkan GO spectrophotometer with a μ Drop Plate (ThermoFisher Scientific). RNA integrity was assessed on 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies France, Les Ulis, France) using RNA 6000 Nano (Agilent Technologies), according to the manufacturer's instructions. RNA integrity numbers above 8 were considered suitable for microarray analysis.

Gene expression microarray analysis

Two-color microarray-based gene expression analysis was performed, according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies). Briefly, 100 ng of total RNA were amplified

and labeled using a Low input Quick Amp Labeling kit, Two-color (Agilent Technologies), and hybridized to a Human Gene Expression 4x44K v2 Microarray (design ID 026652, Agilent Technologies). Slides were scanned on a G2505C Microarray Scanner (Agilent Technologies). Raw data were extracted and Lowess normalized using Feature Extraction software (v. 10.7.3, Agilent Technologies), and analyzed using GeneSpring GX software (v. 13.1.1, Agilent Technologies). Microarray probes with a signal that is not positive and significant or not above the background were filtered out. Genes with a p-value ≤ 0.01 and a fold-change ≥ 1.5 were considered differentially expressed (DEGs).

Gene Ontology (GO) and Pathway enrichment analysis

Gene enrichment among the genes showing significant differential expression was performed with the Functional annotation tool of the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (v. 6.7, DAVID) tool (12) considering the biological processes option (GOTERM_BP_FAT), the cellular compartment option (GOTERM_CC_FAT), the molecular function option (GOTERM_MF_FAT) or the Pathways database (KEGG_Pathway). Enrichment with a p-value < 0.05 after correction for multiple testing (according to Benjamini test) were considered as significant.

Protein-Protein Interaction (PPI) network construction

Protein-protein interaction network among DEGs was constructed using the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (v. 10, STRING) (13) available online. Minimum required interaction score was fixed at the value 0.9.

RNA isolation and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA (1 µg) were treated with DNase-I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) reverse transcribed into cDNA in the presence of oligodT and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT). The reaction was carried out at 37°C for 1 h followed by a further 10-min step at 95°C. Amplification of the generated cDNA was performed by real-time PCR in Step One Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems) with appropriate primers. The relative mRNA level was calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. For *in vivo* experiment, a two-way ANOVA with repeated measurements was performed. For *in vitro* experiments, at least three different experiments were performed for each condition. Statistical significances were calculated with Students-t-test. P-values \leq 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Pretreatment of CS cells with DZNep reduced tumor implantation and growth in xenograft mice model

We previously showed that DZNep induces apoptosis of CH2879 and SW1353 chondrosarcoma cell lines, *in vitro* (3), suggesting that it could be a candidate to target chondrosarcoma growth *in vivo*. To validate this hypothesis, we used CH2879 cell line because of its good rate of xenograft implantation and its fast growth in *nude* mice (data not shown). Cells were treated or not with DZNep for 5 days before being implanted in mice and tumor volume was regularly measured (figure 1). Tumors from DZNep-treated-cells grew more

slowly than those from untreated cells. This decrease of tumor growth was also confirmed by their lower weight at the end of the experiments.

Peritoneal injection of DZNep induced apoptosis of CS in xenograft mice

Furthermore, we tested whether DZNep treatment is able to reduce tumor growth after grafting in *nude* mice. For these experiments, once chondrosarcoma cells developed palpable tumors, mice were injected with DZNep (2 mg/kg) or vehicle intraperitoneally three times per week. Eight week-treatment with DZNep decreased tumor growth of about 30%. Tumoral volumes and weights in DZNep group ($2789 \pm 1509 \text{ mm}^3$, and $3.48 \pm 1.91 \text{ g}$) were significantly lower than those in the control group ($4142 \pm 735 \text{ mm}^3$, and $4.9 \pm 1.33 \text{ g}$) (figure 2A, B and C). Interestingly, this reduction of tumor weight was, at least in part, due to tumoral cell death by apoptosis, as shown by PARP cleavage in DZNep-treated tumors (figure 2D). No significant modification in weight of mouse body or organs (heart, lung, brain, kidney, liver) was observed (data not shown).

DZNep reduced CS growth and induced apoptosis of all tested CS cells

Since it has been shown that some tumors are resistant to DZNep, we wanted to test whether all chondrosarcomas could respond to this treatment. Cell survival was assessed *in vitro* by adherent cell counting, and apoptosis through observation of PARP cleavage by Western-blot, in JJ012 and FS090 chondrosarcoma cell lines, and in three primary chondrosarcomas derived directly from patient biopsies (figure 3). As previously reported for CH2879 and SW1353 (3), we observed that DZNep reduced survival and induced apoptosis in all CS cells tested. In contrast, DZNep did not induce apoptosis in chondrocytes. This was also confirmed by flow

cytometry experiments after DNA staining with propidium iodide and analysis of cell fraction in sub-G1, as well as after observation of APO2.7 positive cells (data not shown).

DZNep induced S-adenosylhomocysteine accumulation but not EZH2 inhibition in all tested CS

To elucidate the mechanism by which DZNep induces apoptosis in CS cells, we first assayed intracellular concentration of SAH by ELISA. Indeed, DZNep has been described as an inhibitor of SAH hydrolase, leading to inhibition of EZH2 methylase. As expected, DZNep induced SAH accumulation in all CS cell lines (figure 4A), suggesting that DZNep inhibits SAH hydrolase in chondrosarcomas. However, DZNep did not affect EZH2 protein expression nor H3K27me3 in JJ012 and FS090 chondrosarcomas, while it decreased EZH2 expression and H3K27me3 in CH2879 (figure 4B). This suggests that DZNep could induce apoptosis independently to its ability to inhibit EZH2 expression and H3K27 methylation.

Reduction of H3K27me3 induced by GSK126 or tazemetostat (EPZ-6438) did not provoke chondrosarcoma death.

Furthermore, we evaluated the effects of more recent drugs, namely GSK126 or tazemetostat (EPZ-6438) in chondrosarcomas. These inhibitors, currently being tested in clinical trials for patients with lymphomas and some other tumors, are known to reduce H3K27me3 in tumoral cells by inhibiting EZH2 methylase activity without modifying its expression. Both GSK126 and EPZ6438 strongly reduced H3K27me3 in chondrosarcomas (figure 4C). However, they did not significantly modify the cell growth, neither induced apoptosis in CS (figures 4D and E).

These results confirm that DZNep-induced apoptosis is not reliable to H3K27me3 regulation in chondrosarcomas, and show that the inhibition of EZH2 methylase is not an efficient approach to treat these bone tumors.

DZNep regulated expression of apoptosis and angiogenesis-related genes in CH2879 chondrosarcomas

Next, in order to identify genes with changed expression in response to DZNep in chondrosarcomas, genome wide expression profiles were generated for CH2879 chondrosarcomas treated with 1 μ M of DZNep for 24h. 1406 entities were identified, corresponding to 1194 unique differentially expressed genes (DEG) with a fold-change superior or equal to 1.5. Notably, 760 entities corresponding to 616 unique DEG were up-regulated, while 646 entities (*i.e.* 578 unique DEG) were down-regulated (supplementary tables S2 and S3). Interestingly, among the top 20 of the most regulated genes, we identified mitotic arrest deficient-like 1, *MAD1L1* (also called MAD1). This regulator of cell proliferation and apoptosis was down-regulated in CH2879.

Gene Ontology analysis showed that genes regulated by DZNep were enriched in numerous processes, including protein-DNA complex, nucleosome, ECM-receptor interaction, cell death, and angiogenesis (all categories with p-value \leq 0.05) (figure 5; supplementary tables S4 and S5).

Next, when analyzing interactions among proteins encoded by these genes using STRING, we found significant enrichment for protein-protein interactions (PPI) (figure 6) which were

primary centered on JUN/EGR1 and EGFR, for up-regulated and down-regulated gene lists respectively.

CH2879 chondrosarcoma Vs chondrocyte DEG by DZNep

Furthermore, we compared genome wide expression profiles generated by DZNep treatment in CH2879 chondrosarcomas and chondrocytes (HAC) since we found that DZNep did not induce apoptosis in HAC. Significant differential expression in chondrocytes was identified for 901 probes with a fold change superior or equal to 1.5. A weak degree of overlap was observed between DEG in chondrosarcomas and chondrocytes (supplementary tables S6 and S7). Only 11% of entities were common to both cell types. This strong heterogeneity of response confirms that DZNep elicits different responses in normal and tumoral cells.

Interestingly, *EGFR* and *MAD1L1* were not found in the list of DEG from chondrocytes. In contrast, *JUN* and *EGR1* were found in both lists. In addition, we identified *RHOB* which seems to be central in protein-protein interaction in DZNep-treated CH2879 while it was not differentially regulated by DZNep treatment in chondrocytes.

DZNep down-regulated EGFR, and upregulated RhoB in all tested chondrosarcoma cells, but not in chondrocytes

Transcriptomic analysis allowed us to identify several genes (*EGFR*, *RhoB*, *MAD1L1*) which could play a key role in DZNep-induced apoptosis in CH2879. We analyzed their expression by real-time RT-PCR in different chondrosarcoma cell lines and chondrocytes (figure 6). Interestingly, we found that *RhoB* was up-regulated by DZNep in chondrosarcomas but not in

chondrocytes. *EGFR* and *MAD1L1* were down-regulated by DZNep in chondrosarcomas, but not in chondrocytes. However, the effect on *MAD1L1* was very low in FS090.

Discussion

High grade chondrosarcomas have a poor prognosis and their treatment remains a major concern, due to their resistance to radio- and chemotherapies. In this study, we show that DZNep decreases cell and tumor growth and induces apoptosis of chondrosarcomas both *in vitro* and *in vivo*. We also demonstrate that the induction of cell death in DZNep-treated cells is not correlated to the reduction of H3K27 trimethylation. However, it is associated to the inhibition of SAH hydrolase activity and EGFR/RhoB expression.

First, we demonstrate that DZNep treatment decreases tumor growth and induces apoptosis of chondrosarcomas in a mouse xenograft model. However, the tumors did not disappear completely in the frame time of our experiment. A higher DZNep dose or longer time exposure may be needed for optimal antitumoral effects in chondrosarcomas. In addition, the effect of DZNep may be limited due to its poor delivery. Indeed, its half-life in mice is comprised between 1 and 3 hours (14,15). Therefore, pharmacokinetic of DZNep could be improved by entrapment within a pegylated liposomal carrier (14). This strategy would probably increase the therapeutic effect of DZNep on chondrosarcomas, and avoid using too high doses of drug by optimizing its delivery.

DZNep has been identified as an inhibitor of S-adenosyl-L homocysteine hydrolase (SAHH), which is required for EZH2-dependent methylation. It has been shown that DZNep depletes cellular EZH2 levels and selectively blocks the trimethylation of H3K27 in numerous tissues (16). However, it is no longer considered as a specific EZH2 inhibitor (17) and it could act

independently to this histone methylase. Here, we demonstrate that apoptosis induction by DZNep is correlated to SAHH inhibition (showed by the intracellular SAH accumulation), but not to the reduction of EZH2 expression nor that of H3K27 trimethylation. These results confirm that DZNep is able to induce cell death independently of EZH2 methylase activity. In addition, we show that specific reduction of H3K27me3 using GSK126 and tazemetostat (EPZ-6438) is not able to induce apoptosis in chondrosarcoma cell lines, indicating that EZH2 is not a good target to treat chondrosarcomas. This was unexpected because these inhibitors are known to be efficient against lots of others tumors *in vitro* and *in vivo*, and several clinical trials are in process to treat patients with lymphomas but also sarcomas (16).

Interestingly, we identified EGFR and RhoB as putative mediators of DZNep induced-apoptosis. Our study revealed that *RHOB* was up-regulated by DZNep in chondrosarcomas, but not in chondrocytes. A similar induction by DZNep was already reported in glioblastoma multiform cancer stem cells (18). RhoB belongs to the Rho-GTPase family which is involved in a broad range of cellular processes like survival, migration, and angiogenesis and is implicated in tumorigenesis and metastasis (19,20). RhoB acts as a tumor suppressor (19,21). Its expression is frequently down-regulated in cancer tumors (22–24), and *in vivo* restoration of RhoB expression leads to tumor regression (25). Interestingly, RhoB overexpression inhibits oncogenic signaling and cell proliferation in tumoral cells *in vitro* and *in vivo* (26), and induces apoptosis in SW1353 chondrosarcoma cell line (27). Consequently, it is likely that DZNep reduces tumor cell survival and induces apoptosis, in part, through the up-regulation of *RHOB*. RhoB is able to regulate many growth factor receptors, among which Epidermal Growth Factor Receptor (28), a gene known to be downregulated by DZNep in oral squamous cell carcinoma SAS cell line (29). This is consistent with our data which shows that *EGFR* was down-regulated

by DZNep in all chondrosarcoma cell lines tested, but not in chondrocytes. EGFR is a transmembrane glycoprotein that belongs to ErbB/Her family of receptor tyrosine kinases. Binding of growth factors to EGFR leads to autophosphorylation of receptor tyrosine kinase and activates the downstream signal transduction pathways which regulates cellular proliferation, differentiation, and survival (30). EGFR is overexpressed in a variety of tumor cell lines, and has been associated with metastasis, poor prognosis, and resistance to chemotherapy (31). Particularly, EGFR has been reported to be overexpressed in 8.3% of chondrosarcomas (based on a collection of 97 cases) and in chondrosarcoma cell lines (32,33). Beside, in the present study, genome wide expression profiles followed by protein-protein interaction analysis revealed that many proteins encoded by genes down-regulated by DZNep treatment are related to EGFR, at least in CH2879 cells, suggesting that EGFR may play a role in DZNep-induced apoptosis in CS cells. This hypothesis is reinforced by recent studies with EGFR inhibitors. Noteworthy, it has been showed that gefitinib, a direct inhibitor of EGFR already approved by FDA for the treatment of lung cancers (30), significantly inhibits the growth, induces cell cycle arrest and decreases the migration ability of human chondrosarcoma cells (33). These effects seem similar to those of DZNep, reinforcing the hypothesis that it acts in chondrosarcomas through EGFR down-regulation.

In conclusion, we found that DZNep, an inhibitor of SAHH, induces apoptosis in chondrosarcomas *in vitro* and *in vivo*, by a mechanism, likely mediated through RhoB/EGFR axis. Consequently, it would be worth initiating clinical trials to evaluate efficiency of SAHH or EGFR inhibitors in patients with chondrosarcomas. In contrast, the specific inhibition of the methylase EZH2, a strategy currently developed in clinical trials for lymphomas and some other tumors (mesothelioma, rhabdoid tumors, synovial sarcoma), is not an adequate approach for chondrosarcoma treatment.

Acknowledgements

We thank Julien PONTIN and Marion BERTHELOT (BioConnect, Unicaen, Caen, France), Marilynne GUILLAMIN (SFR 146 ICORE, Unicaen), Benoit HAELEWYN, Charlotte MARIE (CURB, Unicaen) for technical assistance and advice. We also thank Joel BLOCK (Rush University Medical Center, Chicago, USA) and Antonio LLOMBART-BOSH (University of Valencia, Valencia, Spain) for chondrosarcoma cell line gift.

This project was supported by grants from Région Basse-Normandie, Ligue Contre le Cancer, and Cancéropôle Nord-Ouest. NG, JAL and EL were recipient of a fellowship from Conseil Régional de Basse-Normandie and French Ministry of Research, respectively.

The authors have no conflicting financial interests.

References

1. Giuffrida AY, Burgueno JE, Koniaris LG, Gutierrez JC, Duncan R, Scully SP. Chondrosarcoma in the United States (1973 to 2003): an analysis of 2890 cases from the SEER database. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91:1063–72.
2. Leddy LR, Holmes RE. Chondrosarcoma of bone. *Cancer Treat Res.* 2014;162:117–30.
3. Girard N, Bazille C, Lhuissier E, Benateau H, Llombart-Bosch A, Boumediene K, et al. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an Inhibitor of the Histone Methyltransferase EZH2, Induces Apoptosis and Reduces Cell Migration in Chondrosarcoma Cells. *PLoS One.* 2014;9:e98176.
4. Monderer D, Luseau A, Bellec A, David E, Ponsolle S, Saiagh S, et al. New chondrosarcoma cell lines and mouse models to study the link between chondrogenesis and chemoresistance. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 2013;93:1100–14.
5. Puppe J, Drost R, Liu X, Joosse SA, Evers B, Cornelissen-Steijger P, et al. BRCA1-deficient mammary tumor cells are dependent on EZH2 expression and sensitive to Polycomb

- Repressive Complex 2-inhibitor 3-deazaneplanocin A. *Breast Cancer Res BCR*. 2009;11:R63.
6. Xie Z, Bi C, Cheong LL, Liu SC, Huang G, Zhou J, et al. Determinants of Sensitivity to DZNep Induced Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 [cited 2013 Jan 1];6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3123372/>
 7. Cheng LL, Itahana Y, Lei ZD, Chia N-Y, Wu Y, Yu Y, et al. TP53 genomic status regulates sensitivity of gastric cancer cells to the histone methylation inhibitor 3-deazaneplanocin A (DZNep). *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012;18:4201–12.
 8. Martínez-Fernández M, Rubio C, Segovia C, López-Calderón FF, Dueñas M, Paramio JM. EZH2 in Bladder Cancer, a Promising Therapeutic Target. *Int J Mol Sci*. 2015;16:27107–32.
 9. Jagasia AA, Block JA, Diaz MO, Nobori T, Gitelis S, Inerot SE, et al. Partial deletions of the CDKN2 and MTS2 putative tumor suppressor genes in a myxoid chondrosarcoma. *Cancer Lett*. 1996;105:77–90.
 10. Scully SP, Berend KR, Toth A, Qi WN, Qi Z, Block JA. Marshall Urist Award. Interstitial collagenase gene expression correlates with in vitro invasion in human chondrosarcoma. *Clin Orthop*. 2000;291–303.
 11. Gil-Benso R, Lopez-Gines C, López-Guerrero JA, Carda C, Callaghan RC, Navarro S, et al. Establishment and characterization of a continuous human chondrosarcoma cell line, ch-2879: comparative histologic and genetic studies with its tumor of origin. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 2003;83:877–87.
 12. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4:44–57.
 13. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D447–52.
 14. Sun F, Li J, Yu Q, Chan E. Loading 3-deazaneplanocin A into pegylated unilamellar liposomes by forming transient phenylboronic acid-drug complex and its pharmacokinetic features in Sprague-Dawley rats. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2012;80:323–31.
 15. Peer CJ, Rao M, Spencer SD, Shahbazi S, Steeg PS, Schrupp DS, et al. A rapid ultra HPLC-MS/MS method for the quantitation and pharmacokinetic analysis of 3-deazaneplanocin A in mice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013;
 16. Baugé C, Bazille C, Girard N, Lhuissier E, Boumediene K. Histone methylases as novel drug targets: developing inhibitors of EZH2. *Future Med Chem*. 2014;6:1943–65.

17. Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, et al. DZNep Is a Global Histone Methylation Inhibitor that Reactivates Developmental Genes Not Silenced by DNA Methylation. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:1579–88.
18. Suvà M-L, Riggi N, Janiszewska M, Radovanovic I, Provero P, Stehle J-C, et al. EZH2 Is Essential for Glioblastoma Cancer Stem Cell Maintenance. *Cancer Res.* 2009;69:9211–8.
19. Huang M, Prendergast GC. RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol.* 2006;21:213–8.
20. Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1796:91–8.
21. Liu A-X, Rane N, Liu J-P, Prendergast GC. RhoB Is Dispensable for Mouse Development, but It Modifies Susceptibility to Tumor Formation as Well as Cell Adhesion and Growth Factor Signaling in Transformed Cells. *Mol Cell Biol.* 2001;21:6906–12.
22. Adnane J, Muro-Cacho C, Mathews L, Sebti SM, Muñoz-Antonia T. Suppression of Rho B Expression in Invasive Carcinoma from Head and Neck Cancer Patients. *Am Assoc Cancer Res.* 2002;8:2225–32.
23. Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, et al. Loss of RhoB Expression in Human Lung Cancer Progression. *Am Assoc Cancer Res.* 2004;10:2742–50.
24. Sato N, Fukui T, Taniguchi T, Yokoyama T, Kondo M, Nagasaka T, et al. RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer.* 2007;120:543–51.
25. Couderc B, Pradines A, Rafii A, Golzio M, Deviers A, Allal C, et al. In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer Gene Ther.* 2008;15:456–64.
26. Chen Z, Sun J, Pradines A, Favre G, Adnane J, Sebti SM. Both Farnesylated and Geranylgeranylated RhoB Inhibit Malignant Transformation and Suppress Human Tumor Growth in Nude Mice. *J Biol Chem.* 2000;275:17974–8.
27. Mahr S, Müller-Hilke B. Transcriptional activity of the RHOB gene is influenced by regulatory polymorphisms in its promoter region. *Genomic Med.* 2007;1:125–8.
28. Lajoie-Mazenc I, Tovar D, Penary M, Lortal B, Allart S, Favard C, et al. MAP1A Light Chain-2 Interacts with GTP-RhoB to Control Epidermal Growth Factor (EGF)-dependent EGF Receptor Signaling. *J Biol Chem.* 2008;283:4155–64.
29. Hatta M, Naganuma K, Kato K, Yamazaki J. 3-Deazaneplanocin A suppresses aggressive phenotype-related gene expression in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;468:269–73.
30. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012;16:15–31.

31. Mahipal A, Kothari N, Gupta S. Epidermal growth factor receptor inhibitors: coming of age. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent.* 2014;21:74–9.
32. Movva S, Wen W, Chen W, Millis SZ, Gatalica Z, Reddy S, et al. Multi-platform profiling of over 2000 sarcomas: Identification of biomarkers and novel therapeutic targets. *Oncotarget.* 2015;6:12234–47.
33. Song J, Zhu J, Zhao Q, Tian B. Gefitinib causes growth arrest and inhibition of metastasis in human chondrosarcoma cells. *J BUON Off J Balk Union Oncol.* 2015;20:894–901.

Figure legends

Figure 1: Pretreatment with DZNep reduced CS implantation and growth in xenograft mice model

CH2879 cells were treated with DZNep (1 μ M) for 5 days before subcutaneous grafting in *nude* mice.

(A) Tumors were measured regularly by a caliper and tumoral volume calculated.

(B) 46 days after cell injection, tumors were weighted.

Data are expressed as means \pm SEM. A total of ten mice were used (five pre-treated and five controls).

Figure 2: Peritoneal injection of DZNep reduced tumoral growth of CS in xenograft mice

CH2879 chondrosarcoma cell line was subcutaneously injected in the back of *nude* mice. When tumors were implanted and reached 300 mm³, DZNep was intraperitoneally injected three times per week (2 mg/kg) for 56 days.

(A) Tumors were measured regularly by a caliper and tumoral volume calculated.

(B-C) At the end of experiments, tumors were weighted and measured. Representative macroscopic views of the resected xenograft tumors of each group are shown.

Data are expressed as means \pm SEM. N=9 and 7 for control and DZNep groups, respectively.

(D) Proteins were extracted from tumors and PARP cleavage was analyzed by Western blot.

Figure 3: DZNep induced apoptosis in chondrosarcoma cells but not in chondrocytes.

(A) CH2879, JJ012, and FS090 chondrosarcomas cell lines as well as CS121030, CS141110, and CS150409 primary chondrosarcomas were treated with DZNep (1 μ M) for 14 days. Treatment was renewed at each medium change (days 4, 7, 10) and adherent cells regularly counted. Data are expressed as means \pm SEM. (n= 2 or 3).

(B) Chondrosarcomas and chondrocytes were treated with DZNep (1 μ M) for 7 days. After treatment, proteins were extracted and PARP cleavage was analyzed by Western blot. Figures show a representative image of three independent experiments.

Figure 4: DZNep acts independently of EZH2 methylase activity.

(A) SAH protein levels were assayed in cells after 24h-treatment with DZNep (1 μ M).

(B - C) Chondrosarcomas were treated with DZNep (1 μ M), EPZ6438 (1 μ M) or GSK126 (1 and 20 μ M) for 5 days. Then, EZH2 protein expression or H3K27me3 levels were analyzed by Western blot. β -actin and H3 were used to compare protein loading for EZH2 and H3K27me3 respectively. In H3K27me3 panel (C), the order of the samples for CH2879 was rearranged, but all lanes were from the same gel. Representative figures of three independent experiments are shown.

(D-E) Cells were cultured with DZNep, EPZ6438 or GSK126. At the end of treatments, survival fraction and percentage of apoptotic cells were evaluated by counting adherent cells (D) and by Apo2.7 staining (E), respectively. Data are expressed as means \pm SEM (n=3).

Figure 5: Gene enrichment analysis.

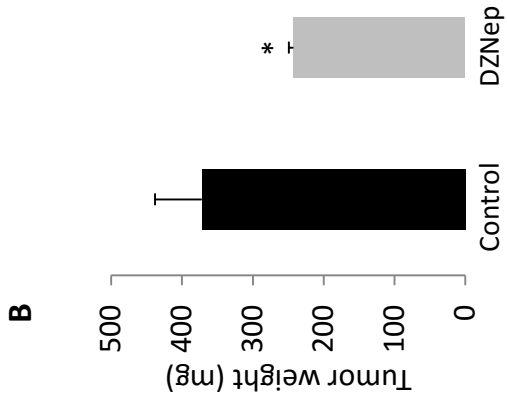
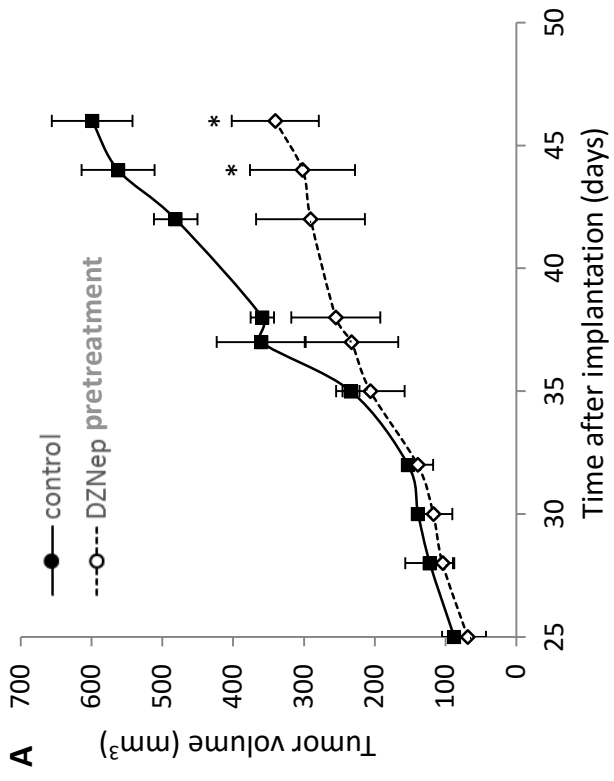
Gene ontology analysis in DAVID using the genes from tables S2 (A) and S3 (B) with at least 1.5-fold expression difference between DZNep-treated and untreated cells. *: p-value \leq 0.05; **: p-value \leq 0.01; ***: p-value \leq 0,001.

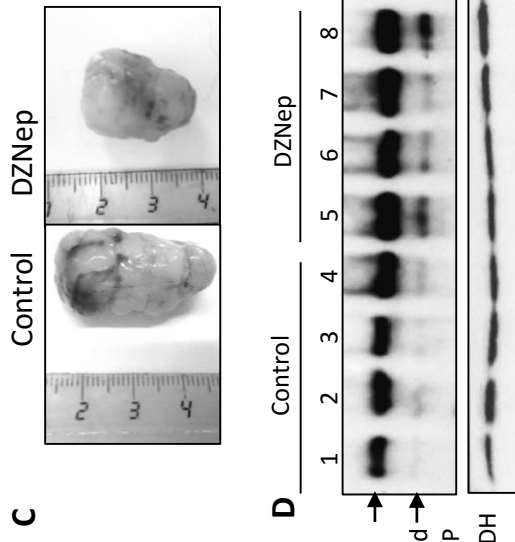
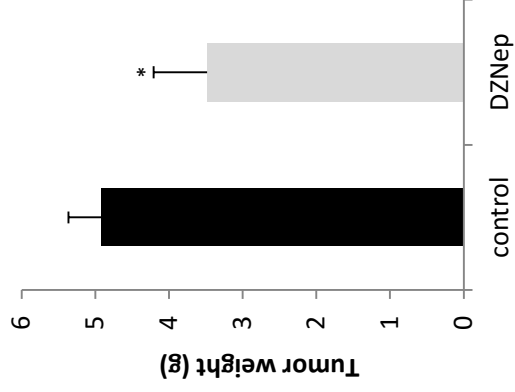
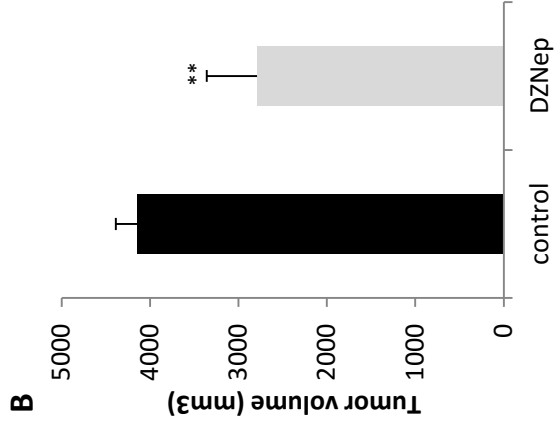
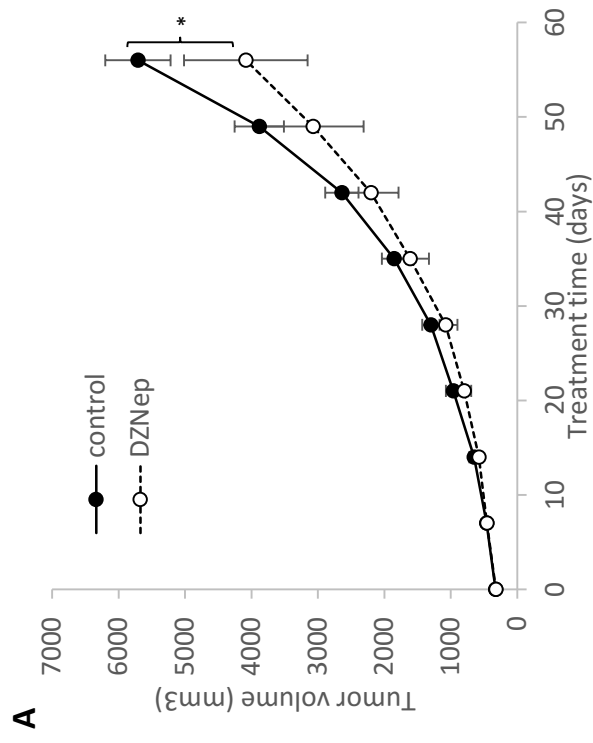
Figure 6: Protein-protein interaction.

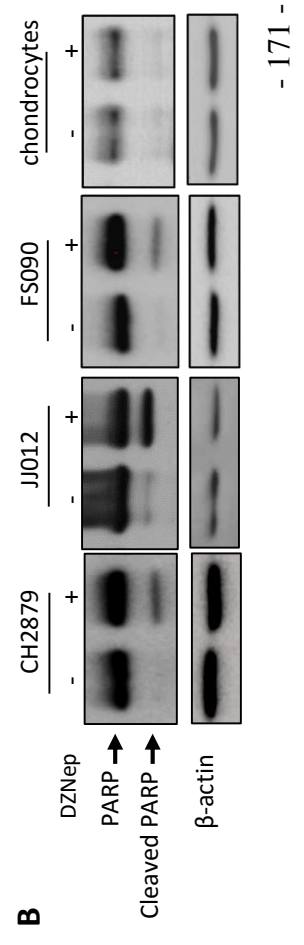
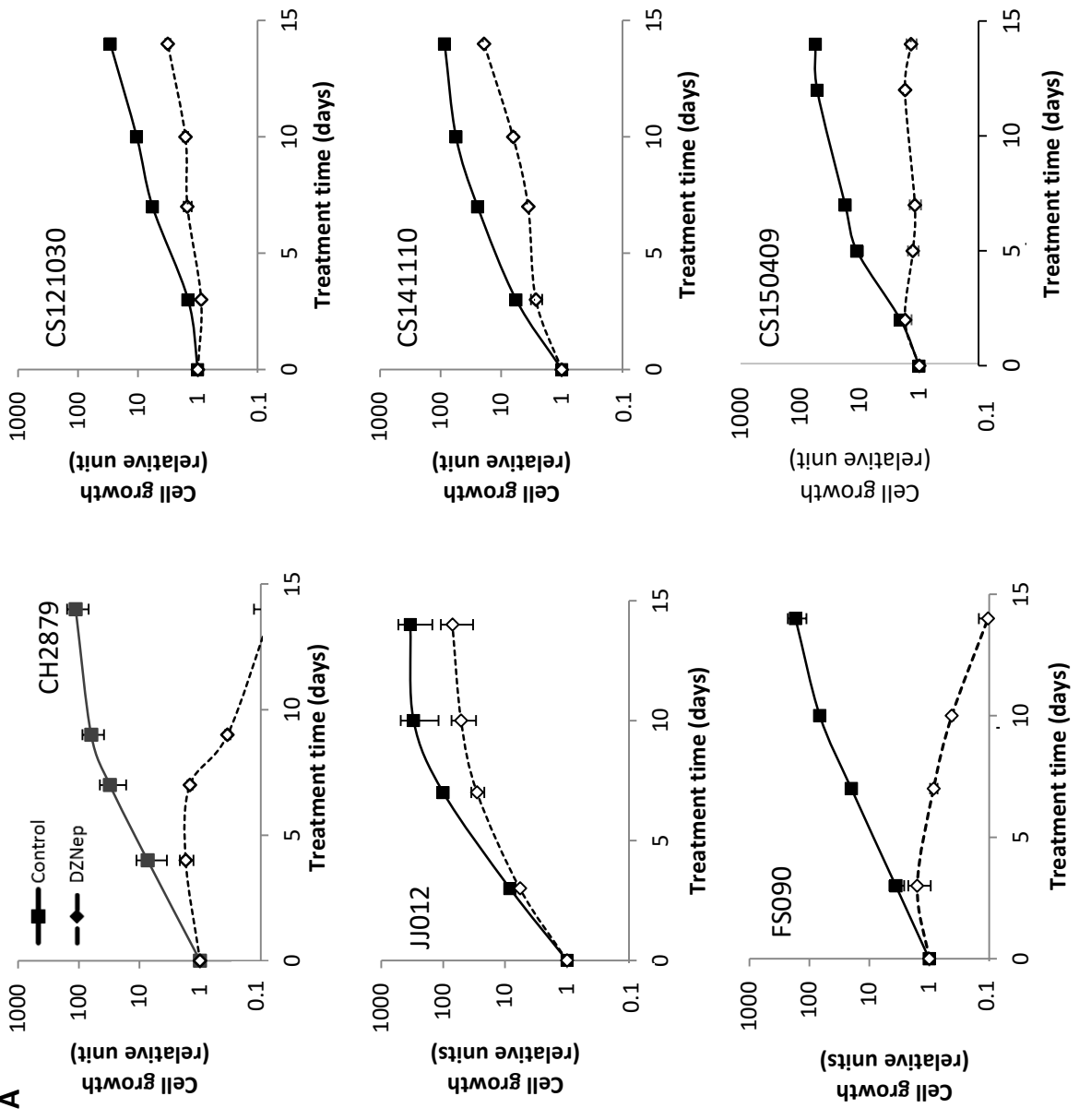
Protein-protein interaction networks between the genes with expression changes of at least 1.5-fold (table S2 and S3) as determined with STRING. The nodes represent the proteins, and the edges represent the corresponding PPI pairs.

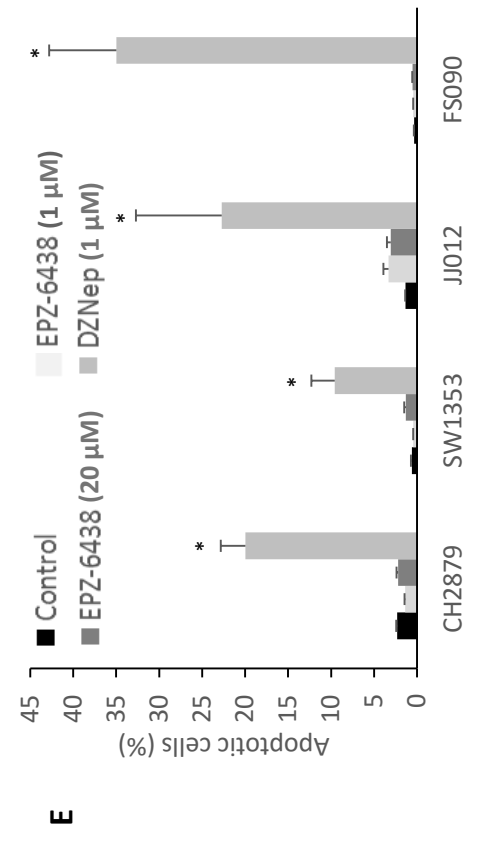
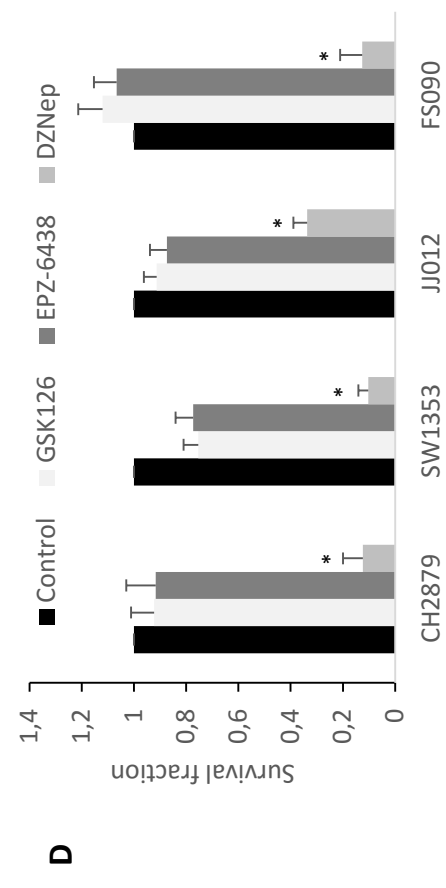
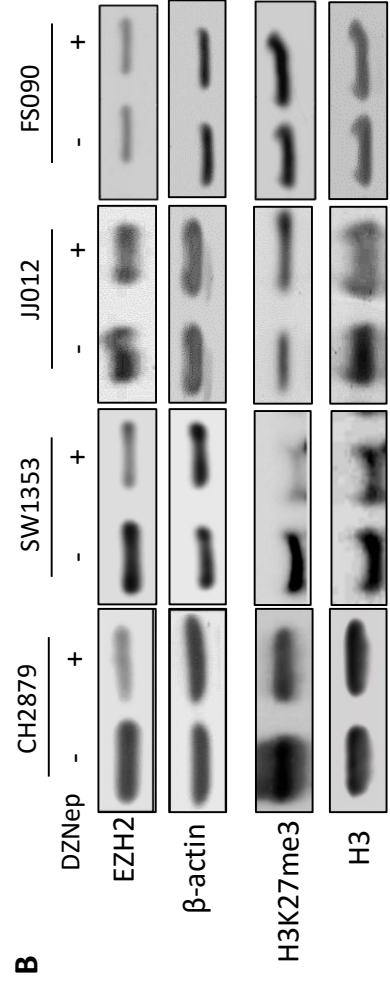
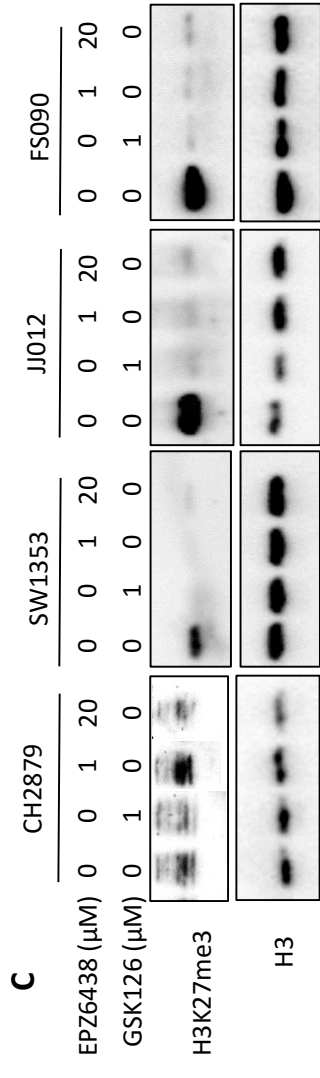
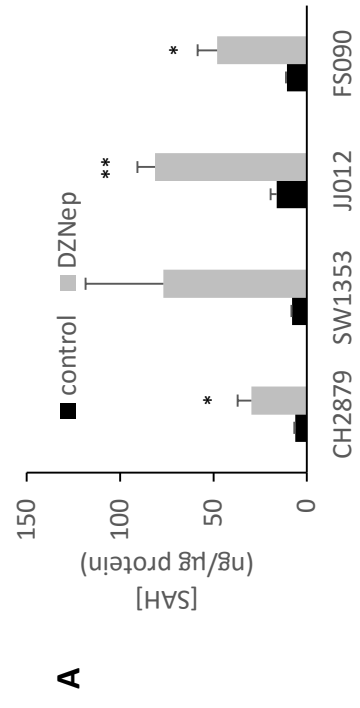
Figure 7: Expression of mRNA of identified genes in DZNep-treated CS and chondrocytes

EGFR, *RhoB* and *MAD1L1* mRNA expression was analyzed by RT-PCR from chondrosarcomas and chondrocytes treated with 1 μ M DZNep for 24 h. Data are expressed as means \pm SEM (N=3-5). *: p-value \leq 0.05.

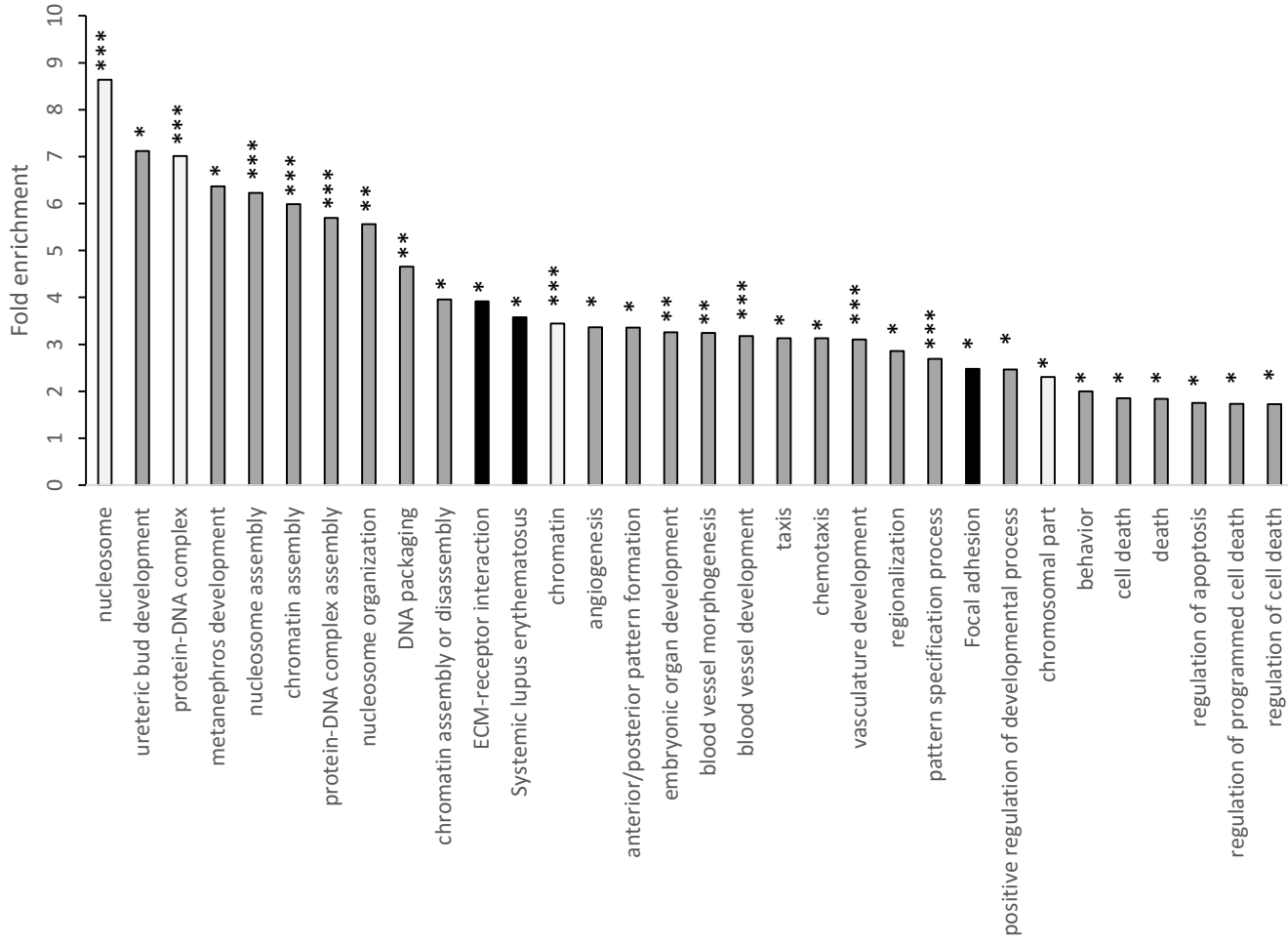




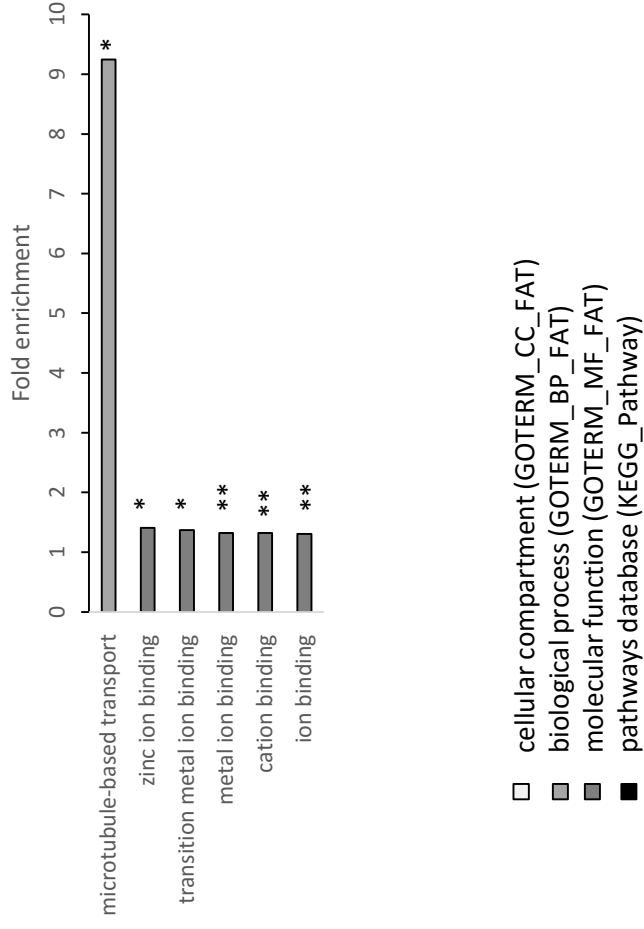




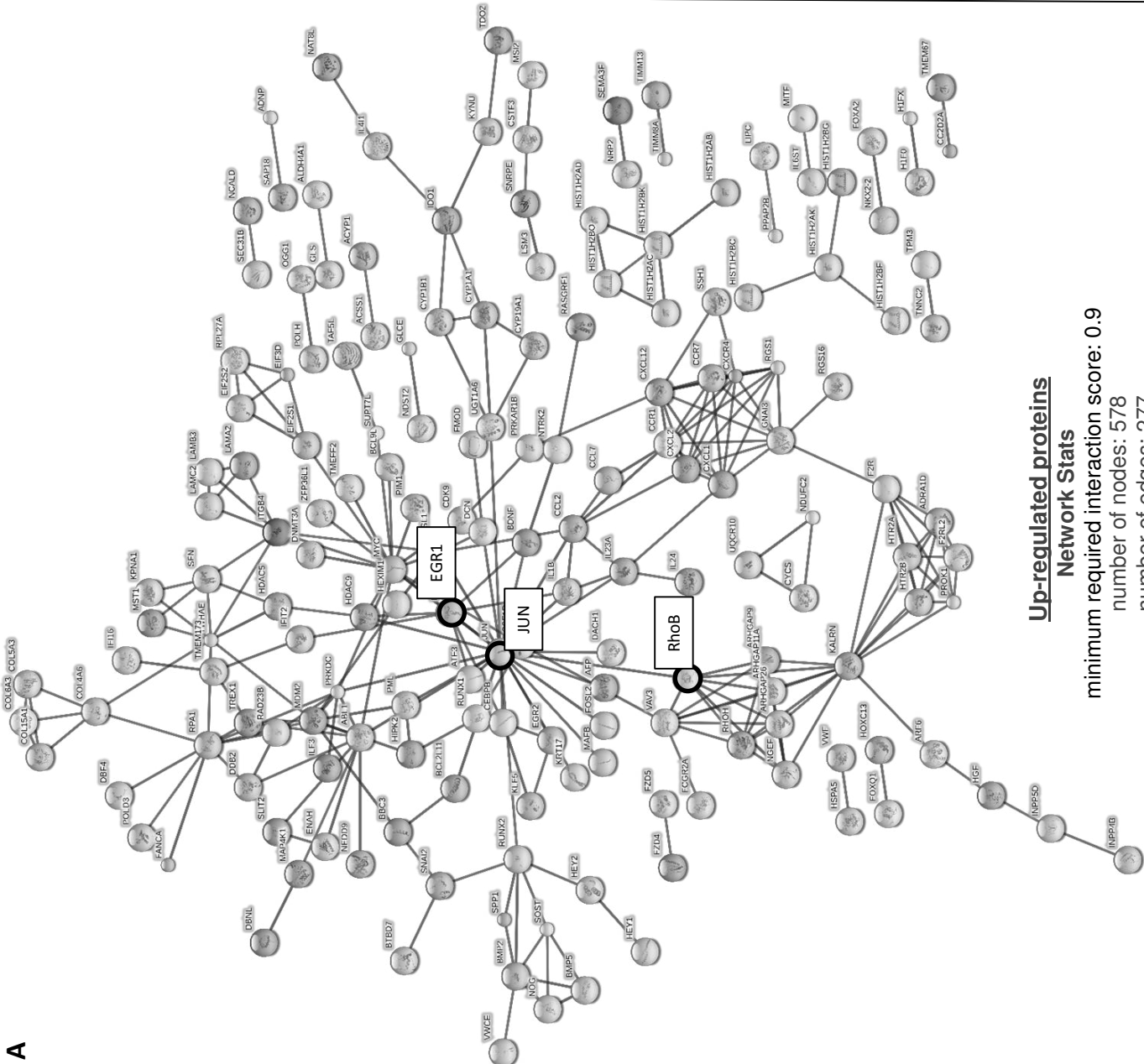
A



B



A

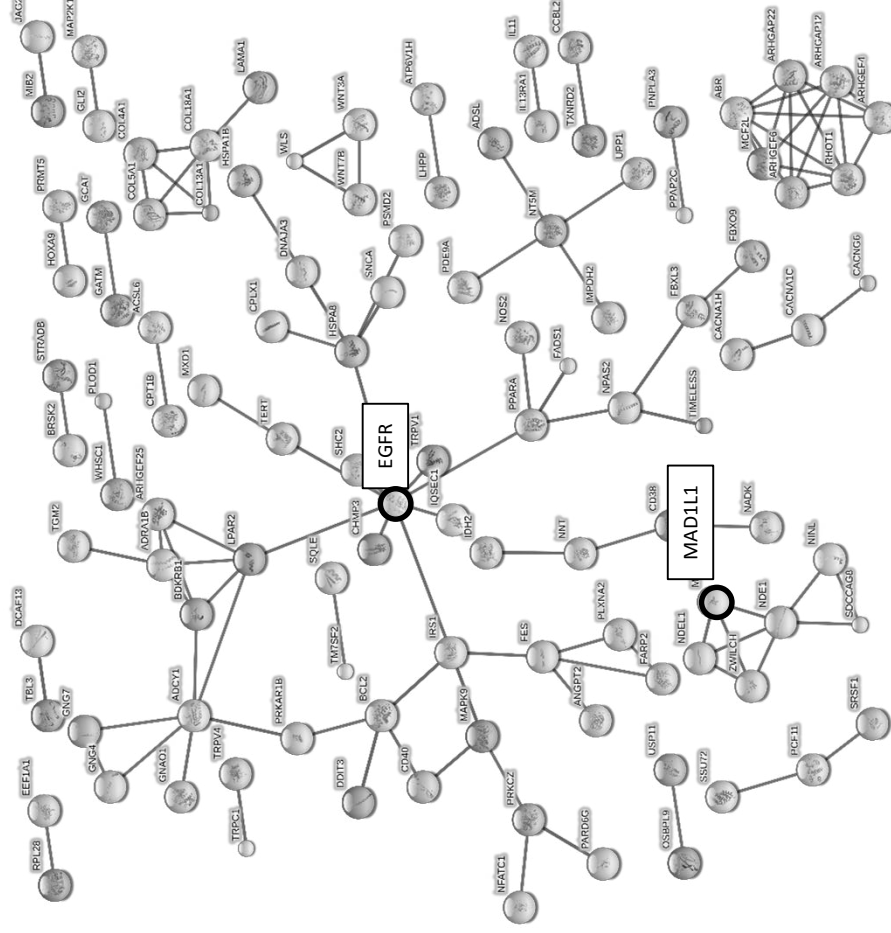


Up-regulated proteins

Network Stats

minimum required interaction score: 0.9
 number of nodes: 578
 number of edges: 277
 average node degree: 0.958
 clustering coefficient: 0.914
 expected number of edges: 82
 PPI enrichment p-value: 0

B

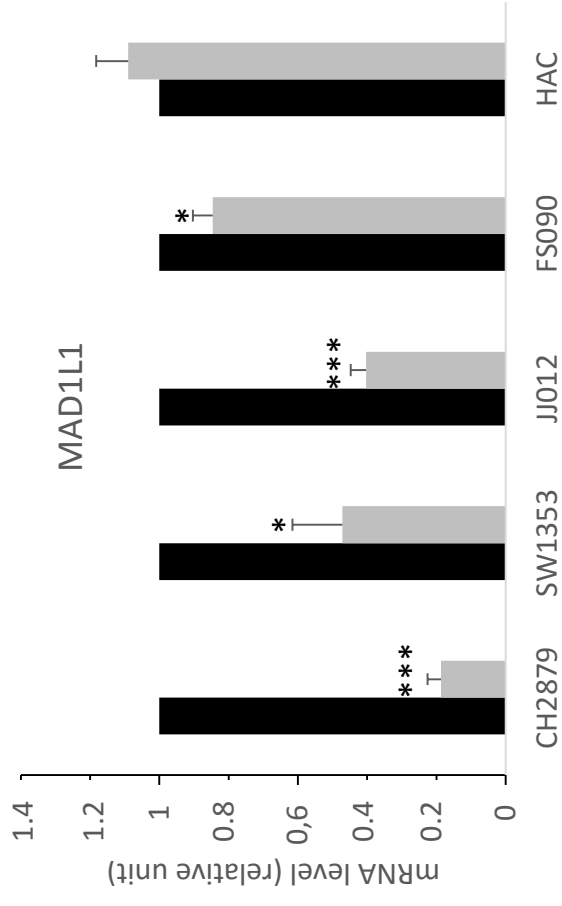
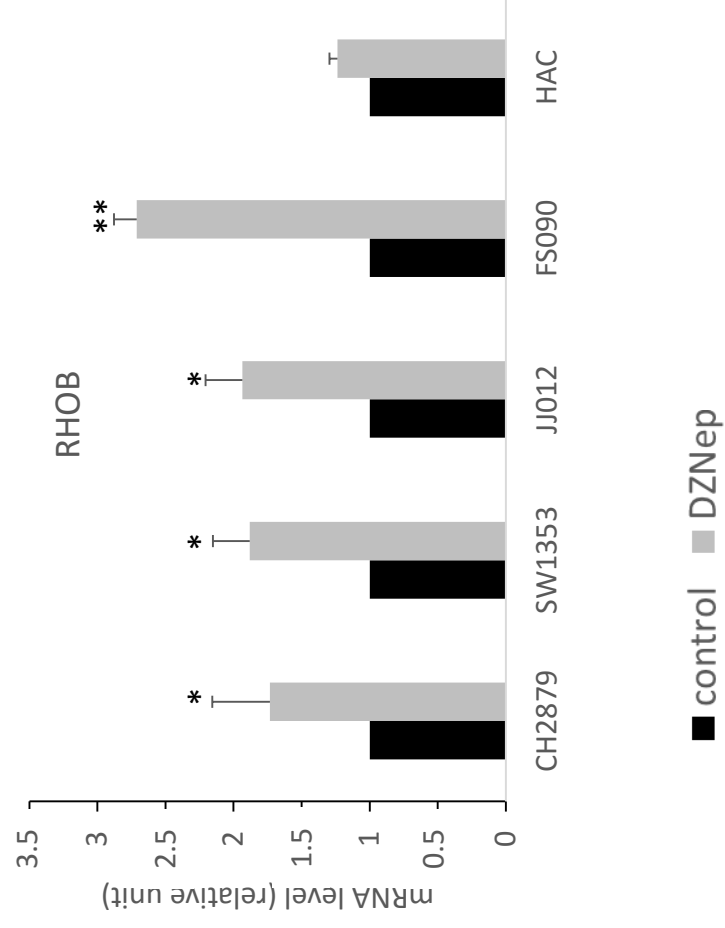
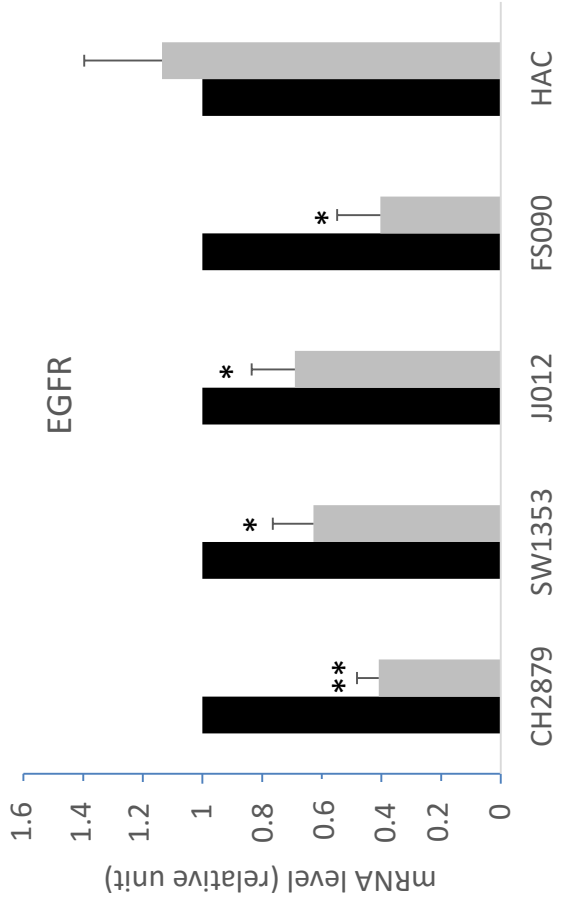


Down-regulated proteins

Network Stats

minimum required interaction score: 0.9
 number of nodes: 547
 number of edges: 112
 average node degree: 0.41
 clustering coefficient: 0.956
 expected number of edges: 40
 PPI enrichment p-value: 0

Figure 6



III) Effet chronique du DZNep chez des souris immunocompétentes

Contexte :

Ayant démontré l'effet pro-apoptotique du DZNep dans les chondrosarcomes in vitro et in vivo, nous avons voulu tester ses effets sur les tissus sains. En effet, peu d'études se sont intéressées aux effets secondaires du DZNep. Une étude a rapporté que son utilisation à une dose de 10mg/kg ne présente aucune toxicité (Bray et al., 2000), et une autre a montré qu'il provoque une accumulation de vacuoles lipidiques et une inflammation chez des rat atteints de sténose hépatique non-alcoolique (NAFLD) (Vella et al., 2013). De plus, à ma connaissance, aucun essai clinique n'a été mené avec le DZNep à ce jour.

Le but de cette étude est d'évaluer la toxicité chronique du DZNep dans des souris immunocompétentes par l'intermédiaire d'une étude comportementale (anxiété, locomotion, état dépressif et mémoire) et d'une analyse histologique des différents organes.

Résultats :

Chez les souris traitées au DZNep (2mg/kg, en intra-péritonéal, 3 fois par semaine, pendant 8 semaines), nous observons une perte de poids et une splénomégalie, toutes les deux réversibles après l'arrêt du traitement. Cependant, le DZNep induit une atrophie testiculaire qui perdure, au moins 15 jours après l'arrêt du traitement. L'analyse histologique du tissu testiculaire, réalisée par C. Bazille (Anatomo-pathologiste CHU, BioConnecT), a mis en évidence une perte totale de la spermatogenèse. L'analyse hématologique montre une réticulopénie chez les souris traitées au DZNep. Les autres tissus étudiés ne présentent aucune anomalie.

Le comportement des souris traitées au DZNep a été étudié à l'aide de différents tests comportementaux. L'activité locomotrice a été analysée à l'aide d'un test d'actimétrie. La mémoire à court terme a été étudiée par un test d'alternance spontanée et la mémoire à long terme à l'aide d'un test de reconnaissance d'objet. L'anxiété a été évaluée par le test de la boîte noire et blanche. Enfin, l'état dépressif est analysé à l'aide d'un test de nage forcée. De manière encourageante, l'analyse de ces différents tests a montré que le DZNep n'a pas d'impact sur le comportement des souris.

Conclusion :

Dans cette étude, la toxicité chronique du DZNep est évaluée dans un modèle de souris immunocompétentes. Le DZNep ne modifie pas leur comportement et induit des effets secondaires très limités. Il provoque une atrophie testiculaire irréversible. Cependant, cet effet secondaire est malheureusement retrouvé dans la plupart des traitements de chimiothérapie. Ces résultats sont encourageants quant à l'utilisation du DZNep dans le traitement des cancers et plus particulièrement des chondrosarcomes dont le seul traitement actuellement reste la résection chirurgicale.

Article en cours de soumission

Effect of chronic injections of S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaneplanocin A on male immunocompetent mouse: Behaviour and tissue analysis.

Lhuissier E¹, Bouet V⁵, Aury-Landas J¹, Bazille C^{1,2}, Repesse Y^{3,4}, Fréret T⁵, Boumediene K¹, Baugé C^{1*}

¹ EA7451 BioConnect, Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France

² Service d'Anatomie Pathologie, CHU de Caen, Caen, France

³ Hématologie biologique, CHU de Caen, Caen, France

⁴ Sérine protéases et physiopathologie de l'unité neurovasculaire, Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France

⁵ Normandie Univ, UNICAEN, COMETE, 14000 Caen, France

* Adress for correspondence:

Catherine Baugé

EA7451 BioConnect

Université de Caen Normandie

14032 CAEN

France

Phone: +33 (0)2 31 06 82 18

Fax: +33 (0)2 31 06 82 24

Abstract

3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, has been shown to decrease the expression of histone methyltransferase EZH2 and trimethylation of H3K27. Furthermore, DZNep demonstrated anti-tumour activity *in vitro* and *in vivo* against a various cancers and anti-inflammatory properties. Therefore, DZNep appears very promising for cancer treatment. However, no clinical trials have been performed with DZNep, nor chronic injections in alive animals. That is why, the aim of this study was to investigate the chronic administration of DZNep in mice on behaviour and several tissues and organs.

Chronic injections of DZNep were performed intraperitoneally in male NMRI mice (2mg/kg; *i.p.*; three times per week) during 56 days. A follow-up of body weight was assessed during all experiments. Histological analyzes were performed on several organs (testis, spleen, heart, liver, lung, brain, and kidney). Intracardiac blood samples were collected for hematological analysis. Finally, different behavioural tests were performed after different durations (3, 7, 8, 9, 10, or 11 weeks).

Chronic DZNep treatment transiently reduced animal growth. It had no effect on most organs but provoked a reversible splenomegaly, and irreversible testis reduction and erythropoiesis. DZNep administration did not alter animal behaviour, particularly on locomotor activity, cognition (working and recognition memory), anxiety and depressive-like behaviours.

In conclusion, this study is encouraging for the use of DZNep for cancer treatment. Indeed, it has not effect on behaviour and induces irreversible side effects limited on testis which are unfortunately found in most chemotherapy treatments but need to be taken account for.

Introduction

The understanding of epigenetic alterations, such as DNA methylation and histone methylation and acetylation provides emerging targets for cancer therapy. Inhibitors of histone deacetylases and DNA methylation have been developed and inhibitors of histone methylation are currently in development. 3-deazaneplanocin A (DZNep), a cyclopentanyl analog of 3-deazaadenosine, inhibits the activity of S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH), leading to cellular accumulation of S-adenosylhomocysteine (SAH), which in turn, indirectly represses the S-adenosyl-methionine-dependent histone lysine methyltransferase activities (Glazer et al., 1986). Initially investigated for its antiviral properties, DZNep inhibits the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), and particularly its catalytic subunit Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), inhibiting the trimethylation of the lysine 27 on histone H3 (H3K27me3) (Tan et al., 2007).

Interestingly, DZNep demonstrated anti-tumour activity against various cancers (Baugé et al., 2014). Indeed, it induces apoptosis, inhibits cell invasion, enhances chemotherapeutic sensitivity in tumour cells but not in normal cells and reverts epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Crea et al., 2012; Tan et al., 2007). Furthermore, DZNep is able to reactivate a set of PRC2 target genes (Tan et al., 2007). In addition to its anti-tumour effect, DZNep has anti-inflammatory effects and regulates genes involved in chondroprotective response in human articular chondrocytes, suggesting that it could slow down osteoarthritis process (Aury-Landas et al., 2017).

In vivo, DZNep inhibits tumour growth in chondrosarcoma (Lhuissier et al., 2017), embryonal rhabdomyosarcoma (Ciarapica et al., 2014), tongue cancer (Li et al., 2013), head and neck squamous cell carcinoma (Gannon et al., 2013), prostate cancer (Crea et al., 2011),

glioblastoma (Smits et al., 2010) , cervical cancer (Cai et al., 2016) and renal cell carcinoma (Liu et al., 2016). DZNep also increases bone formation and repressing excessive bone marrow fat formation in mice osteoporosis (Jing et al., 2016). DZNep has been reported to modulate allogenic T-cell response and may represent a novel therapeutic approach for treatment of graft versus host disease (Wang et al., 2013; He et al., 2012) and to inhibit liver fibrosis progression (Zeybel et al., 2017).

Among these studies, only few reports concern potential side effects of chronic DZNep treatment. There is only one study that reported no obvious toxicity after acute administration (10 mg/kg) (Bray et al., 2000). However, no study on mice behaviour has been conducted *in vivo* and yet no clinical trial have been conducted with DZNep in humans. As a putative anticancer drug that could be eligible for several tumors, it is of importance to consider its side effect *in vivo*. The aim of our study was to investigate the chronic effects of DZNep in NMRI mice growth, organs, haematological parameters, activity and cognitive functions.

Material and methods

Animal experimental procedures were performed according to local legislation, and procedures were approved by ethics committee (Comité d’Ethique Normandie en Matière d’Expérimentation Animale, agreement #03968.01). The animals were provided and kept in the animal facility (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Caen, France) under controlled temperature and light conditions (temperature $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12h reversed light-dark cycle). Animals had *ad libitum* access to food and water. Each animal was humanely handled

throughout the experiment in accordance with internationally accepted ethical principles for laboratory animal use and care, and all efforts were made to minimize animal suffering.

Animal groups and treatment

The experiment was performed on male NMRI mice (8 weeks old). Two groups of mice (n=17/group) receiving either DZNep (2mg/kg; intraperitoneal injection; three times per week during 56 days; dissolved in NaCl 0.9%; provided by Tocris, Lille, France) or vehicle (NaCl 0.9%) were constituted. A follow-up of body weight was performed during all experiment and behaviour experiments were performed. At the end of the treatment (56 days), 7 animals were euthanized by cervical dislocation and several organs (spleen, testis, lung, heart, brain, kidney and liver) were collected for analysis. During washout period (14 days after treatment arrest), behaviour experiments were performed and at the end of the 70 days (*i.e.* 56 days of treatment then 14 days of washout), animals were anesthetized (isoflurane 3%, in a mixture $\frac{1}{2}$ O₂/N₂O) and intracardiac blood samples and several organs (spleen, testis, lung, heart, brain, kidney, liver) were collected for haematological and histopathological analysis.

Histology tissues

After resection, organs (testis, spleen, brain, lung, heart, kidney and liver) were weighed and fixed in 20% formalin during 48 hours and embedded in paraffin. The sections were stained with hematoxylin, eosin and saffron and the histological aspect of the different organs was analyzed by standard light microscopy.

Hematological analysis

Samples of 3.2% citrated blood were collected after cardiac punctures. Blood samples were analyzed with the multiple parameters automated haematology analyzer XN-9000 (Sysmex France, Villepinte, France) within 6 hours after blood draw. Counts of platelet count, haemoglobin count, red and white cells count, neutrophils count, lymphocytes, monocytes, eosinophil, basophils and reticulocytes were determined using the impedance channel (Hématologie biologique, CHU de Caen, Caen, France).

Locomotor activity

Spontaneous activity was recorded in actimeter units (IMETRONIC®, France) as described previously (Bazin et al., 2009). The number of light beams interruptions (two level of beams for horizontal and vertical activity) was recorded during a single session of 30 min and used as an index of spontaneous locomotor activity. Locomotor activity was assessed 18 and 46 days after the beginning of the treatment and 3 days after the end of the treatment (figure 1).

Spontaneous alternation in Y-maze

Spatial working memory performances were assessed by recording spontaneous alternation behaviour in a single-session Y-maze test (Bazin et al., 2009). Experiment was assessed at the end of the treatment (day 58) (figure 1). The maze consisted of three equally spaced arms (22 cm long, 6.5 cm wide, walls of 10 cm high) made of black-painted wood. The mouse was placed at the end of one arm and allowed to explore the maze freely during a 5 min session. The number and the sequence of arm entries and rearing were recorded by the observer. An arm

entry was scored when all four feet crossed into the arm. Alternation behavior is defined as consecutive entries into all three arms. The percentage of alternation was calculated as a memory index by the (number of alternation/maximal theoretical number of alternation) × 100.

Recognition memory

Object recognition test was performed in 2 sessions separated by a 24h-intersessions interval. Experiment was performed in open field (33x33x20 cm, wood painted black), with four duplicates of two different objects available (Lego® vs Falcon®). Recognition memory was assessed at the end of the treatment (days 63-64-65) (figure 1). The first day, mice was placed alone in the open field during 5 min for habituation of the box. The second day, each mouse was placed in the open field during 5 min with an unknown object different from those used during the test. Finally, on the third day, two experimental trials (6 min each or 20s accumulated for exploration of the 2 objects) separated by a 60 min inter-trial interval (ITI) were performed. During the first trial (acquisition session), the mouse was allowed to explore two identical objects (a1 and a2) before being placed back in its home cage. For the second trial (retention session), two different objects were used — an identical copy of the familiar object (a3) and a novel one (b). Between animals, the relative position of the two objects was alternated randomly. The objects and the open field were cleaned with diluted 70% ethanol between each trial. Exploration time was defined as the time spent with the nose at a distance less than 2 cm from the object or touching the object with forelimbs. Exploration times were manually recorded (stopwatches) by an experimenter located one meter from the apparatus and by indirect observation of the animal in a mirror. A discrimination index, on which the

analyses were performed, was then calculated from the exploration times: [novel object–familiar object]/[novel object+familiar object].

Anxiety-like behaviour

Anxiety-like behaviour was assessed in the light-dark box (LETICA LE 810, Bioseb®, France) on the basis of the innate preference of mice for dark and confined compared to light and open spaces. Anxiety-like behaviour was performed 16 and 44 days after the beginning of the treatment and 1 day after the end of the treatment (figure 1). The mouse was placed in the center of the illuminated white compartment (28x27x27 cm, 900 lux) and left to freely explore the apparatus for 5 min. The latency to enter the dark compartment (17x27x27 cm, 100 lux, red light, 120s maximum), the number of transitions between the compartments and the time spent in each compartment were collected. The percentage of time spent in the lit compartment was used as an index of anxiety-like behaviour.

Depressive-like behaviour

Forced swimming test is based on the immobile posture adopted by mice when exposed to an inescapable stressor and is used to detect potential antidepressant effects of drugs. Depressive-like behaviour was assessed at the end of the treatment (day 70) (figure 1). The apparatus consisted of a transparent glass cylinder (30cm height, 15cm diameter) containing water (20 cm deep) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. The mouse was placed in the water and the immobility time, the time of swimming and the time of climbing were collected during the last 4min of the 6min testing period as already described (Aguila et al., 2007). The latency was also recorded.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was determined with Student's test for haematological analysis. According to the behavioural test, a one or two-way ANOVA with repeated measurements was performed. When necessary, a Fisher's PLSD test, as posthoc test, was performed. For spontaneous alternation in Y-maze, Univariate T-test compared to 50% of alternation was performed. P-values \leq 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Effects of chronic DZNep on body weight and organs

The chronic administration of DZNep (2mg/kg; *i.p.*, three times per week during 56 days) was investigated in male NMRI mice. Animals displayed a significant decrease in body weight after 3 weeks of DZNep treatment, but this decrease is reversible few days after treatment arrest (figure 2A). We analyzed several tissues and organs after 56 days of treatment. Noticeably, we observed an increase in spleen weight but this splenomegaly disappears after a two-week wash-out period (figure 2B). Histological analysis of spleen sections, after the wash-out, did not show difference between treated or untreated mice (figure 2C). In another hand, we observed a decrease in testis weight and volume, both being still visible after the two week wash-out period (figure 2B). Testis histological sections showed a hyperplasia of Leydig cells and a disappearance of spermatogonia (figure 2C). No modification was observed in other tissues (heart, lung, brain, kidney, liver), neither in weight nor in histology (figure 2D and E).

Hematological analysis did not reveal difference in cell blood count, except a reduction of reticulocyte number (table 1).

Chronic DZNep treatment did not affect spontaneous locomotor activity

DZNep-treated and control mice were tested for 30-min locomotor activity 3 and 7 weeks after the beginning of the treatment and 1 week after the end of the treatment. No significant difference was observed. Chronic DZNep treatment had not effect on spontaneous locomotor activity, either vertically or horizontally, as observed by the absence of difference in the light beams interruptions (figure 3A) and rearing number (figure 3B).

Chronic DZNep treatment did not modify memory performances

Next, we analyzed memory performances. Immediate spatial working memory was performed by spontaneous alternation in the Y-maze. Mice treated with DZNep displayed similar spontaneous alternation performances as control mice. Indeed, DZNep had not effect on overall activity of mice in the maze (figure 4A) nor on working memory performances of mice (percentage of alteration > 50%; $p=0.23$) (figure 4B). The results did not reveal any deleterious effect of DZNep on working memory.

Recognition memory was assessed by object recognition test. During the acquisition session, there was no difference in exploration time of the two identical objects between DZNep-treated and control mice (figure 5A). During the retention session, the time spent to explore the new object was significantly increased compared to the time spent to explore the familiar object whatever the group indicating that DZNep had no effect on recognition memory

performances (figure 5B). Overall, the level of objects exploration was not affected by chronic DZNep treatment (figure 5C). These data suggest that DZNep had no effect on long term memory.

Chronic DZNep treatment did not influence anxiety-like behaviour

Furthermore, we investigated anxiety-like behaviour on the basis of preference of mice for dark and confined compared to light and open spaces. There was no significant difference in the number of transitions between the two compartments, between treated and control mice, suggesting similar levels of exploratory and spontaneous activity in the maze. However, there was a decrease in the number of transitions with the repetition of the test over week 3 to week 9 in two groups suggesting possible habituation to the test (figure 6A). Furthermore, DZNep had no effect on the percentage of time spent in the light box (figure 6B). However, at the end of the treatment (week 9), DZNep tended to increase the level of anxiety, as attested by a decrease in the percentage of time spent in the light box ($p=0.055$) (not significant). These results suggest that chronic DZNep treatment did not affect anxiety-like behaviour.

Chronic DZNep treatment does not affect depressive-like behaviour

In the forced swimming test, there was no significant difference in immobility, climbing and swimming percentages between DZNep-treated and control animals (figure 7A). Furthermore, DZNep had no effect on time of immobilization per minute (figure 7B). These data reveal that DZNep treatment did not affect depressive-like behaviour.

Discussion

Many cancers are resistant to current chemotherapeutic agents. This is why it is necessary to develop new therapies. Among these, DZNep, initially described as an inhibitor of histone demethylase EZH2, showed promising effects *in vitro* and *in vivo*. It induces the death of many cancers but not in normal cells (Tan et al., 2007). However, few studies have been carried out on its potential side effects. Thus, the aim of this study was to investigate the chronic effect of DZNep in immunocompetent mice. We show that chronic injection of DZNep transiently reduced animal growth. It had no effect on animal behaviour and few side effects on organs and tissues. It induced reversible splenomegaly and irreversible testicular atrophy.

The DZNep dose used here (2mg/kg; 3 times a week) has been proven to be globally safe for animals. This dose was chosen based on previous studies that had determined doses that are safe for *nude* mice (Zhang et al., 2015; Chiba et al., 2012; Fiskus et al., 2009). Our study show that chronic DZNep injections have no effect on most biological tissues (heart, lung, brain, kidney, liver), whether in terms of weight or histology. The brain is not affected possibly because DZNep, as a hydrophilic drug with a negative partition coefficient ($\log P = -1.38$) and highly soluble in water, features making difficult for the drug to cross the blood-brain-barrier (Crea et al., 2012).

We also show that an exposure to this treatment for 56 days induced a reversible decrease in body weight in male immunocompetent mice. However, it has been reported that female NOD/SCID immunodeficient mice tolerated well a 5 weeks DZNep treatment with no weight loss observed (Gannon et al., 2013) and that a 4 weeks DZNep treatment did not modify weight of *nude* mice (personal data). This difference could explain by the fact that it is not the same mice or by implication of the immune system. Our treatment affected also spleen and

testis, and probably erythropoiesis. Interestingly, spleen and testis tissues highly expressed EZH2 (Béguelin et al., 2013; Hinz et al., 2010), which may explain their higher sensitivity to DZNep. However, we did not observe any histological changes in the kidney after DZNep treatment while a study in Sprague Dawley rat, showed that it induced nephrotoxicity and renal atrophy in a dose-dependent manner (Sun et al., 2012).

Furthermore, DZNep half-life in mice is comprised between 1 and 3 hours (Peer et al., 2013; Sun et al., 2012). To overcome these shortcomings of DZNep in pharmacokinetic and toxic properties, Sun et al. have developed a pegylated DZNep formulation in a rat model for minimize interactions with healthy cells and optimize its delivery. The entrapment of DZNep within the pegylated liposomes prolonged the retention and improved the pharmacokinetic of DZNep, including the increase in the distribution half-life and elimination half-life, the initial plasma concentration and the mean residence time. This strategy would probably increase the therapeutic effect of DZNep on tumors, and avoid using too high doses of drug by optimizing its delivery.

We focused for the first time, on the effect of chronic DZNep treatment on NMRI mice behaviour, and especially on anxiety and depressive-like behaviour and locomotor activity as well as working and recognition memory performances. No significant difference was observed between treated and control animals although the DZNep tends to increase anxiety (not significant). These data are encouraging for the use of DZNep in clinical trial.

In conclusion, the present study is the first which focuses on chronic effects of DZNep in immunocompetent mice with behaviour tests and organs and hematological analysis. Although DZNep has not yet been tested in clinical trial, we show that DZNep has no effect on behaviour and induces side effects irreversible limited only on testis which is unfortunately

found in most chemotherapy treatment. Cancer affects both man and women, so it would be interesting to study effects of DZNep on female immunocompetent mice, particularly reproductive apparatus female.

Acknowledgments

We thank Gerald NEE and Stacy LARGILLIERE (COMETE, UNICAEN, France) for technical assistance and advice for animal experiments. We also thank Benoit HAELEWYN (CYCERON, UNICAEN, France). This study was funded by Region Basse-Normandie.

References

Aguila, B., Coulbault, L., Boulouard, M., Lliveill, F., Davis, A., Toth, G., Borsodi, A., Balboni, G., Salvadori, S., Jauzac, P., et al. (2007). In vitro and in vivo pharmacological profile of UFP-512, a novel selective δ -opioid receptor agonist; correlations between desensitization and tolerance. *Br. J. Pharmacol.* *152*, 1312–1324.

Aury-Landas, J., Bazille, C., Allas, L., Bouhout, S., Chesneau, C., Leclercq, S., Boumédiene, K., Baugé, C. (2017). Anti-inflammatory and chondroprotective effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor 3-Deazaneplanocin A, in human articular chondrocytes. *Scientific Reports*. *In press*.

Baugé, C., Bazille, C., Girard, N., Lhuissier, E., and Boumediene, K. (2014). Histone methylases as novel drug targets: developing inhibitors of EZH2. *Future Med. Chem.* *6*, 1943–1965.

Bazin, M.-A., Kihel, L.E., Boulouard, M., Bouët, V., and Rault, S. (2009). The effects of DHEA, 3 β -hydroxy-5 α -androstane-6,17-dione, and 7-amino-DHEA analogues on short term and long term memory in the mouse. *Steroids* *74*, 931–937.

Béguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K.L., Rosen, M., Shen, H., Yang, S.N., Wang, L., Ezponda, T., et al. (2013). EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell* *23*, 677–692.

- Bray, M., Driscoll, J., and Huggins, J.W. (2000). Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral Res.* *45*, 135–147.
- Cai, L., Wang, Z., and Liu, D. (2016). Interference with endogenous EZH2 reverses the chemotherapy drug resistance in cervical cancer cells partly by up-regulating Dicer expression. *Tumor Biol.* *37*, 6359–6369.
- Chiba, T., Suzuki, E., Negishi, M., Saraya, A., Miyagi, S., Konuma, T., Tanaka, S., Tada, M., Kanai, F., Imazeki, F., et al. (2012). 3-Deazaneplanocin A is a promising therapeutic agent for the eradication of tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer* *130*, 2557–2567.
- Ciarapica, R., Carcarino, E., Adesso, L., De Salvo, M., Bracaglia, G., Leoncini, P.P., Dall’agnese, A., Verginelli, F., Milano, G.M., Boldrini, R., et al. (2014). Pharmacological inhibition of EZH2 as a promising differentiation therapy in embryonal RMS. *BMC Cancer* *14*, 139.
- Coulombe, R.A., Sharma, R.P., and Huggins, J.W. (1995). Pharmacokinetics of the antiviral agent 3-deazaneplanocin A. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* *20*, 197–202.
- Crea, F., Hurt, E.M., Mathews, L.A., Cabarcas, S.M., Sun, L., Marquez, V.E., Danesi, R., and Farrar, W.L. (2011). Pharmacologic disruption of Polycomb Repressive Complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer. *Mol. Cancer* *10*, 40.
- Crea, F., Paolicchi, E., Marquez, V.E., and Danesi, R. (2012). Polycomb genes and cancer: Time for clinical application? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *83*, 184–193.
- Fiskus, W., Wang, Y., Sreekumar, A., Buckley, K.M., Shi, H., Jillella, A., Ustun, C., Rao, R., Fernandez, P., Chen, J., et al. (2009). Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* *114*, 2733–2743.
- Gannon, O.M., Merida de Long, L., Endo-Munoz, L., Hazar-Rethinam, M., and Saunders, N.A. (2013). Dysregulation of the repressive H3K27 trimethylation mark in head and neck squamous cell carcinoma contributes to dysregulated squamous differentiation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 428–441.
- Glazer, R.I., Knode, M.C., Tseng, C.K., Haines, D.R., and Marquez, V.E. (1986). 3-Deazaneplanocin A: a new inhibitor of S-adenosylhomocysteine synthesis and its effects in human colon carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* *35*, 4523–4527.
- He, S., Wang, J., Kato, K., Xie, F., Varambally, S., Mineishi, S., Kuick, R., Mochizuki, K., Liu, Y., Nieves, E., et al. (2012). Inhibition of histone methylation arrests ongoing graft-versus-host disease in mice by selectively inducing apoptosis of alloreactive effector T cells. *Blood* *119*, 1274–1282.
- Hinz, S., Magheli, A., Weikert, S., Schulze, W., Krause, H., Schrader, M., Miller, K., and Kempkensteffen, C. (2010). Deregulation of EZH2 expression in human spermatogenic disorders and testicular germ cell tumors. *World J. Urol.* *28*, 631–635.

- Jing, H., Liao, L., An, Y., Su, X., Liu, S., Shuai, Y., Zhang, X., and Jin, Y. (2016). Suppression of EZH2 Prevents the Shift of Osteoporotic MSC Fate to Adipocyte and Enhances Bone Formation During Osteoporosis. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *24*, 217–229.
- Leger, M., Paizanis, E., Dzahini, K., Quiedeville, A., Bouet, V., Cassel, J.-C., Freret, T., Schumann-Bard, P., and Boulouard, M. (2015). Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cereb. Cortex* *25*, 4048–4061.
- Lhuissier, E., Bazille, C., Aury-Landas, J., Girard, N., Pontin, J., Boittin, M., Boumediene, K., and Baugé, C. (2017). Identification of an easy to use 3D culture model to investigate invasion and anticancer drug response in chondrosarcomas. *BMC Cancer* *17*, 490.
- Li, Z., Wang, Y., Qiu, J., Li, Q., Yuan, C., Zhang, W., Wang, D., Ye, J., Jiang, H., Yang, J., et al. (2013). The polycomb group protein EZH2 is a novel therapeutic target in tongue cancer. *Oncotarget* *4*, 2532–2549.
- Liu, L., Xu, Z., Zhong, L., Wang, H., Jiang, S., Long, Q., Xu, J., and Guo, J. (2016). Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes tumour cell migration and invasion via epigenetic repression of E-cadherin in renal cell carcinoma. *BJU Int.* *117*, 351–362.
- Miranda, T.B., Cortez, C.C., Yoo, C.B., Liang, G., Abe, M., Kelly, T.K., Marquez, V.E., and Jones, P.A. (2009). DZNep Is a Global Histone Methylation Inhibitor that Reactivates Developmental Genes Not Silenced by DNA Methylation. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 1579–1588.
- Peer, C.J., Rao, M., Spencer, S.D., Shahbazi, S., Steeg, P.S., Schrupp, D.S., and Figg, W.D. (2013). A Rapid Ultra HPLC-MS/MS Method for the Quantitation and Pharmacokinetic Analysis of 3-Deazaneplanocin A in Mice. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *927*, 142–146.
- Smits, M., Nilsson, J., Mir, S.E., van der Stoop, P.M., Hulleman, E., Niers, J.M., de Witt Hamer, P.C., Marquez, V.E., Cloos, J., Krichevsky, A.M., et al. (2010). miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget* *1*, 710–720.
- Sun, F., Li, J., Yu, Q., and Chan, E. (2012). Loading 3-deazaneplanocin A into pegylated unilamellar liposomes by forming transient phenylboronic acid–drug complex and its pharmacokinetic features in Sprague–Dawley rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *80*, 323–331.
- Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P.L., Karuturi, R.K.M., Tan, P.B.O., Liu, E.T., and Yu, Q. (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* *21*, 1050–1063.
- Wang, J., Li, L., Xu, M., Rong, R., and Zhu, T. (2013). Modulation of allogeneic CD8+ T-cell response by DZNep controls GVHD while preserving hematopoietic chimerism. *Transplantation* *96*, 774–781.
- Zeybel, M., Luli, S., Sabater, L., Hardy, T., Oakley, F., Leslie, J., Page, A., Moran Salvador, E., Sharkey, V., Tsukamoto, H., et al. (2017). A Proof-of-Concept for Epigenetic Therapy of Tissue

Fibrosis: Inhibition of Liver Fibrosis Progression by 3-Deazaneplanocin A. *Mol. Ther.* 25, 218–231.

Zhang, P., Yang, X., Ma, X., Ingram, D.R., Lazar, A.J., Torres, K.E., and Pollock, R.E. (2015). Antitumor effects of pharmacological EZH2 inhibition on malignant peripheral nerve sheath tumor through the miR-30a and KPNB1 pathway. *Mol. Cancer* 14, 55.

Figure legends

Figure 1: Experimental design

(A) NMRI mice were treated for 56 days with DZNep (*i.p.*, 2mg/kg, 3 times per week) (n=18/group). After 16 and 44 days of DZNep treatment anxiety-like behaviour was performed and after 18 and 46 days of DZNep treatment was assessed. Organs and tissues were removed after 56 days of treatment.

(B) After 56 days of DZNep injections, mice were kept alive during 15 days without injections (n=15/group). Anxiety-like behaviour was performed at day 57, spontaneous alternation in Y-maze at day 58 and locomotor activity at day 59. Recognition memory was assessed during 3 days with different sessions (day 63: habituation session, day 64: acquisition session and day 65: retention session). Finally, depressive-like behaviour was performed after 70 days. Organs and tissues were removed at day 71.

Figure 2: DZNep reduced mice weight, and affected spleen and testis

(A) NMRI mice were treated for 56 days with DZNep (*i.p.*, 2mg/kg/days, 3 times a week), then kept alive for 15 supplemental days without injection. Weight of mice were measured regularly during experiment.

(B) For testis and spleen, weight was measured at the end of treatment (d56, n=7) and 15 days later (without supplemental injections) (d56+d15, n=29). Data are expressed as means \pm SEM.

(C) For testis and spleen, histological sections with HES staining were performed after 56 days of treatment and 15 supplemental days without injection. Testicular atrophy and splenic hypertrophy were observed in treated mice compared to control mice (n=3).

D) At the end of treatment, tissue weights were evaluated. Data are expressed as means \pm SEM (n=5).

(E) For heart, brain, lung, kidney and liver, histological sections with HES staining were performed after 56 days of treatment and 15 days later (without supplemental injections). Normal parenchyma was observed in treated mice (n=3).

Figure 3: Effect of chronic DZNep injections on spontaneous locomotor activity

Spontaneous locomotor activity was performed 3 and 7 weeks (n=36) after the beginning of the treatment and 1 week after the end of the treatment (week 9; n=29). (A) Number of light beams interruptions was evaluated and (B) number of rearing was assessed between treated and control mice. Data are expressed as means \pm SEM.

Figure 4: Effect of DZNep treatment on short term memory

Spontaneous alternation in the Y-maze was performed at the end of the treatment (week 9; n=29). Effect of chronic DZNep treatment on (A) number of entries in each arm of Y-maze and (B) spontaneous alternation percentages in the Y-maze between DZNep treated and untreated mice. Data are expressed as means \pm SEM.

Figure 5: Effect of chronic DZNep treatment on long term memory

Long term memory was performed by object recognition test at the end of treatment (week 10; n=29). (A) Time exploration of objects at acquisition was evaluated; a1 and a2 relevant to identical object. (B) Time exploration of objects to retention was assessed as well as (C) overall exploration level. Data are expressed as means \pm SEM.

Figure 6: Effect of DZNep injections on anxiety-like behaviour

Light-dark box test was performed 3 and 7 weeks (n=36) after the beginning of the treatment and 1 week after the end of the treatment (week 9; n=29). Effect of chronic DZNep treatment on (A) number of transition between two compartments and (B) percentage of time spent in the light compartment between treated and control mice. Data are expressed as means \pm SEM.

Figure 7: Effect of chronic DZNep treatment on depressive-like behaviour

Depressive-like behaviour was performed by forced swimming test at the end of the treatment (week 11; n=29). Effect of chronic DZNep injections on (A) percentage of immobility, climbing and swimming and (B) downtime per minute between treated and control animals. Data are expressed as means \pm SEM.

Tables

Table 1: Hematological parameters in NMRI mice.

Mice were treated with DZNep for 56 days. Blood analysis were done 15 days after the end of injections. Values represents means \pm SEM. n = 15 for control group; n = 14 for DZNep group.

	Control	DZNep	p-value
WBC ($10^9/l$)	2.41 \pm 0.32	1.91 \pm 1.01	0.246
RBC ($10^{12}/l$)	7.61 \pm 0.14	7.24 \pm 1.03	0.231
HGB (g/dl)	11.86 \pm 0.22	11.30 \pm 1.65	0.258
MCV (fl)	54.44 \pm 0.37	54.54 \pm 1.94	0.875
Platelets ($10^9/l$)	540.79 \pm 64.99	442.24 \pm 104.85	0.188
PDW (fl)	6.12 \pm 0.09	6.25 \pm 0.88	0.623
Neutrophils ($10^9/l$)	0.53 \pm 0.04	0.46 \pm 0.16	0.321
Lymphocytes ($10^9/l$)	1.64 \pm 0.22	1.19 \pm 0.57	0.122
Monocytes ($10^9/l$)	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.03	0.943
Eosinophils ($10^9/l$)	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.01	0.504
Basophils ($10^9/l$)	0.00 \pm 0.00	0.02 \pm 0.08	0.263
Reticulocytes ($10^9/l$)	220.91 \pm 11.05	187.55 \pm 33.76	0.028
IRF (%)	36.96 \pm 2.46	30.58 \pm 5.57	0.038
Ret-He (pg)	18.54 \pm 0.15	17.98 \pm 0.65	0.020

Abbreviations: WBC: white blood cell count, RBC: red blood cell count, HGB: hemoglobin, MCV: mean corpuscular volume, PDW: Platelet distribution Width, IRF: Immature Reticulocyte fraction; Ret-He: reticulocyte haemoglobinemia content

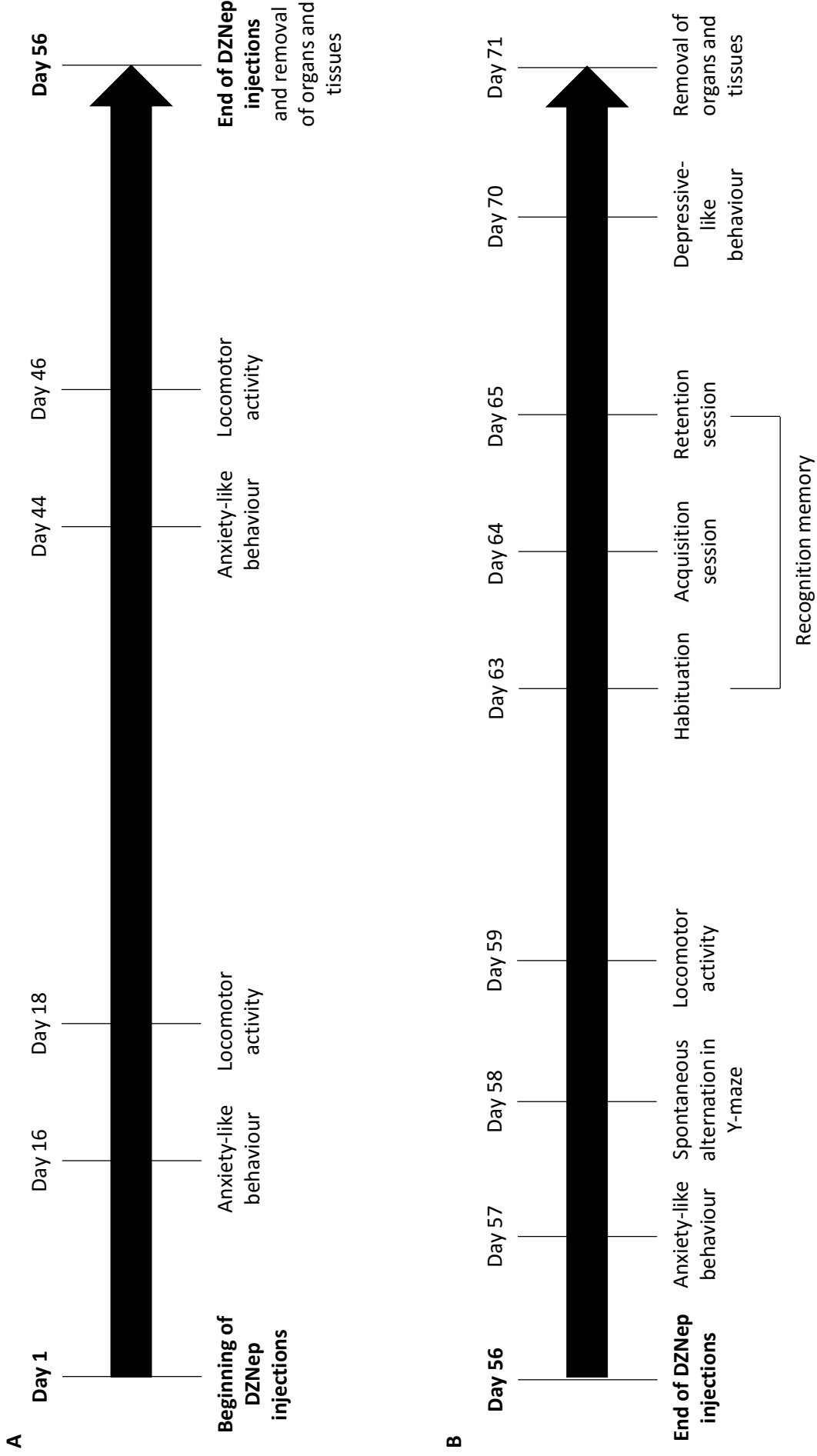


Figure 1

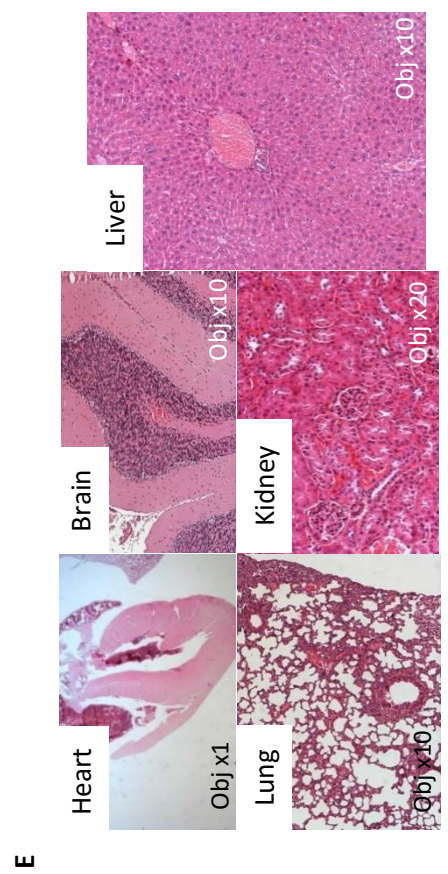
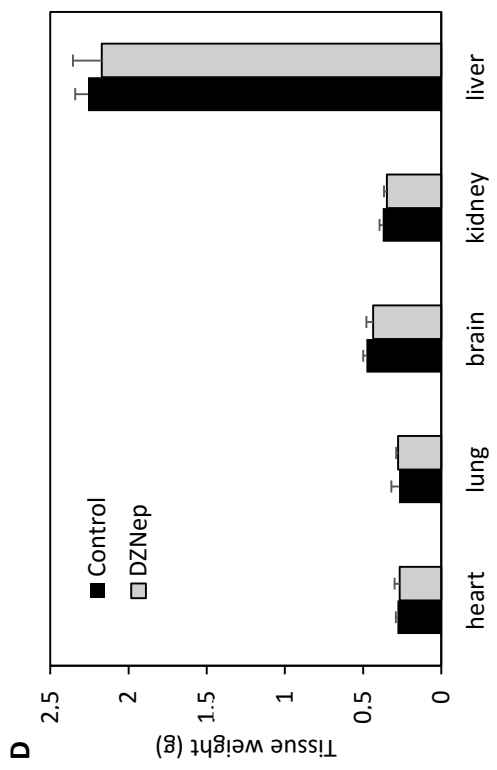
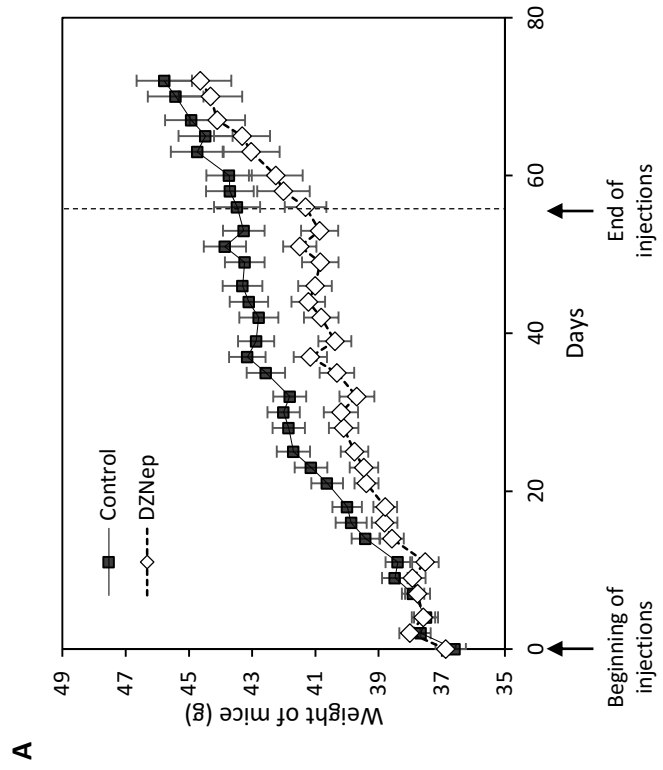
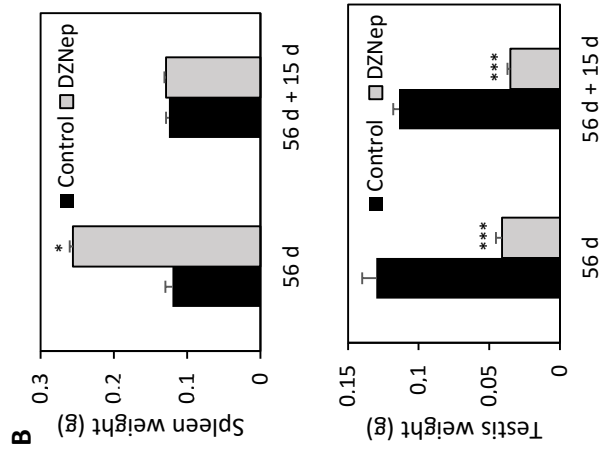
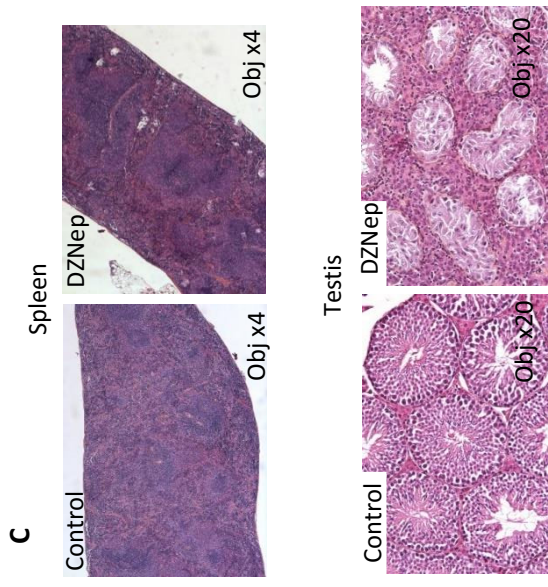


Figure 2

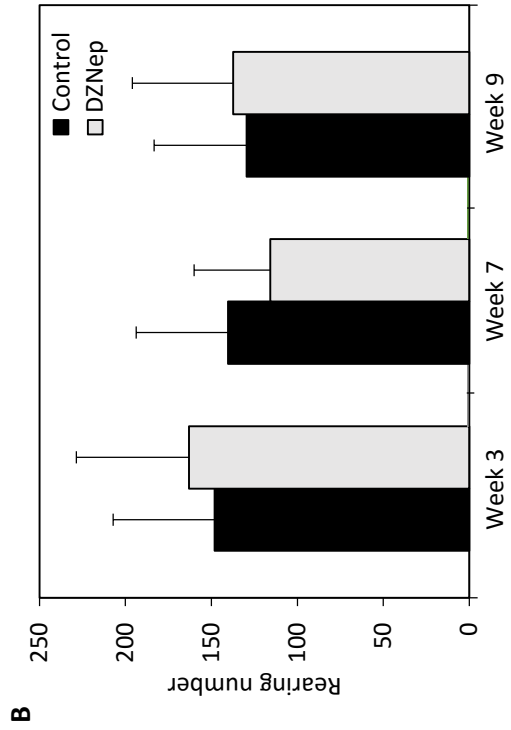
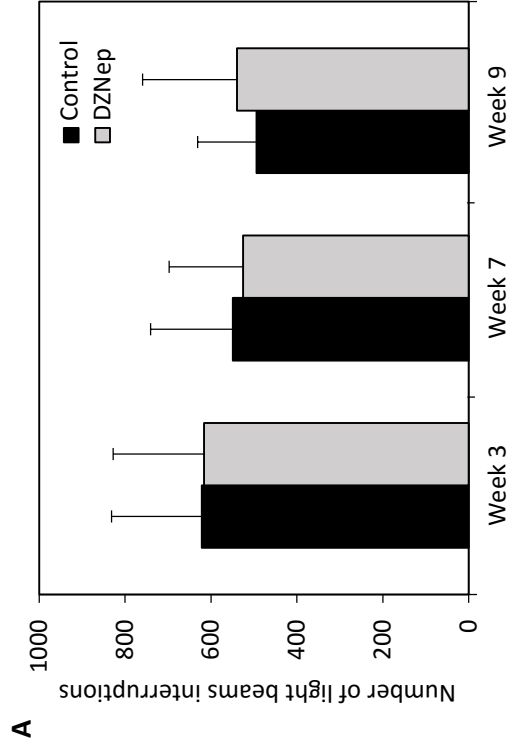


Figure 3

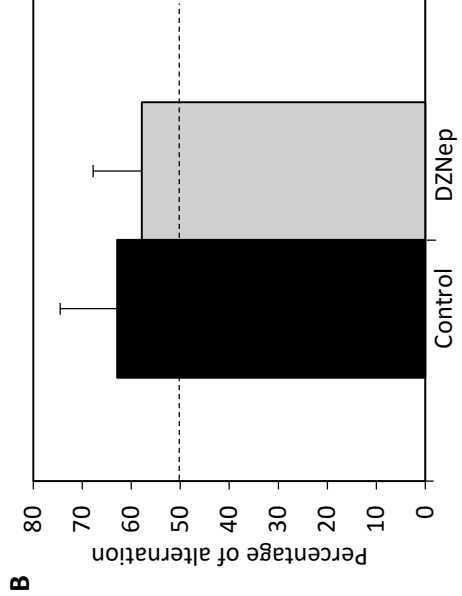
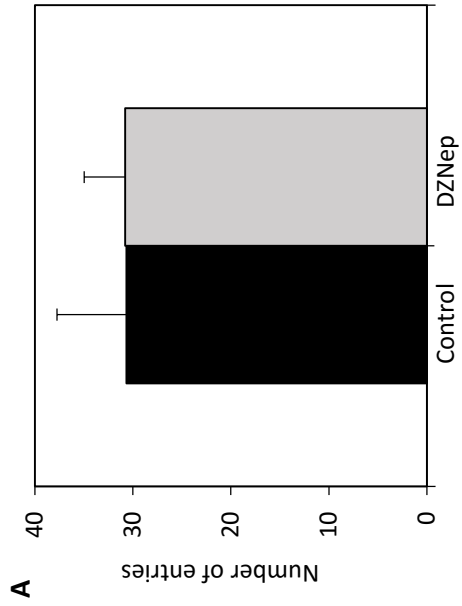


Figure 4

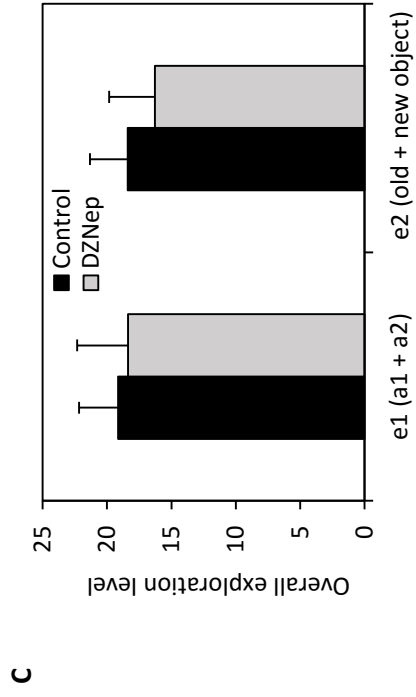
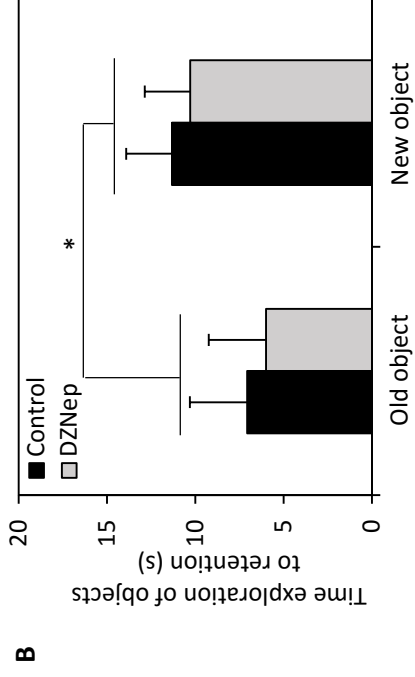
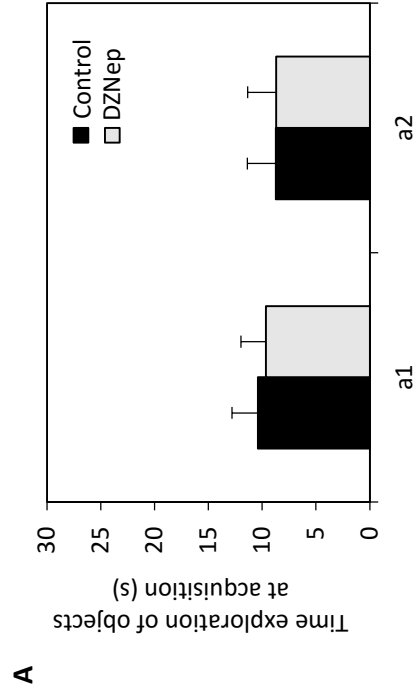


Figure 5

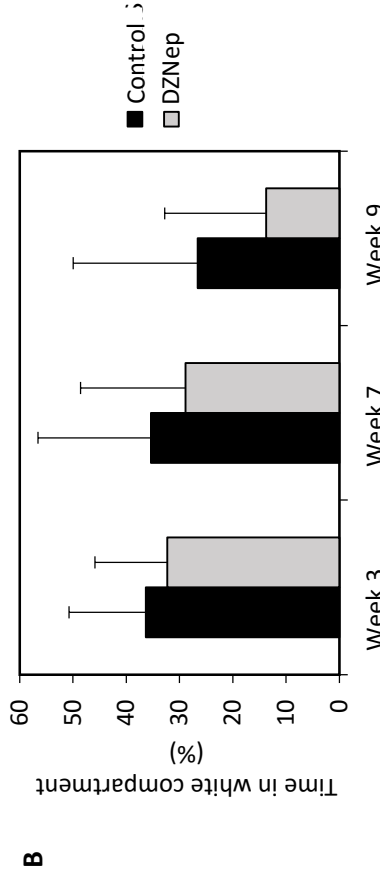
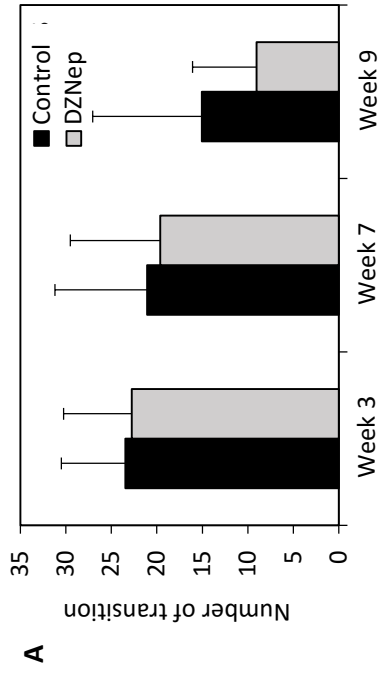


Figure 6

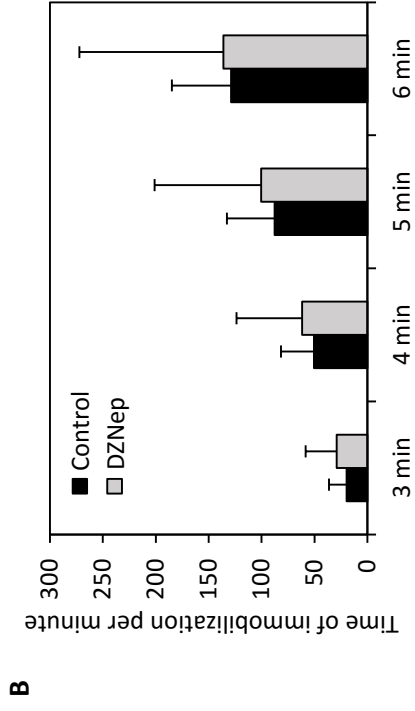
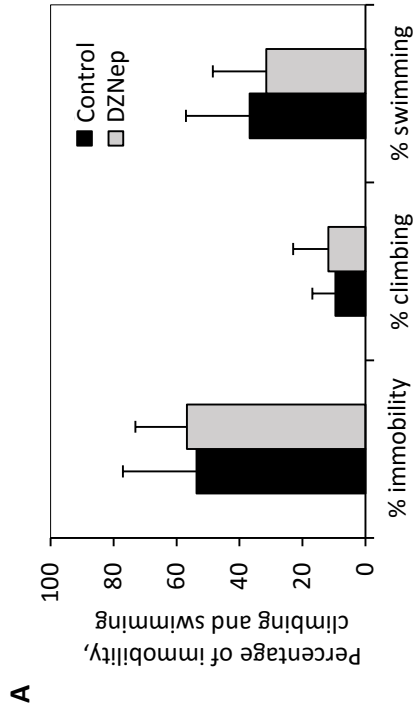


Figure 7

IV) Le DZNep synergise l'effet apoptotique du cisplatine dans les chondrosarcomes

Contexte :

Des études ont montré que l'utilisation combinée du DZNep avec d'autres agents anti-tumoraux (inhibiteurs cytotoxiques ou inhibiteurs de l'acétylation des histones ou de la méthylation de l'ADN) induit un effet significatif sur la diminution de la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (Nakagawa et al., 2014; Avan et al., 2012; Momparler et al., 2012; Fiskus et al., 2009).

Sachant que le DZNep semble avoir un effet sensibilisateur à la chimiothérapie (Unland et al., 2015; Nakagawa et al., 2014; Avan et al., 2012; Abbosh et al., 2006), le but de cette étude était de tester l'effet du DZNep en association avec le cisplatine in vitro dans des lignées cellulaires de chondrosarcome et in vivo dans un modèle de xénogreffe chez des souris immunodéprimées.

Résultats :

L'établissement de courbes de survie, après un pré-traitement au DZNep suivi d'un traitement combiné avec le cisplatine, dans deux lignées de chondrosarcome (une lignée moins sensible au cisplatine : SW1353 et une lignée plus sensible : JJ012) et dans des chondrocytes normaux a été effectué par comptage cellulaire et a montré une nette diminution de la survie cellulaire des deux lignées de chondrosarcome alors que cet effet est limité dans les chondrocytes normaux. Cependant, un co-traitement au DZNep et au cisplatine ou un pré-traitement au cisplatine suivi d'un co-traitement cisplatine/DZNep ne réduit pas la survie des chondrosarcomes comparé à un traitement seul au cisplatine.

Afin de déterminer si la diminution de la survie cellulaire est due à la mort cellulaire, nous avons évalué l'apoptose, par marquage d'Apo2.7 en cytométrie en flux. Ainsi, un pré-traitement au DZNep suivi d'un traitement combiné avec le cisplatine augmente l'apoptose de façon synergique dans les lignées SW1353 et JJ012. De façon intéressante, cette combinaison n'induit pas la mort cellulaire par apoptose dans les chondrocytes normaux.

Enfin, une étude pré-clinique a été menée afin de tester l'effet d'un pré-traitement au DZNep suivi d'un co-traitement avec le cisplatine dans un modèle de xénogreffe de la lignée JJ012 chez des souris nude et a montré que la combinaison du DZNep avec le cisplatine induit une

diminution de la croissance des tumeurs et est associée à la mort des cellules de chondrosarcome par apoptose. Cette dernière partie devra être confirmée sur un plus grand nombre d'animaux.

Conclusion :

Cette étude montre qu'un pré-traitement au DZNep suivi d'un traitement combiné avec le cisplatine est plus efficace qu'un traitement seul au DZNep ou au cisplatine. En effet, il diminue la survie des lignées de chondrosarcome et augmente de manière synergique leur mort par apoptose, in vitro et in vivo. De plus, cette approche ciblant les chondrosarcomes semble prometteuse car le traitement combiné du DZNep avec le cisplatine n'induit pas d'apoptose dans les chondrocytes normaux et permet de réduire la taille des tumeurs in vivo.

Article en preparation

**The S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-Deazaneplanocin A (DZNep) enhances
the response to platinum-based therapy in chondrosarcomas.**

Eva Lhuissier¹, Juliette Aury Landas¹, Martine Boittin¹, Karim Boumediene¹ and Catherine
Baugé^{1#}

¹ EA7451 BioConnect, Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France

Adress for correspondence:

Catherine Baugé

EA7451 BioConnect

Université de Caen Normandie

14032 CAEN

France

Phone: +33 (0)2 31 06 82 18

Fax: +33 (0)2 31 06 82 24

Abstract

We have previously shown that DZNep, an inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, induces apoptosis *in vitro* and *in vivo* in chondrosarcomas. The aim of the present study was to evaluate whether the combination of DZNep to a standard anticancer drug may enhance response to each drugs in chondrosarcomas.

In vitro, two chondrosarcoma cell lines (SW1353 and JJ012) were cultured in the presence of DZNep and/or cisplatin. Cell growth was evaluated by counting viable cells, and apoptosis was determined by Apo2.7 expression by flow cytometry. *In vivo*, antitumoral effect of DZNep and cisplatin combination was assessed through measurements of tumoral volume of JJ012 xenografts in *nude* mice.

We showed that, *in vitro*, the drug combination of DZNep and cisplatin induces a greater decrease of cell survival and a synergistic increase of apoptosis compared to drugs alone, in chondrosarcomas but not in normal cells (chondrocytes). This enhancement of antitumoral effect required a priming with DZNep incubation before the co-treatment with DZNep/cisplatin. Furthermore, *in vivo*, combined treatment of DZNep and cisplatin reduces tumor growth in chondrosarcoma xenograft mice model.

This study demonstrates potential for the use of epigenetic-chemotherapeutic combination approach for further studies in the treatment of chondrosarcomas.

Introduction

Chondrosarcoma is a rare bone tumor characterized by the secretion of a cartilage-like extracellular matrix. Its treatment poses major challenges, since it is resistant to chemotherapy and radiotherapy. Consequently, chondrosarcoma treatment has only few over the past 30 years, and consists in surgical resection of tumor (Leddy and Holmes, 2014; Giuffrida et al., 2009).

Recently, 3-Deazaneplanocin A (DZNep), a carbocyclic adenosine analog, has been shown to be able to induce apoptosis in chondrosarcomas *in vivo* and *in vitro* (Lhuissier et al., 2017; Girard et al., 2014). DZNep is an inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase resulting in cellular accumulation of S-adenosylhomocysteine, which in its turn, inhibits of S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferase, particularly EZH2 (Glazer et al., 1986). It induces apoptotic cell death in cancer cells but not in normal cells (Tan et al., 2007; Xie et al., 2011; Cheng et al., 2012). Its anti-tumoral activity has also been observed *in vivo* in various cancers including embryonal rhabdomyosarcoma (Ciarapica et al., 2014), tongue cancer (Li et al., 2013), prostate cancer (Crea et al., 2011), or renal cell carcinoma (Liu et al., 2016). In chondrosarcomas, DZNep induced apoptosis *in vitro* (Girard et al., 2014) and slows tumor growth *in vivo* (Lhuissier et al., 2017). However, in these studies, the tumors did not totally disappear even after 56 days of treatment, showing the need to improve DZNep efficiency.

Increasing evidence suggests that future cancer therapies will take advantage of synergistic effects achieved from different combinations of epigenetic reversal and conventional antitumor agents (Hung et al., 2013), leading to investigation by several groups of the potential of combination of DZNep with existing antitumoral agents. For instance, histone methylation reversal by DZNep pre-sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine (Hung et

al., 2013). Also, EZH2 knockdown sensitized pancreatic cancer cells to doxorubicin and gemcitabine, revealing the potential of an EZH2 inhibitor-chemotherapeutic combination therapy (Ougolkov et al., 2008).

Therefore, our study attempts to increase the efficiency of DZNep in chondrosarcomas by combination with employed chemotherapy agents, such as platinum compounds. We show by *in vitro* and *in vivo* experiments that the combination of DZNep with cisplatin reduces chondrosarcoma viability and induces apoptosis.

Materiel and methods

Drugs

DZNep-HCl was provided by Tocris (Lille, France) and dissolved in PBS. Cisplatin was provided by Sigma (St Quentin Fallavier, France) and dissolved in DMSO.

Cell culture

Human chondrosarcoma cell lines SW1353 and JJ012 were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), or kindly provided by Dr. Joel A. Block (Rush University medical center) (Scully et al., 2000), respectively. Chondrocytes were isolated and cultured as previously described from normal articular cartilage (Duval et al., 2011), after obtaining signed agreement from patients, according to local legislation. This study was approved by the local ethic committee (Comité de Protection des Personnes Nord Ouest III).

All cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and antibiotics, and incubated

at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cell cultures were regularly tested by PCR for mycoplasma contamination.

Animals

Animal experimental procedures were performed according to local legislation, and procedures were approved by ethics committee (Comité d’Ethique de Normandie en Matière d’Expérimentation Animale, agreement #03968.01). Mice were provided and kept in the animal facility (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Caen, France) under controlled temperature and light conditions (temperature 23± 2°C, 12h light-dark cycle). Animals had *ad libitum* access to food and water. Each animal was humanely handled throughout the experiment in accordance with internationally accepted ethical principles for laboratory animal use and care, and all efforts were made to minimize animal suffering. Euthanasia was performed using CO₂ inhalation.

Cell growth experiments

Cells were seeded at 15000 cells/cm². The day after, they were treated with drugs. At the end of incubation, viable cells were counted using Countess II (Life Technologies) after trypan blue exclusion. Each count was performed twice and independent experiments were done at least three times.

Apoptosis assay

Cells were immunostained with phycoerythrin (PE)-conjugated antibody directed against Apo2.7 (clone 2.7 7A6) according to the manufacturer's condition (Beckman Coulter, Villepinte, France). Cell fluorescence was measured using Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) on the technical platform of SFR 146 (Structure Federative de Recherche 146, Caen, France). A minimum of 10,000 events were analysed in each sample using Kaluza 1.5a software. Three independent experiments were performed.

Xenograft of chondrosarcomas in nude mice

Nude mice (6 weeks old, males) were xenografted subcutaneously with 10^6 JJ012 cells (suspended in 100 μ l of matrigel) on their back and separated in four groups (vehicle; DZNep alone; cisplatin alone; DZNep and cisplatin in combination). After 50 days, *i.e.* when the tumors became palpable, vehicle or DZNep was administered intraperitoneally three times per week at 2 mg/kg for 4 weeks. Then, cisplatin was intraperitoneally injected alone or in combination with DZNep three times per week at 2 mg/kg for 3 weeks. During all these experiments, tumors were measured two times per week by a caliper and tumoral volume calculated by the following equation $(L \times w^2) / 2$ (with L corresponding to length and w to width). J0 correspond to the day of the beginning of DZNep treatment. All volumes calculated during the assay were normalized to their respective J0 volume. At the end of the experiments, tumors were resected, weighted, measured, and photographed.

Protein extraction and Western blot

Tumors were crushed with potter in RIPA lysis buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.5 ; IGEPAL 1% ; NaCl 150 mM ; EGTA 1 mM ; NaF 1 mM) supplemented with phosphatase (Na_3VO_4 10 μ L/mL)

and protease inhibitors (leupeptin 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, aprotinin 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, pepstatin 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and phenylmethylsulfonyl fluoride 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$), to lyse cells and extract protein. Proteins extracts were resolved by SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad). After probing with primary antibodies, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, and signals visualized by Western Lightning[®] Plus-ECL (Perkin Elmer). Antibodies specific for PARP (#5246) was obtained from Cell signalling and GAPDH (FL-335 – sc25778) was provided by Santa Cruz.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. For *in vitro* experiments, at least three different experiments were performed for each condition. Statistical significances were calculated with Student's-t-test. P-values ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

Results

DZNep pretreatment enhances chondrosarcoma sensibility to cisplatin in chondrosarcomas.

First, we compared the response of chondrosarcomas to cisplatin and DZNep alone or in combination (Figure 1A). We used one cell line less sensitive to cisplatin (SW1353) and on cell line more sensitive (JJ012). We showed that DZNep (0.3 μM - 5 days) and cisplatin (5 μM - 3 days) significantly reduced viability of chondrosarcomas. Interestingly, this reduction of cell survival was significantly greater when chondrosarcomas were treated by the combination DZNep/cisplatin (pretreatment DZNep 0.3 μM for 2 days, and then treatment with DZNep 0.3 μM + cisplatin 5 μM for 3 days), compared to treatments with each drug alone (figure 1B).

We further analyzed the effect of drugs alone or in combination on apoptosis. Both treatments with DZNep (0.3 μ M) for five days or cisplatin (5 μ M) for three days moderately induced apoptosis. In contrast, two days of pretreatment with DZNep followed by treatment for 3 days with both drugs, significantly increase apoptosis (figure 1C). This effect was synergistic for both cell lines.

Cotreatment DZNep/cisplatin is not sufficient to reduce survival compared to cisplatin treatment.

Next, we evaluated whether direct DZNep/cisplatin co-treatment (without DZNep priming) (figure 2A), or whether cisplatin priming followed of DZNep/cisplatin co-incubation (figure 2C) is able to reduce chondrosarcoma survival. None of both combinations was able to induce a reduction of SW1353 cell survival compared to cisplatin alone (figures 2B-2D), suggesting that DZNep pretreatment is required to enhance cytotoxic effect of cisplatin.

DZNep pretreatment does not enhance chondrocyte sensibility to cisplatin.

Furthermore, we investigated whether treatments with DZNep and cisplatin alone, or in combination are toxic in normal cartilage cells, *e.g.* chondrocytes (Figure 3A). Even if the combination of DZNep and cisplatin reduced chondrocyte cell number (-40%) after 5 days compared to untreated cells (Figure 3B), it did not induce apoptosis in these cells (Table 1), suggesting that it reduced only cell proliferation without leading to cell death in chondrocytes.

Peritoneal injection of DZNep and cisplatin reduced tumor growth in xenograft mice

To extend this analysis, we treated nude mice bearing xenografted JJ012 tumors (with the best capacity for implantation) with DZNep followed by a treatment with combination DZNep and

cisplatin (Figure 4A). As shown in figure 4, DZNep treatment followed DZNep and cisplatin co-treatment significantly inhibited tumor growth compared with vehicle treated mice, or drugs alone (Figure 4B). In addition, no adverse body weight loss was observed (figure 4C), suggesting that at this dose, co-treatment is relatively non-toxic.

Moreover, apoptosis in untreated or treated tumors was also analyzed. The data revealed that the combination of cisplatin with DZNep increased apoptosis as evidenced by the PARP cleavage (figure 4D).

Discussion

Chondrosarcoma treatment stills an important issue for clinicians. Indeed, this bone tumor is resistant to conventional radio- and chemotherapy, and its resection is the usual treatment. In this context, there is an important need to identify novel drugs able to treat chondrosarcoma. The present study demonstrates that the combination of 3-deazaneplanocin (DZNep) and cisplatin exhibited strong pro-apoptotic effects on chondrosarcomas *in vitro* and *in vivo*, superior to the effects of drugs alone.

We previously showed that DZNep, an inhibitor of SAH known to reduce EZH2 expression and activity, induces apoptosis *in vitro* and *in vivo* in chondrosarcomas (Lhuissier et al., 2017; Girard et al., 2014). In the present study, we show that co-incubation with DZNep and cisplatin after DZNep priming enhances apoptosis compared to treatment with drugs alone. This is in agreement with literature. Indeed, in other cancer cells, such as cholangiocarcinoma, pancreatic cancer or rhabdoid tumor cells, the combination of DZNep with standard anticancer agents (gemcitabine, etoposide or doxorubicin) induces synergistic inhibition of cell proliferation and significantly increased apoptosis compared to drugs alone (Unland et al.,

2015; Nakagawa et al., 2014; Avan et al., 2012). Our findings are also supported by another study showing that loss of EZH2-mediated methylation of H3K27 re-sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin (Abbosh et al., 2006).

Furthermore, and interestingly, DZNep/cisplatin co-incubation did not induce apoptosis in normal chondrocytes. Similarly, DZNep/gemcitabine co-incubation does not enhance drug toxicity in normal pancreatic cells (Hung et al., 2013). Also, we observed no change in weight treated with cisplatin, DZNep or both drugs suggesting that, at the doses used in this study, these drugs do not have major toxic effects *in vivo*.

Intriguingly, this enhancement of cytotoxic effect by combination DZNep/cisplatin was only observed when cells were primed with DZNep, but not for a direct co-treatment. This temporal difference was also observed by Hung and collaborators which showed that DZNep priming has superior cytotoxicity and synergy with gemcitabine than co-exposure of both drugs in pancreatic cancer cells (Hung et al., 2013). Since DZNep is known to inhibit EZH2 expression and H3K27 methylation, a mark of heterochromatin, it is possible that loss of chromatin compaction could allow increased DNA damage by conventional cytotoxic drugs leading to a decreased survival in EZH2 depleted cancer cells. Further analyses are required to confirm this hypothesis.

In conclusion, we have developed procedures to enhance the apoptosis induced by cisplatin and DZNep in human chondrosarcomas. While cisplatin alone only produces modest effects in this bone cancer, DZNep priming followed by DZNep/cisplatin co-treatment synergizes the effect to enhance overall efficacy in chondrosarcoma cells while preserving normal chondrocytes. These results demonstrate the potential use of this epigenetic-chemotherapeutic combination approach for further studies and management of chondrosarcoma treatment.

Acknowledgments

We thank Joel BLOCK (Rush University Medical Center, Chicago, USA) for gracious chondrosarcoma gifts. We also thank Benoit HAELEWYN (CYCERON, Unicaen, France), Charlotte MARIE (CURB, Unicaen, France), Valentine BOUET and Thomas FRERET (COMETE, Unicaen, France) for technical assistance and advice for animal experiments. We thank Marion BERTHELOT (BioConnect, Unicaen, Caen, France) for technical assistance. This study was funded by Region Basse-Normandie.

References

- Abbosh, P.H., Montgomery, J.S., Starkey, J.A., Novotny, M., Zuhowski, E.G., Egorin, M.J., Moseman, A.P., Golas, A., Brannon, K.M., Balch, C., et al. (2006). Dominant-Negative Histone H3 Lysine 27 Mutant Derepresses Silenced Tumor Suppressor Genes and Reverses the Drug-Resistant Phenotype in Cancer Cells. *Cancer Res.* *66*, 5582–5591.
- Avan, A., Crea, F., Paolicchi, E., Funel, N., Galvani, E., Marquez, V.E., Honeywell, R.J., Danesi, R., Peters, G.J., and Giovannetti, E. (2012). Molecular mechanisms involved in the synergistic interaction of the EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A with gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 1735–1746.
- Cheng, L.L., Itahana, Y., Lei, Z.D., Chia, N.-Y., Wu, Y., Yu, Y., Zhang, S.L., Thike, A.A., Pandey, A., Rozen, S., et al. (2012). TP53 Genomic Status Regulates Sensitivity of Gastric Cancer Cells to the Histone Methylation Inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep). *Clin. Cancer Res.* *18*, 4201–4212.
- Ciarapica, R., Carcarino, E., Adesso, L., De Salvo, M., Bracaglia, G., Leoncini, P.P., Dall’agnese, A., Verginelli, F., Milano, G.M., Boldrini, R., et al. (2014). Pharmacological inhibition of EZH2 as a promising differentiation therapy in embryonal RMS. *BMC Cancer* *14*, 139.
- Crea, F., Hurt, E.M., Mathews, L.A., Cabarcas, S.M., Sun, L., Marquez, V.E., Danesi, R., and Farrar, W.L. (2011). Pharmacologic disruption of Polycomb Repressive Complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer. *Mol. Cancer* *10*, 40.
- Duval, E., Bigot, N., Hervieu, M., Kou, I., Leclercq, S., Galéra, P., Boumediene, K., and Baugé, C. (2011). Asporin Expression Is Highly Regulated in Human Chondrocytes. *Mol. Med.* *17*, 816–823.
- Girard, N., Bazille, C., Lhuissier, E., Benateau, H., Llombart-Bosch, A., Boumediene, K., and Bauge, C. (2014). 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase

EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells. *PLoS One* 9, e98176.

Giuffrida, A.Y., Burgueno, J.E., Koniaris, L.G., Gutierrez, J.C., Duncan, R., and Scully, S.P. (2009). Chondrosarcoma in the United States (1973 to 2003): an analysis of 2890 cases from the SEER database. *J. Bone Joint Surg. Am.* 91, 1063–1072.

Glazer, R.I., Knode, M.C., Tseng, C.K., Haines, D.R., and Marquez, V.E. (1986). 3-Deazaneplanocin A: a new inhibitor of S-adenosylhomocysteine synthesis and its effects in human colon carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 35, 4523–4527.

Hung, S.W., Mody, H., Marrache, S., Bhutia, Y.D., Davis, F., Cho, J.H., Zastre, J., Dhar, S., Chu, C.K., and Govindarajan, R. (2013). Pharmacological Reversal of Histone Methylation Presensitizes Pancreatic Cancer Cells to Nucleoside Drugs: In Vitro Optimization and Novel Nanoparticle Delivery Studies. *PLoS ONE* 8.

Jagasia, A.A., Block, J.A., Diaz, M.O., Nobori, T., Gitelis, S., Inerot, S.E., and Iyer, A.P. (1996). Partial deletions of the CDKN2 and MTS2 putative tumor suppressor genes in a myxoid chondrosarcoma. *Cancer Lett.* 105, 77–90.

Leddy, L.R., and Holmes, R.E. (2014). Chondrosarcoma of bone. *Cancer Treat. Res.* 162, 117–130.

Lhuissier, E., Bazille, C., Aury-Landas, J., Girard, N., Pontin, J., Boittin, M., Boumediene, K., and Baugé, C. (2017). Identification of an easy to use 3D culture model to investigate invasion and anticancer drug response in chondrosarcomas. *BMC Cancer* 17, 490.

Li, Z., Wang, Y., Qiu, J., Li, Q., Yuan, C., Zhang, W., Wang, D., Ye, J., Jiang, H., Yang, J., et al. (2013). The polycomb group protein EZH2 is a novel therapeutic target in tongue cancer. *Oncotarget* 4, 2532–2549.

Liu, L., Xu, Z., Zhong, L., Wang, H., Jiang, S., Long, Q., Xu, J., and Guo, J. (2016). Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes tumour cell migration and invasion via epigenetic repression of E-cadherin in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 117, 351–362.

Nakagawa, S., Sakamoto, Y., Okabe, H., Hayashi, H., Hashimoto, D., Yokoyama, N., Tokunaga, R., Sakamoto, K., Kuroki, H., Mima, K., et al. (2014). Epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A inhibits the growth of cholangiocarcinoma cells. *Oncol. Rep.* 31, 983–988.

Ougolkov, A.V., Bilim, V.N., and Billadeau, D.D. (2008). Regulation of Pancreatic Tumor Cell Proliferation and Chemoresistance by the Histone Methyltransferase EZH2. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 6790–6796.

Scully, S.P., Berend, K.R., Toth, A., Qi, W.N., Qi, Z., and Block, J.A. (2000). Marshall Urist Award. Interstitial collagenase gene expression correlates with in vitro invasion in human chondrosarcoma. *Clin. Orthop.* 291–303.

Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P.L., Karuturi, R.K.M., Tan, P.B.O., Liu, E.T., and Yu, Q. (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* 21, 1050–1063.

Unland, R., Borchardt, C., Clemens, D., Kool, M., Dirksen, U., and Frühwald, M.C. (2015). Analysis of the antiproliferative effects of 3-deazaneoplanocin A in combination with standard anticancer agents in rhabdoid tumor cell lines. *Anticancer. Drugs* 26, 301–311.

Xie, Z., Bi, C., Cheong, L.L., Liu, S.C., Huang, G., Zhou, J., Yu, Q., Chen, C.-S., and Chng, W.J. (2011). Determinants of Sensitivity to DZNep Induced Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE* 6.

Figures

Figure 1: DZNep priming increased the effect of cisplatin on cell survival and on apoptosis

SW1353 or JJ012 chondrosarcomas were primed with DZNep (0.3 μ M) for 48h and then treated with DZNep (0.3 μ M) and/or with cisplatin (5 μ M) for 3 days. A- Experimental design. B- Viable adherent cells were counted, at the end. Graphs represent cell survival normalized to untreated cells. Data are expressed as means \pm SEM (n=3). C- Apoptosis was assayed by staining cells with Apo 2.7 antibody coupled to phycoerythrin. Histograms represents percentage of apoptotic cells. Data are expressed as means \pm SEM (n=3).

Figure 2: Direct co-treatment DZNep/cisplatin or cisplatin priming did not affect cell survival

SW1353 chondrosarcoma was treated with DZNep (0.3 μ M) and cisplatin (5 μ M) for 3 days. A- Experimental design. B- Viable adherent cells were counted, at the end. Graphs represent cell survival normalized to untreated cells. Data are expressed as means of two counts per well (n=1).

SW1353 chondrosarcoma was primed with cisplatin (5 μ M) for 24h and then treated with DZNep (0.3 μ M) and/or with cisplatin (5 μ M) for 2 days. A- Experimental design. B- Viable

adherent cells were counted, at the end. Graphs represent cell survival normalized to untreated cells. Data are expressed as means of two counts per well (n=1).

Figure 3: Combination of DZNep and cisplatin reduced survival of chondrocyte

Human articular chondrocytes (HAC) were primed with DZNep (0.3 μ M) for 48h and then treated with DZNep (0.3 μ M) and/or with cisplatin (5 μ M) for 3 days. A- Experimental design. B- Viable adherent cells were counted, at the end. Graphs represent cell survival normalized to untreated cells. Data are expressed as means \pm SEM (n=2).

Figure 4: Peritoneal injections of DZNep and cisplatin reduced tumoral growth of chondrosarcoma in xenograft *nude* mice

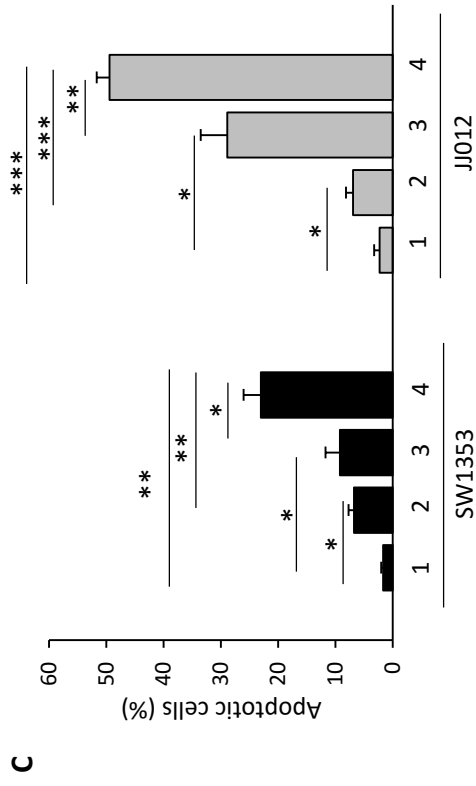
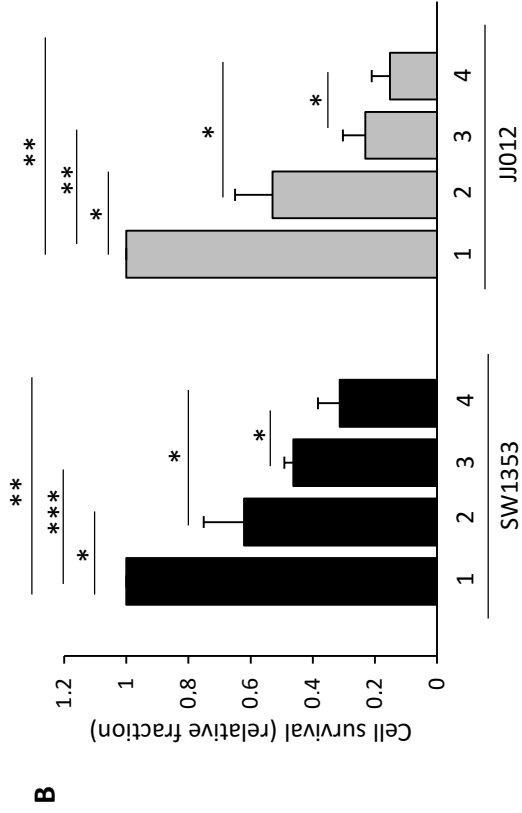
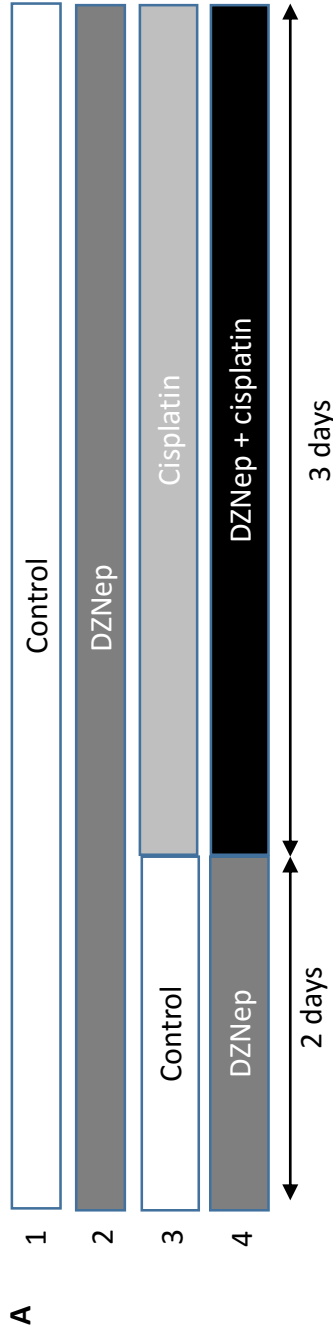
JJ012 chondrosarcoma cell line was subcutaneously injected in the back of *nude* mice. When tumors were implanted, DZNep (2mg/kg) was intraperitoneally injected three times per week. After 4 weeks, mice was intraperitoneally injected with DZNep and/or cisplatin (2mg/kg) three times per week for 3 supplemental weeks. A- Experimental design. B- Tumors were measured regularly by a caliper and tumoral volume was calculated (black arrow represents the beginning of cisplatin injections). C- Mice were weighted regularly during experiment (black arrow represents the beginning of cisplatin injections). D- At the end of experiment, proteins were extracted from tumors and PARP cleavage was analyzed by western blot.

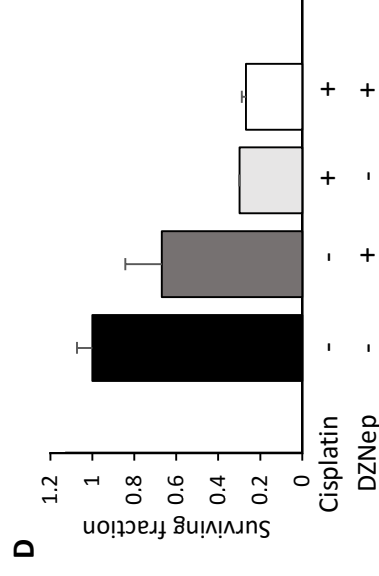
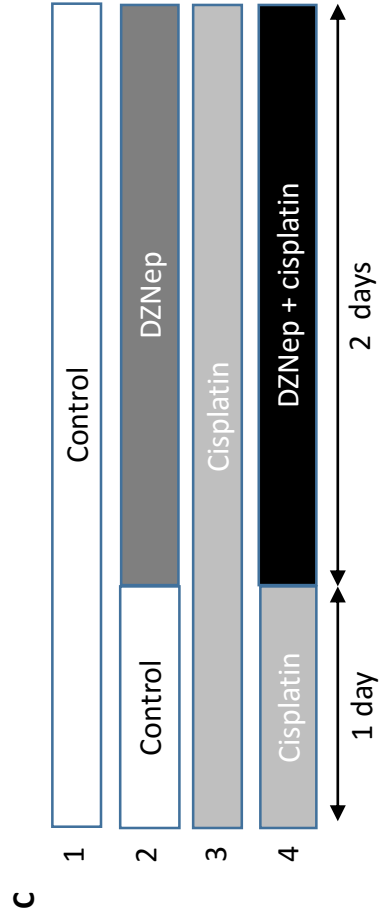
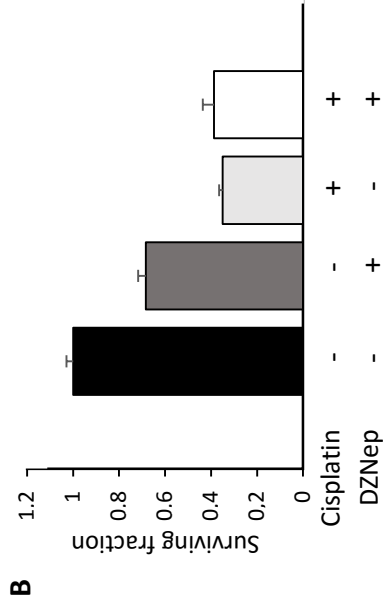
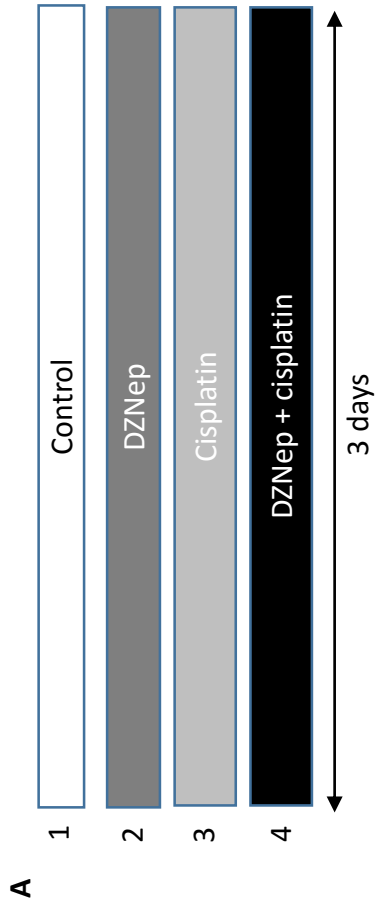
Table

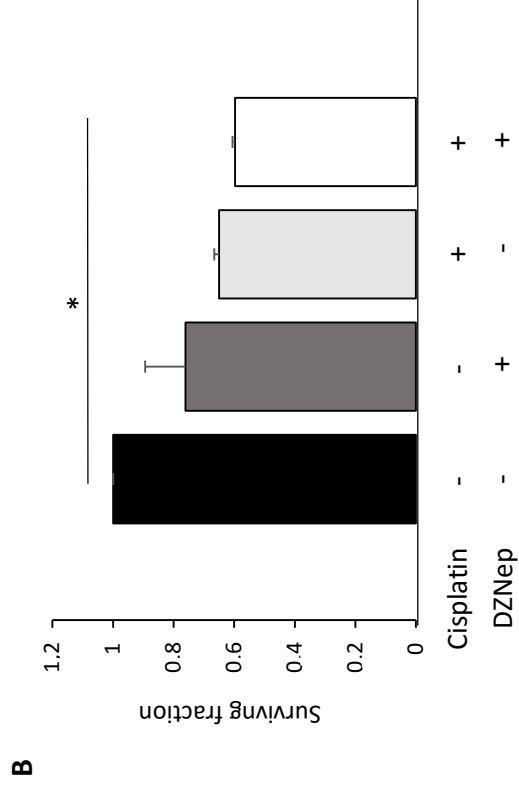
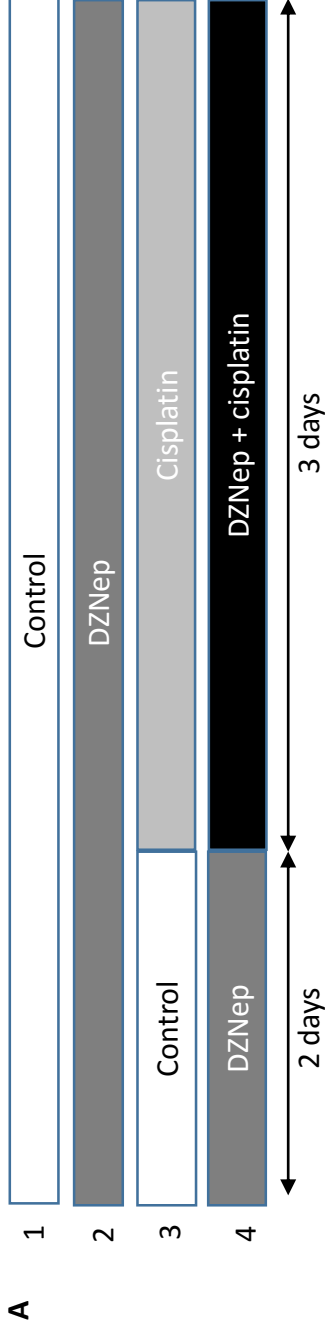
Table 1: DZNep pretreatment did not induce chondrocyte apoptosis to cisplatin

Chondrocytes were primed with DZNep (0.3 μ M) for 48h and then treated with DZNep (0.3 μ M) and/or with cisplatin (5 μ M) for 3 days. Cells were stained with Apo 2.7 antibody coupled to phycoerythrin. Values represent means \pm SEM (n=2).

	Apoptotic cell fraction	
	Control	Cisplatin
Control	1.6 \pm 1.2%	1.2 \pm 0.85%
DZNep	1.25 \pm 0.85%	1.75 \pm 1.35%







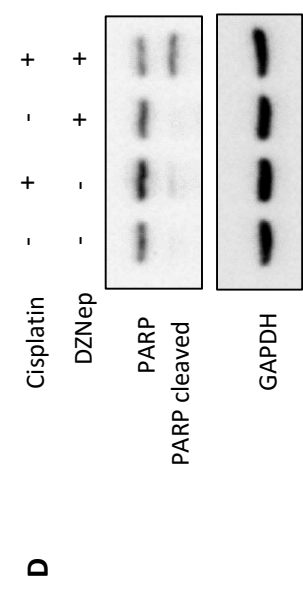
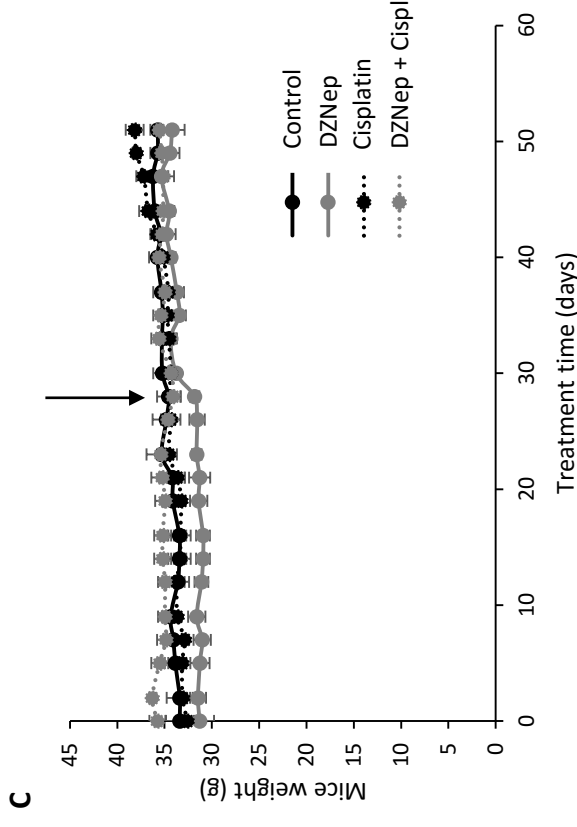
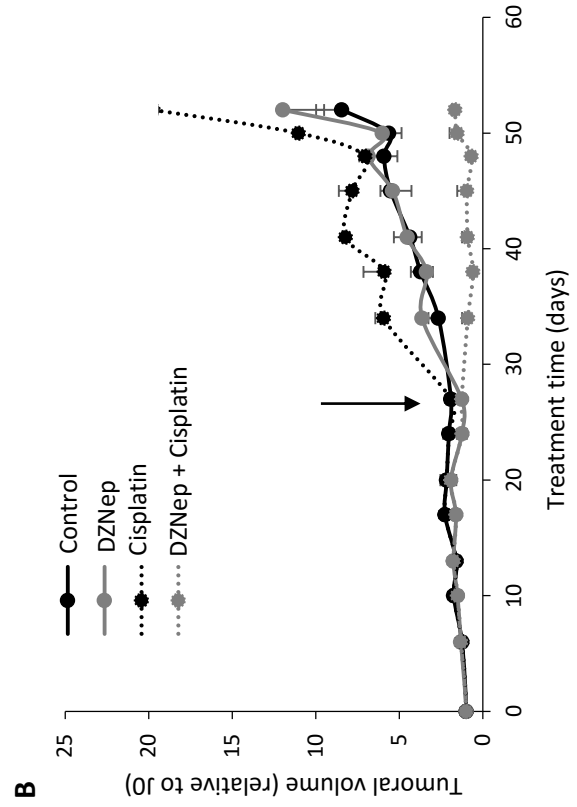
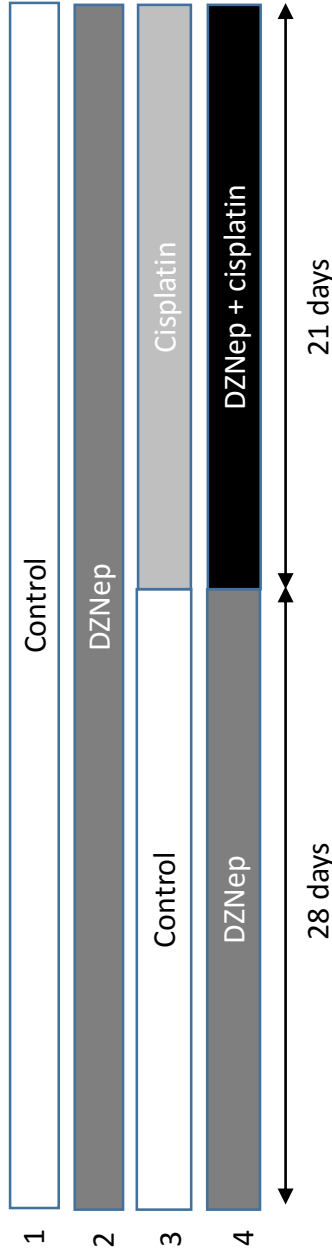


Figure 4

V) Ciblage des histone déméthylases UTX et JMJD3 dans le traitement des chondrosarcomes

Contexte :

Récemment, le GSK-J4 a été identifié comme un agent anti-tumoral efficace contre certains gliomes pédiatriques du tronc cérébral (Hashizume et al., 2014), des leucémies lymphoblastiques aiguës à cellules T (Ntziachristos et al., 2014) et des lymphomes diffus à grandes cellules B (Mathur et al., 2017). C'est un inhibiteur pharmacologique des histone déméthylases JMJD3 et UTX, responsables de la déméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27) (Figure 22 de l'introduction). Le GSK-J4 se lie au site actif de JMJD3 et UTX sans compromettre leur conformation et empêchant ainsi leur interaction avec α -cétoglutarate.

Le but de cette étude est de tester l'effet du GSK-J4 in vitro sur les lignées cellulaires de chondrosarcome seul ou en association avec le cisplatine.

Résultats :

L'établissement de courbes de survie par comptage cellulaire ainsi que l'étude de la prolifération cellulaire par marquage au CFSE, ont montré que le GSK-J4 réduit la croissance cellulaire des trois lignées de chondrosarcome (JJ012, CH2879 et SW1353) en diminuant leur prolifération. De plus, l'analyse du cycle cellulaire après traitement au GSK-J4, par cytométrie en flux, a permis de mettre en évidence un blocage du cycle cellulaire en phase S uniquement dans les lignées CH2879 et JJ012.

Afin de déterminer la cause de la diminution de la survie cellulaire, j'ai évalué l'apoptose par marquage d'Apo2.7, et la sénescence, par coloration de la SA- β -gal. Ainsi, j'ai mis en évidence que le GSK-J4 augmente l'apoptose dans les lignées cellulaires CH2879 et JJ012 et une faible sénescence caractérisée par un marquage de la SA- β -gal de quelques cellules seulement.

Je me suis également intéressée à l'effet cytotoxique du GSK-J4 en association avec le cisplatine dans les lignées de chondrosarcome et dans des cultures primaires de chondrocytes normaux. Ainsi, la combinaison du GSK-J4 avec le cisplatine diminue la prolifération des chondrosarcomes plus efficacement que chacun séparément. Cependant, l'analyse de l'apoptose n'a pas montré de différence entre le co-traitement GSK-J4/cisplatine et le cisplatine seul dans les trois lignées de chondrosarcome. Enfin, et de manière intéressante, le GSK-J4

n'induit pas d'apoptose dans les chondrocytes normaux et l'association avec le cisplatine n'a pas d'effet sur la survie cellulaire.

Conclusion :

Cette étude montre que le GSK-J4 induit une diminution de la prolifération des lignées de chondrosarcome sans pour autant induire la mort cellulaire dans toutes les lignées. De plus, la combinaison du GSK-J4 avec le cisplatine, pour augmenter les effets cytotoxiques du traitement, permet de diminuer la prolifération mais ne permet pas d'induire plus d'apoptose dans les lignées de chondrosarcome.

Article en cours de soumission

**Impact of H3K27 demethylase inhibitor GSKJ4 on chondrosarcoma cells in combination
with cisplatin.**

Eva Lhuissier¹, Lyess Allas¹, Juliette Aury-Landas¹, Karim Boumediene¹, Catherine Baugé^{1#}

¹ EA7451 BioConnect, Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France

Address for correspondence:

Catherine Baugé

EA7451 BioConnect

Université de Caen Normandie

14032 CAEN

France

Phone: +33 (0)2 31 06 82 18

Fax: +33 (0)2 31 06 82 24

Abstract

Chondrosarcoma (CS) is the second most common malignant bone sarcoma with increased risk of invasion and metastasis. Treatment of this tumor stills an issue, since it is radio- and chemoresistant. In the present study, we investigated antitumoral potential of GSK-J4, a small inhibitory molecule of JMJD3 and UTX (KDM6A and KDM6B) demethylases, alone or in combination with cisplatin in chondrosarcomas.

Human chondrosarcoma-derived cell lines were treated with GSK-J4 in the presence or not of cisplatin. Survival curves were established by numeration of viable cells. Cell proliferation and cycle were evaluated by CFSE labelling, and propidium iodide staining by flow cytometry. Apoptosis and senescence were determined by Apo2.7 expression or by SA- β -gal staining, respectively.

GSK-J4 decreased proliferation of chondrosarcomas cells, but induced apoptosis only in CH2879 and JJ012 cells, but not in SW1353 chondrosarcomas. In addition, its association with cisplatin decreases cell proliferation more than drugs alone, whereas this does not increase apoptosis compared to cisplatin alone. Interestingly, GSK-J4 alone or in association with cisplatin does not affect chondrocytes.

To conclude, our study suggests that demethylase inhibitors can be useful in improving therapy for chondrosarcomas.

Introduction

Chondrosarcoma (CS) is a rare bone tumor characterized by the production of a cartilage-like matrix, occurring most often in pelvis and long bones, and affects mainly adults. The treatment has very little changed over the past 30 years because this tumor is resistant to chemotherapy and radiotherapy (Rosenberg et al., 1999). It consists of surgical tumor resection (Kubo et al., 2008) and new therapies are therefore urgently required for this disease.

Recently KDM6 family members (KDM6A and KDM6B) have been identified as playing important roles in tumoral processes, and their inhibition has been reported to reduce tumoral cell proliferation (Hashizume et al., 2014; Ntziachristos et al., 2014). Thereby, these genes could potentially represent novel candidate targets for intervention in chondrosarcomas.

KDM6A, also called Ubiquitously transcribed tetratricopeptide Repeat X-linked Protein (UTX) is an ubiquitously expressed protein that controls basal levels of H3K27me3 (Kooistra and Helin, 2012; Hübner and Spector, 2010) and induction of ectoderm and mesoderm differentiation (Torres et al., 2013; Wang et al., 2012) and is essential for reprogramming (Mansour et al., 2012). It acts as a tumor suppressor in several solid tumors (Thieme et al., 2013; Mar et al., 2012; Jankowska et al., 2011; Wang et al., 2010; van Haaften et al., 2009).

KDM6B, also called Jumonji D3 (JMJD3) is induced upon inflammation (Santa et al., 2007), viral and oncogenic stimuli (Agger et al., 2009; Barradas et al., 2009) controls neuronal and epidermal differentiation (Sen et al., 2008; Jepsen et al., 2007) and inhibits reprogramming (Zhao et al., 2013).

Interestingly, the treatment of cells with GSKJ4 (Kruidenier et al., 2012), a pharmacologic inhibitor of histone H3K27 demethylation, reduces cell viability and increases apoptosis in pediatric brainstem glioma (Hashizume et al., 2014), acute lymphoblastic leukemia

(Ntziachristos et al., 2014), and B-cell lymphoma (Mathur et al., 2017). It is a small-molecule catalytic site inhibitor that is selective for the H3K27me3-specific JMJ subfamily, which acts by mimicking α -ketoglutarate binding at active site of JMJD3 and UTX (Kruidenier et al., 2012).

In the present study, we showed that GSK-J4 reduces proliferation in CH2879, JJ012 and SW1353 cells. It also induces apoptosis in CH2879 and JJ012, whereas no death was observed in SW1353 cells, suggesting a mechanism of resistance in some tumoral cells.

Material and methods

Drugs

GSK-J4 and cisplatin were provided by CliniSciences (MedChemExpress Europe, Sweden) and by Sigma (St Quentin Fallavier, France), respectively, and dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO).

Cell culture

Human chondrosarcoma cell line SW1353 was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The human JJ012 cell line were kindly provided by Dr. Joel A. Block (Rush University medical center) (Scully et al., 2000). They were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and antibiotics. The cell line CH2879 was kindly provided by Pr. A. Llombart-Bosch (University of Valencia, Spain), cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640's medium (Lonza AG, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FBS (Invitrogen) and antibiotics (Gil-Benso et al., 2003). Chondrocytes were obtained and cultured as previously described (Duval et al., 2011). They were cultured in DMEM, supplemented with

10% FBS and antibiotics. All cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cell cultures were regularly tested for mycoplasma contamination.

Protein extraction and immunoblotting

Cells were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) to remove residual FBS and scrapped into RIPA lysis buffer (Tris-HCl 50mM pH 7,5 ; IGEPAL 1% ; NaCl 150mM ; EGTA 1mM ; NaF 1mM) supplemented with phosphatase (NA₃VO₄ 10μL/mL) and protease inhibitors (leupeptin 1μL/mL, aprotinin 1μL/mL, pepstatin 1μL/mL and phenylmethylsulfonyl fluoride 4μL/mL). Proteins extracts were resolved by SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad). After probing with primary antibodies, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, and signals visualized by Western Lightning® Plus-ECL (Perkin Elmer). Antibodies specific for total H3 (#4499), H3K27me3 (#9733), UTX (#33510) and JMJD3 (#3457) were obtained from Cell Signaling.

Cell viability assay

Cells were seeded in 6-well plates, at 10,000 cells per well, and cultured in the presence of GSK-J4 and/or cisplatin. Relative numbers of viable cells were determined by cell count after excluding trypan blue staining. IC₅₀ values (dose needed to reduce the number of cells by 50%) were estimated from graphs. Each count was performed twice, and independent experiments were done three times.

Cell proliferation assay

Cell proliferation was assessed through dividing cell tracking (DCT) technique utilizing CFSE staining. CFSE is a dye which permanently binds to intracellular proteins, the reduction of its fluorescence in filial generations allows tracking of cell divisions. Cell proliferation was determined in treated and control cells stained with CFSE (65-0850-84, affymetrix eBioscience), as described by the manufacturer, and analysed by cytometer. Results were analysed with Kaluza 1.5a software.

Cell cycle analysis

Cells were washed with PBS, treated with trypsin-EDTA (Lonza AG, Verviers, Belgium) and fixed with 70% ethanol at -20°C and conserved at 4°C. For analysis, cells were washed twice with PBS and resuspended in 10 µg/mL RNase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 50 µg/µL propidium iodide (IP) (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) to label DNA. Fluorescence (DNA content) was measuring using Gallios (Beckman Coulter, Villepinte, France) on the technical platform of SFR 146 (Structure Federative de Recherche 146, Caen, France). A minimum of 10,000 events were analyzed using Kaluza 1.5a software.

Apoptosis assay

Treated and control cells were immunostained with APO2.7-PE conjugated antibody, as described by the manufacturer (Beckman Coulter), and analysed by cytometer. Apo2.7 specifically detects the Mr 38,000 mitochondrial membrane antigen 7A6, which is exclusively exposed on the cell membrane of apoptotic cells and can therefore be used as a late apoptotic marker in non permeabilized cells. A minimum of 10,000 events were analyzed using Kaluza 1.5a software.

Senescence analysis

Cellular Senescence Assay kit (KAA002RF, Meck Millipore) was used according to the manufacturer protocol. Briefly, cells were fixed with 1mL of fixative solution for 15 min at room temperature and incubated with SA- β -Gal staining solution at 37°C without CO₂. The SA- β -Gal positive cells were detected under a microscope (Scope.A1 Zeiss) and considered as positive when blue staining was evident in cytoplasm.

Statistical analysis

For each analysis, three different experiments were performed. The values are means \pm SEM. Statistical significance was determined with Student test. P-values were considered as statistically significant when less than 0.05.

Results

GSK-J4 reduced survival in chondrosarcomas

First, we treated three chondrosarcoma cell lines (CH2879, SW1353, JJ012) with increasing concentrations of GSK-J4 for four days and normal chondrocytes with 10 μ M of GSK-J4 for 3 days. The treatment reduced cell survival in all of chondrosarcoma cells but not normal chondrocytes. CH2879 and JJ012 were the most sensitive cell lines with an IC₅₀ value of 0.92 \pm 0.07 μ M and 1.02 \pm 0.26 μ M respectively. SW1353 appeared less sensitive with an IC₅₀ values of 1.97 \pm 0.52 μ M (figure 1A and table I).

Then, we studied cell growth in chondrosarcomas cultured in the presence of high dose of GSK-J4 (10 μ M). At this concentration, the treatment clearly reduced growth of all chondrosarcoma cells (figure 1B).

GSK-J4 reduced cell proliferation

To study the GSK-J4 effect on cell proliferation, we labelled cells with CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidyl ester) before incubating them with GSK-J4 for three days. CFSE fluorescence is stable for a long time allowing study of cell proliferation by observation of dye diffusion. Indeed, covalently bound CFSE to intracellular proteins is divided equally between daughter cells, allowing discrimination of successive rounds of cell division.

In each chondrosarcoma cell line, we observed that CFSE fluorescence was higher in GSK-J4 treated-cells than in untreated cells, indicating that GSK-J4 reduced cell division number, and consequently proliferation (figure 2A).

Next, we analysed cells for DNA content. GSK-J4 induced a blockage of the S phase in CH2879 and JJ012 chondrosarcoma cell lines. Similar effect exists in SW1353 cells, but the difference was not statistically significant (figure 2B).

GSK-J4 induced apoptosis and rarely senescence only in CH2879 and JJ012 cells

To elucidate whether GSK-J4 induced cell death, we assayed apoptosis in cells treated for 4 days. First, we observed a significant increase of apoptosis in CH2879 and JJ012 cells, but not in SW1353 chondrosarcomas. This was demonstrated by increase of both sub-G1 cell fraction and Apo2.7 staining only in these cells (figure 3A and B).

Next, we evaluated senescence in cells treated for 4 days. The staining of senescent cells by SA- β -gal revealed that GSK-J4 is able to induce senescence in CH2879 and JJ012 cells, since we could observe some SA- β -gal positive cells (which appeared blue upon microscopic observation) after GSK-J4 incubation. However, it seems to be a marginal process because less than 2% were senescent in our culture condition (GSK-J4 10 μ M, 4 days) (figure 3C). At contrary, no senescent cell was detected in SW1353.

GSK-J4/cisplatin combination reduced cell proliferation and did not induce more apoptosis than drugs alone in chondrosarcomas

Furthermore, we investigated whether GSK-J4 may increase cytotoxicity of standard drugs. Chondrosarcomas were treated with GSK-J4 (10 μ M) or/and cisplatin (5 μ M) for 3 days before assaying cell survival, proliferation and apoptosis.

GSK-J4 combined to cisplatin decreased cell number more than each drug alone in chondrosarcoma cells (figure 4A). It reduced their proliferation (figure 4B) without inducing more apoptosis than cisplatin alone (figure 4C).

Finally, we tested effect of GSK-J4 in chondrocytes. Treatment led no reduction of cell number nor apoptosis in these normal cells, even when used in combination with cisplatin (figure 5A and B), demonstrating that at this dose, GSK-J4 is not toxic for chondrocytes, contrary to chondrosarcomas.

Discussion

Chondrosarcoma treatment is challenging because this bone tumor is resistant to conventional chemotherapy and radiotherapy. In the present study, we evaluated the impact of GSK-J4 in these cells and their associated normal cells, namely chondrocytes. We found that GSK-J4 reduced chondrosarcoma proliferation when used alone as well as in co-treatment with cisplatin. However, it induced chondrosarcomas death by apoptosis (and senescence) only in some tumoral cells, and could not enhance more apoptosis than cisplatin did.

First, we demonstrated that in chondrosarcomas but in normal chondrocytes, GSK-J4 decreases cell proliferation. This is in agreement with anti-proliferative effect of this inhibitor observed in other tumoral cells, such as pediatric brainstem glioma (Hashizume et al., 2014),

acute lymphoblastic leukemia (Ntziachristos et al., 2014), and B-cell lymphoma (Mathur et al., 2017). Whereas the drug induced death by apoptosis and more moderately the senescence in some chondrosarcomas (JJ012 and CH2879), it could not induce apoptosis in SW1353, even in presence of cisplatin. This was surprising because GSK-J4 was previously described to be able to induce death in chemo-resistant tumoral cells, and to sensitize cells to standard chemotherapy agents *in vitro* and *in vivo* (Dalvi et al., 2017; Mathur et al., 2017).

Interestingly, we could observe a correlation between the response to cisplatin and GSK-J4. Indeed, no apoptosis could be detected after treatment with both drugs in SW1353, whereas cell death was observed in JJ012 and CH2879 cells after GSK-J4 as well as cisplatin treatment. In addition, we could not observe greater apoptosis in cells treated with GSK-J4/cisplatin than cisplatin alone. Together, these observations suggest that death mechanisms induced by cisplatin and GSK-J4 may be similar in chondrosarcomas. However, additional experiments will be required to confirm this hypothesis.

GSK-J4 was initially described as a specific JMJD3 and UTX inhibitor, which acts through interaction with α -ketoglutarate binding at active site of these histone demethylases (Kruidenier et al., 2012). However, the antitumoral effect of this drug is likely due to its ability to inhibit JMJD3 (but not UTX) activity. Indeed, only JMJD3 knockdown leads to a reduction of tumoral cell viability, while UTX silencing enhances cell proliferation, showing that both proteins with similar enzymatic function can play opposing roles in the context of the same disease (Ntziachristos et al., 2014). In addition, a recent study of GSK-J4 activity indicated that histone demethylase KDM5B (JARID1B), which removes H3K4me3 marks is also a target of GSK-J4, although with a lower affinity (Heinemann et al., 2014). Consequently, the molecular mechanism of GSK-J4 responsible of the reduction of chondrosarcoma survival need further

analysis, and its understanding may allow the development of new drugs with higher efficiency.

In conclusion, this study shows that the use GSK-J4 as therapeutic agent alone or in association with cisplatin may be efficient in some chondrosarcomas. It should be able to reduce tumor growth, and in some cases to induce apoptosis and senescence.

Acknowledgments

We thank Joel BLOCK (Rush University Medical Center, Chicago, USA) and Antonio LLOMBART-BOSH (University of Valencia, Valencia, Spain) for gracious chondrosarcoma gift. We also thank Marion BERTHELOT (BioConnect, Unicaen, Caen, France) and Marilyne GUILLAMIN (SFR 146 ICORE, Unicaen, Caen), for technical assistance for *in vitro* experiments and flow cytometry, respectively.

References

- Agger, K., Cloos, P.A.C., Rudkjær, L., Williams, K., Andersen, G., Christensen, J., and Helin, K. (2009). The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A–ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev.* *23*, 1171–1176.
- Barradas, M., Anderton, E., Acosta, J.C., Li, S., Banito, A., Rodriguez-Niedenführ, M., Maertens, G., Banck, M., Zhou, M.-M., Walsh, M.J., et al. (2009). Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes Dev.* *23*, 1177–1182.
- Dalvi, M.P., Wang, L., Zhong, R., Kollipara, R.K., Park, H., Bayo, J., Yenerall, P., Zhou, Y., Timmons, B.C., Rodriguez-Canales, J., et al. (2017). Taxane-Platin-Resistant Lung Cancers Co-develop Hypersensitivity to JumonjiC Demethylase Inhibitors. *Cell Rep.* *19*, 1669–1684.
- Duval, E., Bigot, N., Hervieu, M., Kou, I., Leclercq, S., Galéra, P., Boumediene, K., and Baugé, C. (2011). Asporin Expression Is Highly Regulated in Human Chondrocytes. *Mol. Med.* *17*, 816–823.

- Gil-Benso, R., Lopez-Gines, C., López-Guerrero, J.A., Carda, C., Callaghan, R.C., Navarro, S., Ferrer, J., Pellín, A., and Llombart-Bosch, A. (2003). Establishment and characterization of a continuous human chondrosarcoma cell line, ch-2879: comparative histologic and genetic studies with its tumor of origin. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *83*, 877–887.
- van Haften, G., Dalglish, G.L., Davies, H., Chen, L., Bignell, G., Greenman, C., Edkins, S., Hardy, C., O’Meara, S., Teague, J., et al. (2009). Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase, UTX, in human cancer. *Nat. Genet.* *41*, 521–523.
- Hashizume, R., Andor, N., Ihara, Y., Lerner, R., Gan, H., Chen, X., Fang, D., Huang, X., Tom, M.W., Ngo, V., et al. (2014). Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat. Med.* *20*, 1394–1396.
- Heinemann, B., Nielsen, J.M., Hudlebusch, H.R., Lees, M.J., Larsen, D.V., Boesen, T., Labelle, M., Gerlach, L.-O., Birk, P., and Helin, K. (2014). Inhibition of demethylases by GSK-J1/J4. *Nature* *514*, E1-2.
- Hübner, M.R., and Spector, D.L. (2010). Role of H3K27 Demethylases Jmjd3 and UTX in Transcriptional Regulation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *75*, 43–49.
- Jagasia, A.A., Block, J.A., Diaz, M.O., Nobori, T., Gitelis, S., Inerot, S.E., and Iyer, A.P. (1996). Partial deletions of the CDKN2 and MTS2 putative tumor suppressor genes in a myxoid chondrosarcoma. *Cancer Lett.* *105*, 77–90.
- Jankowska, A.M., Makishima, H., Tiu, R.V., Szpurka, H., Huang, Y., Traina, F., Visconte, V., Sugimoto, Y., Prince, C., O’Keefe, C., et al. (2011). Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood* *118*, 3932–3941.
- Jepsen, K., Solum, D., Zhou, T., McEvelly, R.J., Kim, H.-J., Glass, C.K., Hermanson, O., and Rosenfeld, M.G. (2007). SMRT-mediated repression of an H3K27 demethylase in progression from neural stem cell to neuron. *Nature* *450*, 415–419.
- Kooistra, S.M., and Helin, K. (2012). Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 297–311.
- Kruidenier, L., Chung, C., Cheng, Z., Liddle, J., Che, K., Joberty, G., Bantscheff, M., Bountra, C., Bridges, A., Diallo, H., et al. (2012). A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* *488*, 404–408.
- Kubo, T., Sugita, T., Shimose, S., Matsuo, T., Arihiro, K., and Ochi, M. (2008). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J. Bone Joint Surg. Br.* *90*, 364–370.
- Mansour, A.A., Gafni, O., Weinberger, L., Zviran, A., Ayyash, M., Rais, Y., Krupalnik, V., Zerbib, M., Amann-Zalcenstein, D., Maza, I., et al. (2012). The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature* *488*, 409–413.

- Mar, B., Bullinger, L., Basu, E., Schlis, K., Silverman, L., Döhner, K., and Armstrong, S. (2012). Sequencing Histone Modifying Enzymes Identifies UTX mutations in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia* 26, 1881–1883.
- Mathur, R., Sehgal, L., Havranek, O., Köhrer, S., Khashab, T., Jain, N., Burger, J.A., Neelapu, S.S., Davis, R.E., and Samaniego, F. (2017). Inhibition of demethylase KDM6B sensitizes diffuse large B-cell lymphoma to chemotherapeutic drugs. *Haematologica* 102, 373–380.
- Ntziachristos, P., Tsirigos, A., Welstead, G., Trimarchi, T., Bakogianni, S., Xu, L., Loizou, E., Holmfeldt, L., Strikoudis, A., King, B., et al. (2014). Contrasting roles for histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 514, 513–517.
- Rosenberg, A.E., Nielsen, G.P., Keel, S.B., Renard, L.G., Fitzek, M.M., Munzenrider, J.E., and Liebsch, N.J. (1999). Chondrosarcoma of the base of the skull: a clinicopathologic study of 200 cases with emphasis on its distinction from chordoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 23, 1370–1378.
- Santa, F.D., Totaro, M.G., Prosperini, E., Notarbartolo, S., Testa, G., and Natoli, G. (2007). The Histone H3 Lysine-27 Demethylase Jmjd3 Links Inflammation to Inhibition of Polycomb-Mediated Gene Silencing. *Cell* 130, 1083–1094.
- Scully, S.P., Berend, K.R., Toth, A., Qi, W.N., Qi, Z., and Block, J.A. (2000). Marshall Urist Award. Interstitial collagenase gene expression correlates with in vitro invasion in human chondrosarcoma. *Clin. Orthop.* 291–303.
- Sen, G.L., Webster, D.E., Barragan, D.I., Chang, H.Y., and Khavari, P.A. (2008). Control of differentiation in a self-renewing mammalian tissue by the histone demethylase JMJD3. *Genes Dev.* 22, 1865–1870.
- Thieme, S., Gyárfás, T., Richter, C., Özhan, G., Fu, J., Alexopoulou, D., Muders, M.H., Michalk, I., Jakob, C., Dahl, A., et al. (2013). The histone demethylase UTX regulates stem cell migration and hematopoiesis. *Blood* 121, 2462–2473.
- Torres, C.M., Laugesen, A., and Helin, K. (2013). Utx Is Required for Proper Induction of Ectoderm and Mesoderm during Differentiation of Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE* 8, e60020.
- Wang, C., Lee, J.-E., Cho, Y.-W., Xiao, Y., Jin, Q., Liu, C., and Ge, K. (2012). UTX regulates mesoderm differentiation of embryonic stem cells independent of H3K27 demethylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 15324–15329.
- Wang, J.K., Tsai, M.-C., Poulin, G., Adler, A.S., Chen, S., Liu, H., Shi, Y., and Chang, H.Y. (2010). The histone demethylase UTX enables RB-dependent cell fate control. *Genes Dev.* 24, 327–332.
- Zhao, W., Li, Q., Ayers, S., Gu, Y., Shi, Z., Chen, Y., Wang, H.Y., and Wang, R.-F. (2013). Jmjd3 Negatively Regulates Reprogramming Through Histone Demethylase Activity- Dependent and -Independent Pathways. *Cell* 152, 1037–1050.

Figure legends

Figure 1: GSK-J4 treatment decreases cell survival in chondrosarcoma cells.

(A) CH2879, JJ012 and SW1353 chondrosarcoma cells were treated with increasing doses of GSK-J4 (1 to 10 μ M) for 4 days. Human articular chondrocytes (HAC) were treated with GSK-J4 (10 μ M) for 3 days. At the end of treatment, adherent cells were counted after trypan blue exclusion of dead cells. Values are normalized to untreated cells. Data are expressed as means \pm SEM (n=3).

(B) Chondrosarcoma cells were treated with GSK-J4 (10 μ M) for 6 days. Viable cells were regularly counted. Values were normalized to day 0. Data are expressed as means \pm SEM (n=3).

Figure 2: GSK-J4 reduces cell proliferation in chondrosarcomas.

(A) Cells were labelled with CFSE, and then treated with GSK-J4 (10 μ M) for 3 days. CFSE fluorescence were tracked by flow cytometry (n=3).

(B) Cells were treated with 10 μ M GSK-J4 for 4 days. Then, DNA content was stained by propidium iodide, and cell cycle determined by flow cytometry. Histograms represent G0-G1, S and G2-M phase percentages. Data are expressed as means \pm SEM (n=3).

Figure 3: GSK-J4 induces cell death only in CH2879 and JJ012 chondrosarcoma cells.

(A) Cells were treated with 10 μ M GSK-J4 for 4 days, cells were fixed and cell cycle determined by flow cytometry. Histograms represent fraction of cells in Sub-G1 phase. Data are expressed as means \pm SEM (n=3).

(B) Cells were treated as previously. Then, they were stained with Apo 2.7 antibody coupled to phycoerythrin and analysed by flow cytometry (n=3).

(C) After treatment, senescent cells were stained with SA- β -gal. Representative pictures are shown. Magnification: x20 (n=3).

Figure 4: GSK-J4 in combination with cisplatin decrease cell growth in chondrosarcoma cells.

Cells were treated with GSK-J4 (10 μ M) or/and cisplatin (5 μ M) for 3 days.

(A) Viable cells were counted. Data normalized to untreated condition are expressed as means \pm SEM (n=3).

(B) Cells were stained with CFSE, then treated as previously. Dye dilution was analysed by flow cytometry (n=3).

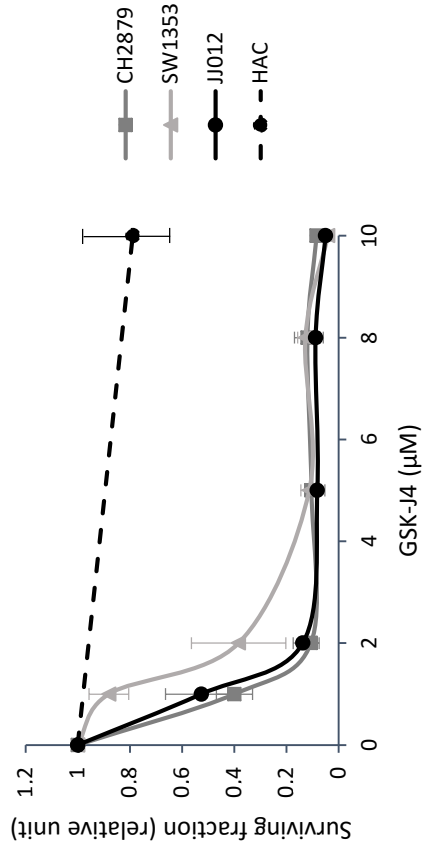
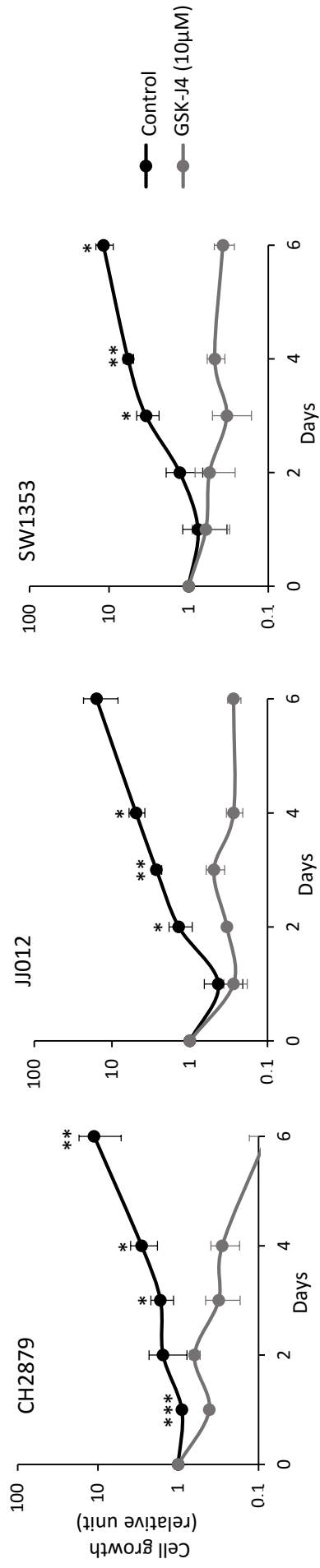
(C) Cells were stained with Apo 2.7 antibody coupled to phycoerythrin and analysed by flow cytometry. APO2.7+ cells were considered as apoptotic (n=3).

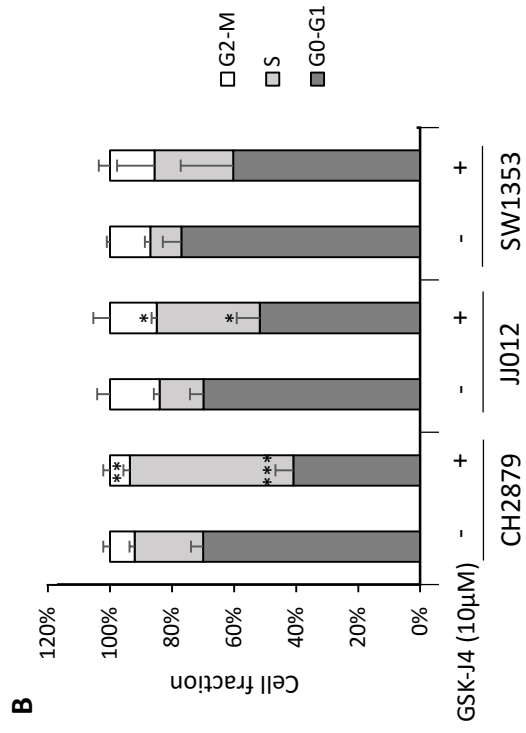
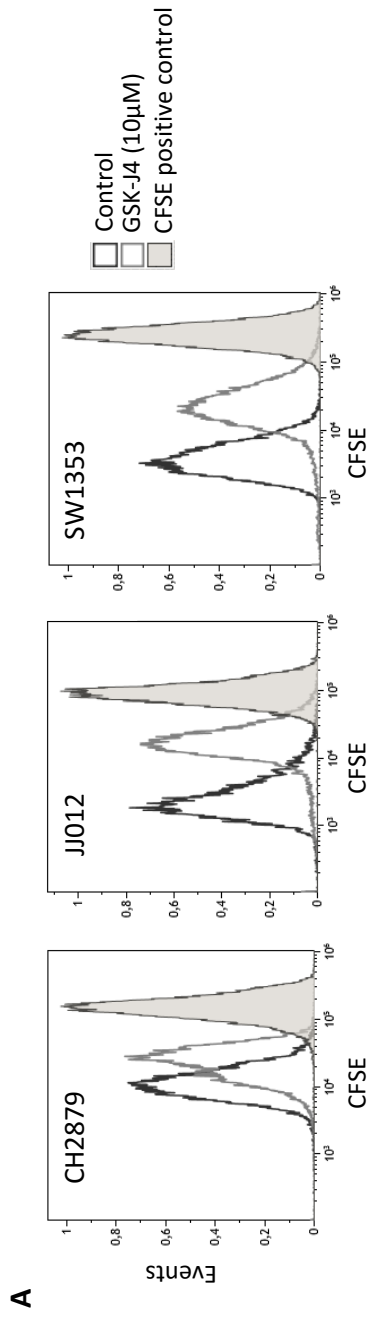
Tables

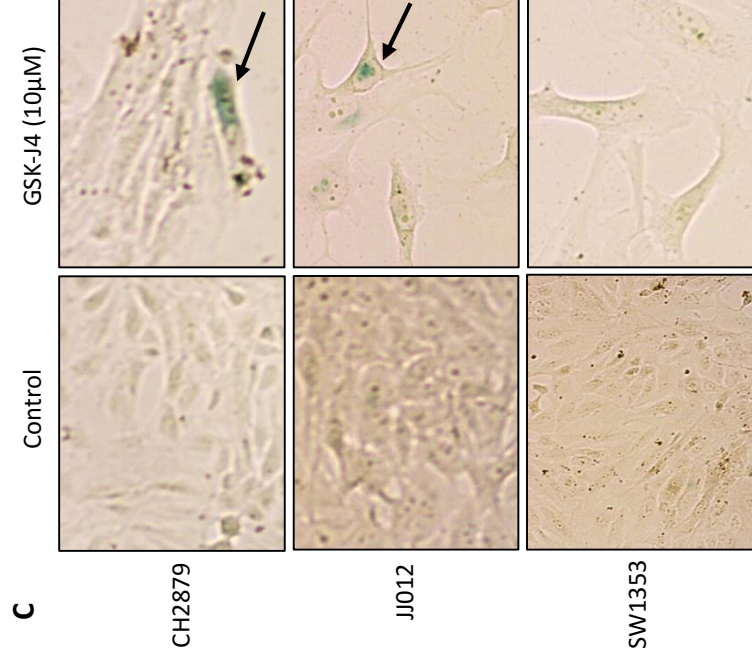
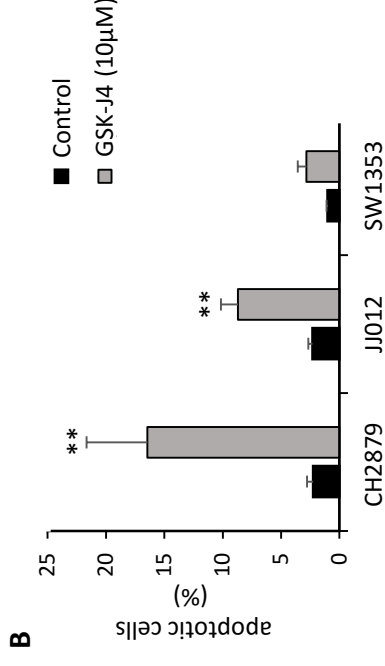
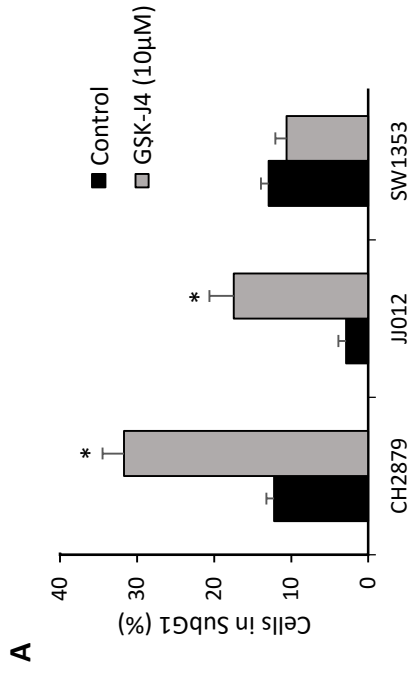
Table I: Summary of IC₅₀ of chondrosarcomas after GSK-J4 treatment.

IC₅₀ were estimated for graphically for three independent experiments. Data are expressed as means \pm SEM.

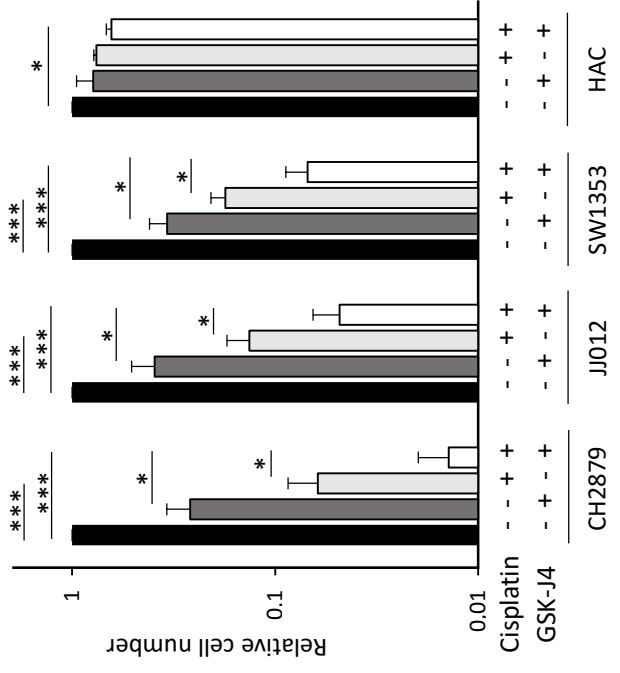
	CH2879	SW1353	JJ012
IC ₅₀ (μ M)	0.92 \pm 0.08	1.02 \pm 0.26	1.97 \pm 0.52

A**B**

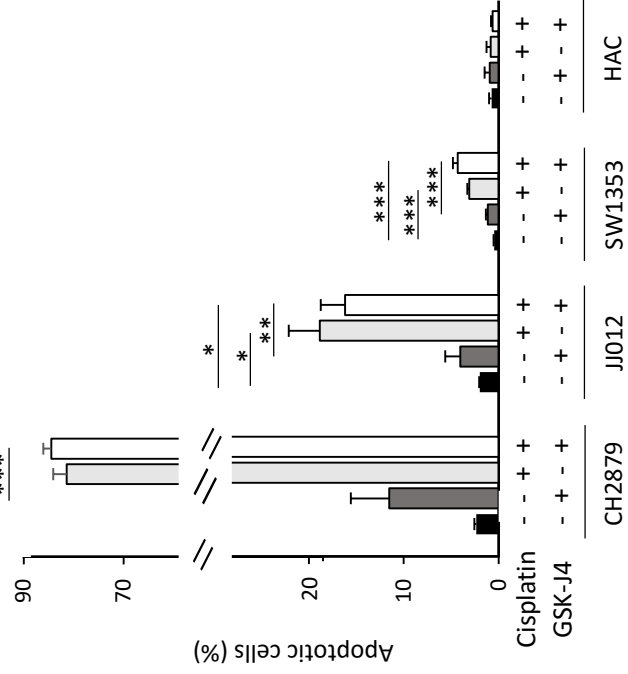




A



C



B

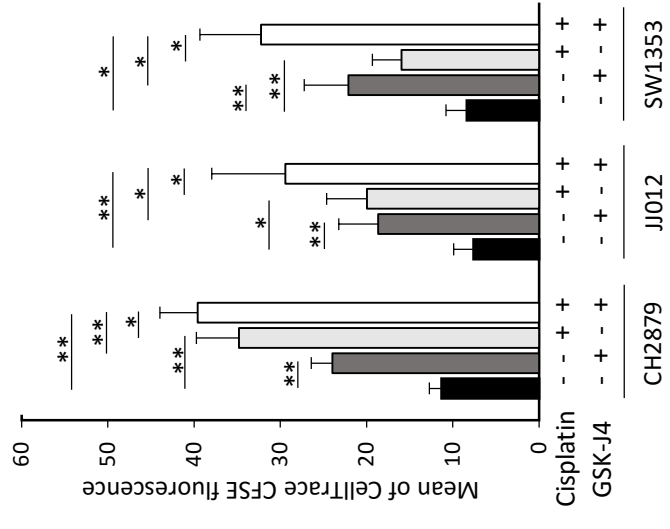


Figure 4

Conclusion du projet II :

Au cours de mon travail, nous avons confirmé l'intérêt du DZNep comme molécule prometteuse pour le traitement des chondrosarcomes. Dans un premier temps, nous avons démontré son action pro-apoptotique dans plusieurs lignées cellulaires et des cultures primaires de chondrosarcome, alors qu'il n'affecte pas les chondrocytes. Cet effet a été validé dans un modèle tri-dimensionnel par encapsulation des chondrosarcomes dans des billes d'alginate et in vivo dans un modèle d'implantation en sous cutané des chondrosarcomes. De plus, nous avons montré un effet synergique du DZNep et du cisplatine dans l'induction de l'apoptose des chondrosarcomes, suggérant que ces molécules pourraient être utilisées en combinaison. Dans un second temps, nous avons montré que l'administration chronique du DZNep dans des souris immunocompétentes a peu d'effets secondaires et ne modifie pas leur comportement (anxiété, locomotion, mémoire et état dépressif). Toutefois, il induit une perte de poids des souris immunocompétentes et une splénomégalie réversibles à l'arrêt du traitement et une atrophie testiculaire irréversible. Cependant, cette dernière est malheureusement retrouvée dans la plupart des traitements par chimiothérapie.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'action du DZNep. Nous avons montré que contrairement à notre hypothèse de départ, le DZNep agit sur les chondrosarcomes indépendamment de l'activité méthylase d'EZH2 et que la réduction de H3K27me3 n'induit pas leur mort. En revanche, nous suggérons que le DZNep pourrait induire l'apoptose par un mécanisme dépendant de la SAH et de la régulation de l'expression d'EGFR et de Rho β (Figure 33). Cependant cette hypothèse reste à être validée. De même, il a été rapporté que le DZNep n'est pas sélectif à H3K27me3 et peut agir sur le niveau de méthylation d'autres histones telles que H3K9me2, H3K9me3, H3K79me3 et H4K20me3 (Miranda et al., 2009). Aussi, le DZNep pourrait induire l'apoptose dans les chondrosarcomes en agissant sur d'autres histones méthyltransférases.

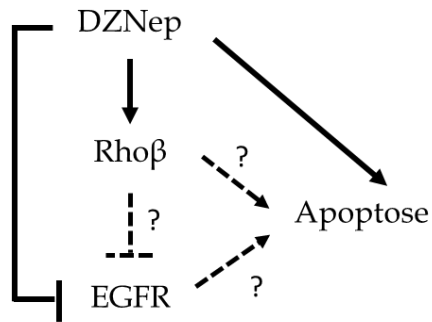


Figure 33 : Modèle possible du mécanisme d'action du DZNep dans les chondrosarcomes.
 Le DZNep augmente l'expression de Rho β , diminue celle d'EGFR et provoque leur mort par apoptose (flèches en trait plein). L'augmentation de l'expression de Rho β par le DZNep pourrait induire l'inhibition d'EGFR et par conséquent provoquer l'apoptose dans les chondrosarcomes (flèches en pointillée).

Enfin, nous avons montré que le GSK-J4 provoque une diminution de la prolifération des chondrosarcomes et que cet effet est augmenté lorsqu'il est combiné avec le cisplatine. De manière intéressante, nous avons également mis en évidence qu'il n'a pas d'effet sur la survie cellulaire ni sur l'apoptose des chondrocytes normaux lorsqu'il est utilisé seul ou en association avec le cisplatine.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Du fait de leur résistance, la prise en charge des chondrosarcomes reste à ce jour une problématique très actuelle, malgré le recul de plusieurs dizaines d'années sans modification des traitements. Le seul traitement efficace pour les lésions de haut grade reste le traitement chirurgical, avec la limite de l'accessibilité de la tumeur et le risque de récurrence et de métastase. Dans la mesure où, actuellement, il n'existe aucun traitement efficace permettant de réduire le volume tumoral pour éviter des chirurgies lourdes et délabrantes, de nouvelles thérapies sont nécessaires pour les patients atteints d'un chondrosarcome.

Dans ce contexte, ce travail de thèse avait pour objectif de mieux comprendre le rôle de l'hypoxie dans la résistance des chondrosarcomes à la chimiothérapie et à la radiothérapie et d'explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'induire la mort ou de sensibiliser les chondrosarcomes aux traitements. Ainsi, nous avons montré que contrairement à ce qui communément admis, l'hypoxie n'est pas toujours responsable de la résistance des chondrosarcomes au cisplatine et aux rayons X et que le 3-deazaneplanocine A, décrit initialement comme un inhibiteur indirect d'EZH2, induit l'apoptose dans les chondrosarcomes de manière indépendante de l'activité méthylase d'EZH2 et de la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré que l'hypoxie sensibilise la lignée JJ012 aux rayons X mais induit une résistance au cisplatine dans cette même lignée. Sur les trois autres lignées de chondrosarcome étudiées, l'hypoxie ne change pas la réponse aux traitements.

Tout d'abord, ces résultats montrent que les chondrosarcomes sont des tumeurs hétérogènes avec des réponses différentes aux traitements. Afin de comprendre cette différence, nous avons émis l'hypothèse que des mutations génétiques différentes pouvaient être responsables. Pour cela, nous avons analysé les données obtenues au sein du laboratoire après séquençage de l'exome des quatre lignées de chondrosarcome, et nous avons identifié 207 gènes mutés uniquement dans la lignée JJ012. Tous ces gènes ont une mutation prédite délétère *in silico*. Afin de réduire cette liste de gènes, nous avons utilisé des outils bio-informatiques (DAVID et AmiGO) et identifié trois gènes potentiellement impliqués dans cette différence de réponse car associés à la réparation des lésions à l'ADN, à la diminution de l'accumulation de drogues et à l'apoptose. Actuellement, l'analyse fonctionnelle de ces gènes est en cours. Nous avons également étudié la phosphorylation de STAT3 (facteur de transcription activé par l'hypoxie

favorisant la survie des cellules tumorales) du fait qu'il a été mis en évidence que l'hypoxie augmente sa phosphorylation et la chimiorésistance des tumeurs ovariennes (Selvendiran et al., 2009). De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que l'hypoxie augmente la phosphorylation de STAT3 uniquement dans la lignée JJ012. Néanmoins, après analyse par western-blot, la phosphorylation de STAT3 ne semble pas être régulée entre les différentes lignées de chondrosarcome ni modifiée par l'hypoxie (données non montrées). Une autre hypothèse pourrait être que les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α soient responsables de la résistance de la lignée JJ012 au cisplatine. En effet, l'hypoxie active ces facteurs, des régulateurs clés de la réponse cellulaire à l'hypoxie permettant l'adaptation des cellules au milieu hypoxique. Ces facteurs induisent l'expression de gènes impliqués dans la progression tumorale et l'augmentation de la résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie. Aussi, pour évaluer leur rôle potentiel, nous réaliserons des expériences de perte et de gain de fonctions dans les chondrosarcomes. Nous effectuerons des surexpressions de HIF-1 et de HIF-2 par transfection des vecteurs HIF-1 α -pcDNA3 et HIF-2 α -pcDNA3 en normoxie et nous inhiberons leur expression en utilisant des siRNA dirigés contre ces deux facteurs sous hypoxie.

Deuxièmement, nos résultats montrent que l'hypoxie induit des réponses différentes aux traitements, il diminue la radiorésistance et augmente la chimiorésistance de la lignée JJ012. Cette différence de réponse peut s'expliquer par le fait que le cisplatine et les rayons X n'induisent pas les mêmes dommages à l'ADN. En effet, ces derniers provoquent majoritairement des cassures simple-brin et double-brin alors que le cisplatine provoque des adduits à l'ADN. De plus, ces deux traitements n'induisent pas l'activation des mêmes voies de réparation à l'ADN ce qui pourrait expliquer que l'hypoxie influence différenciellement cette réponse. Le cisplatine fait intervenir plusieurs types de transporteurs tels que des transporteurs de cations organiques (SLC22A), de cuivre (CTR, SLC47A) et d'extrusion d'agents cytotoxiques (SLC47A). De cette façon, l'absorption cellulaire et l'activité anti-tumorale du cisplatine peuvent être influencées par l'expression et l'activation de ces transporteurs. En effet, la protéine MATE1 (Mutidrug And Toxin Extrusion 1), codée par le gène SLC47A1, est un échangeur de cations organiques couplé aux H⁺ responsable de l'efflux du cisplatine (Jong and McKeage, 2014). Il a été montré qu'une exposition au cisplatine induit une accumulation de platine extracellulaire due à une augmentation de l'expression de MATE1 et provoque une résistance au cisplatine (Jong and McKeage, 2014; Yonezawa et al., 2006). L'analyse des données de transcriptomique nous a permis de mettre en évidence que l'hypoxie augmente

l'expression du gène SLC47A1 en réponse à un traitement au cisplatine dans la lignée JJ012 (données non montrées). Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'hypoxie induit une résistance au cisplatine dans cette lignée en augmentant l'expression de la protéine MATE1 et provoque donc une accumulation plus importante de cisplatine à l'extérieur des cellules, par rapport aux trois autres lignées de chondrosarcome. Afin de valider cette hypothèse, il sera nécessaire dans un premier temps de valider par RT-PCR en temps réel l'augmentation de l'expression du gène SLC47A1 induite par l'hypoxie en réponse au cisplatine dans la lignée JJ012 et d'analyser son expression dans les trois autres lignées de chondrosarcome. Dans un second temps, si l'hypoxie régule l'expression de ce gène uniquement dans la lignée JJ012, nous étudierons l'expression protéique de MATE1 et nous effectuerons des tests fonctionnels de perte et de gain de fonction de l'expression de MATE1 afin de valider son implication dans la résistance de cette lignée au cisplatine en hypoxie. Parmi les transports d'efflux de drogues, nous trouvons également la P-glycoprotéine, une pompe codant le gène MDR-1 et appartenant à la famille des transporteurs ABC, impliquée dans les mécanismes de chimiorésistance. Il a été montré que les lignées de chondrosarcomes JJ012 et SW1353 expriment la P-glycoprotéine (Kim et al., 2009). De plus, il a été rapporté que l'expression de HIF-1 α est positivement corrélée à celle de la P-glycoprotéine et que leur expression augmente significativement en réponse à l'hypoxie dans des carcinomes laryngés (Xie et al., 2013) et dans des cancers du côlon (Chen et al., 2014). Enfin, il a été montré que le cisplatine augmente l'expression du gène MDR-1 dans des lignées cancéreuses de vessie rendues résistantes au cisplatine (Sun et al., 2016). Toutes ces données suggèrent que l'hypoxie pourrait augmenter la résistance de la lignée JJ012 au cisplatine par un mécanisme dépendant de la P-glycoprotéine. Afin de valider cette hypothèse, nous étudierons l'expression protéique de la P-glycoprotéine dans les lignées de chondrosarcome et nous effectuerons des tests fonctionnels, comme décrit précédemment. Enfin, nous avons déjà mesuré la concentration intracellulaire de platine par spectrométrie d'absorption atomique de flamme dans les quatre lignées de chondrosarcome après un traitement au cisplatine en normoxie ou en hypoxie. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence que l'hypoxie induit une diminution de la concentration intracellulaire de platine dans la lignée JJ012 car nous avons obtenu des variations inter-échantillons trop importantes (données non montrées). Aussi, nous envisageons de mesurer cette concentration en utilisant une autre technique : la spectrométrie de masse.

Ce travail de thèse a permis d'établir un modèle d'étude en trois dimensions par encapsulation des chondrosarcomes dans des billes d'alginate. Ce modèle présente des caractéristiques semblables aux conditions *in vivo* permettant de se rapprocher de leur environnement naturel, un avantage majeur par rapport à la culture en deux dimensions (Cukierman et al., 2001). En effet, dans les conditions classiques de culture en monocouche, les composants de la matrice extracellulaire et les interactions cellule-cellule et cellule-matrice, nécessaires à la différenciation, la prolifération et les fonctions cellulaires *in vivo*, sont perdus. L'organisation des cellules en 3D permet d'intégrer ces composants ainsi que les interactions mutuelles entre les voies de signalisation (Mazzoleni et al., 2009). Ce modèle permet également d'étudier l'efficacité de nouvelles drogues à visée thérapeutique ou des mécanismes de résistance permettant ainsi de réduire le nombre d'expérimentations animales et les complexités expérimentales qu'impliquent les modèles animaux. Nous avons montré que les chondrosarcomes cultivés dans des billes d'alginate produisent une matrice cartilagineuse et ont une capacité migratoire et invasive. Cette production de matrice cartilagineuse pourrait être augmentée par l'ajout de facteurs exogènes tels que le TGF- β 3, BMP-6 ou l'acide ascorbique (Reijnders et al., 2010). Cependant, ces facteurs peuvent interagir avec les drogues thérapeutiques. C'est pourquoi, afin de s'y affranchir, nous cultiverons les lignées de chondrosarcome dans des billes d'alginate en hypoxie (1% d'O₂), comme montré pour les chondrocytes (Duval et al., 2012), permettant ainsi d'améliorer notre modèle en se rapprochant au mieux des conditions naturelles des chondrosarcomes. Toutefois, notre modèle d'étude reste fiable et solide car il nous a permis de prédire la réponse des chondrosarcomes aux traitements *in vivo*. En effet, les chondrosarcomes cultivés en 3D et *in vivo* ne répondent pas à un traitement par le cisplatine alors qu'ils sont sensibles au DZNep.

Concernant le modèle d'étude *in vivo*, nous avons implanté les chondrosarcomes en sous cutanée. Or, ces tumeurs sont des lésions le plus fréquemment intra-osseuses. Ainsi, le développement d'un modèle tumoral orthotopique, intra-osseux ou périosté, au sein de notre laboratoire, permettrait de mieux comprendre la pathologie des chondrosarcomes (van Oosterwijk et al., 2015; Clark et al., 2010). En effet, les modèles d'implantation intra-tibiale et périostée de la lignée JJ012 permettent le développement de métastases pulmonaires (Clark et al., 2010). L'équipe de van Oosterwijk quant à elle, a développé un modèle d'implantation orthotopique permettant la croissance des lignées CH2879 et SW1353 dans la cavité médullaire ainsi que la production de protéoglycanes, se rapprochant au mieux, du chondrosarcome conventionnel central humain.

Sachant que les chondrosarcomes sont des tumeurs résistantes à la radio- et à la chimiothérapie, il est essentiel de trouver de nouvelles thérapies. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au ciblage de la méthylation de l'histone H3K27. Nous avons mis en évidence que sa méthylase EZH2 était exprimée dans les chondrosarcomes de haut grade (grades II et III) alors que les enchondromes (tumeurs bénignes) ne l'expriment pas (Girard et al., 2014). Sachant que la surexpression d'EZH2 est fréquente dans de nombreux cancers et est corrélée à un mauvais pronostic, il pourrait devenir un marqueur des hauts grades. Afin de statuer sur la possibilité de définir EZH2 comme un marqueur pronostique, ce travail devra être confirmé par une étude comportant un nombre plus important de tumeurs cartilagineuses. Il est en effet important de trouver un marqueur fiable pour les chondrosarcomes car il répond à un besoin en clinique, dû à une grande variabilité inter-observateur.

Au vu de ces résultats, le ciblage de cette méthylase semblait être une piste intéressante pour le traitement des chondrosarcomes. Ainsi, nous avons voulu inhiber EZH2 par le 3-deazaneplanocine A (DZNep), et nous avons induit la mort des chondrosarcomes par apoptose *in vitro* et *in vivo*. Mais de façon inattendue, nous avons montré que cet effet est indépendant de l'activité méthylase d'EZH2 et de la tri-méthylation de H3K27. Ces résultats suggèrent fortement que l'utilisation du tazemetostat (ou EPZ-6438), un inhibiteur spécifique d'EZH2 utilisé dans des essais cliniques de phases I et II sur des sarcomes synoviaux et épithéliaux, des mésothéliomes malins ou des lymphomes folliculaires (ClinicalTrials), serait inefficace contre les chondrosarcomes. En effet, nous avons montré *in vitro* qu'il diminue le niveau de tri-méthylation de H3K27 mais n'induit pas la mort des chondrosarcomes.

Bien que le DZNep semble être un traitement efficace contre les chondrosarcomes, il ne faut pas omettre qu'il existe des phénomènes de résistance responsables de l'échec d'un grand nombre d'agents cytotoxiques. Dans un premier temps, les cellules cancéreuses peuvent avoir une résistance intrinsèque au DZNep. En effet, il a été montré que la réponse au DZNep est associée au statut du gène TP53 dans des tumeurs thyroïdiennes et gastriques. Les lignées cellulaires ayant une mutation TP53 sont résistantes au DZNep et inversement (Cui et al., 2014; Cheng et al., 2012). Nous avons mis en évidence que ce dernier induit l'apoptose dans les chondrosarcomes de façon indépendante du statut du gène TP53 car l'analyse des données d'exome a permis de mettre en évidence que les lignées CH2879, SW1353 et JJ012 présentent une mutation TP53 prédite délétère *in silico*. Dans un second temps, la résistance pourrait être acquise après plusieurs semaines de traitement au DZNep. Actuellement, aucune étude n'a été menée pour le confirmer. C'est pourquoi, il serait intéressant de cultiver des lignées et des

cultures primaires de chondrosarcome avec des doses croissantes de DZNep sur une longue période (6 mois – 1 an) et d'évaluer la réponse cellulaire par étude de la survie et de l'apoptose. Le DZNep n'est pas encore utilisé en clinique et reste au stade expérimental. C'est pourquoi nous avons étudié l'effet de l'administration chronique du DZNep dans des souris immunocompétentes et montré qu'il n'a pas d'impact sur leur comportement (locomotion, mémoire, anxiété, état dépressif) mais provoque des effets secondaires limités. Il induit une perte du poids des souris, réversible à l'arrêt du traitement. Cependant, nous n'avons pas observé cet effet chez les souris immunodéficientes (nude). De plus, il a été montré qu'un traitement au DZNep, chez des souris immunodéficientes (NOD/SCID), n'affecte pas le poids des animaux (Gannon et al., 2013). Ces données suggèrent que le DZNep pourrait agir différemment en fonction du statut immunologique. Il provoque également une réduction du nombre de réticulocytes associée à une splénomégalie. Ces anomalies pourraient correspondre à un blocage central, intra-médullaire, de la lignée érythroblastique et une étude du myélogramme devra être réalisée. De plus, des coupes histologiques de testicule révèlent une importante atrophie avec une disparition complète des spermatogonies qui sont remplacées par des cellules de Sertoli et une hyperplasie des cellules de Leydig. Toutefois, ce problème de fertilité est malheureusement retrouvé dans la plupart des traitements par chimiothérapie. Une hypothèse pouvant expliquer cette atrophie est que les testicules expriment fortement l'histone méthylase EZH2, nécessaire à la spermatogenèse (Hinz et al., 2010) et que son inhibition induit un arrêt méiotique dans les spermatocytes (Mu et al., 2017). Aussi, cette atrophie testiculaire pourrait être due à l'inhibition de l'expression d'EZH2 par le DZNep. Afin de valider cette hypothèse, nous effectuerons une analyse immunohistochimique de l'expression d'EZH2 sur des coupes testiculaires de souris après traitement ou non au DZNep. De plus, au vu de ces résultats sur la fertilité masculine, une étude pré-clinique sur la fertilité ovarienne après injection chronique du DZNep devra également être menée, en effectuant un suivi de la taille des ovaires et des analyses histologiques et immunohistochimiques de l'expression d'EZH2 sur des coupes ovariennes. En effet, EZH2 est également exprimé dans les ovaires mais de manière moins importante que dans les testicules. Aussi le DZNep pourrait induire un effet néfaste sur l'ovogenèse de façon moindre que sur la spermatogenèse.

Toutefois, plusieurs moyens peuvent être mis en place pour contourner les effets néfastes du DZNep. Premièrement, l'utilisation de doses plus faibles de DZNep et de cisplatine nous a permis de mettre en évidence que leur association *in vitro* diminue la survie, augmente de façon synergique l'apoptose dans les chondrosarcomes, et n'a pas d'effet sur les chondrocytes. In

vivo, leur association diminue le volume tumoral et induit l'apoptose dans les tumeurs. Cependant, l'implantation tumorale de la lignée JJ012 a été réalisée sur un faible nombre de souris (3 par groupe), il sera nécessaire de réitérer cette expérience avec un nombre plus important de souris pour une meilleure puissance statistique.

Deuxièmement, le DZNep a été administré par voie intrapéritonéale permettant une dissémination systémique de l'agent thérapeutique. Cependant, une injection plus localisée permettrait de réduire, voire de supprimer ces effets néfastes. Pour cela, de nouvelles techniques se sont développées. Par exemple, l'encapsulation du DZNep avec une nanoparticule biodégradable de poly(lactide-co-glycolide)- β -polyéthylène glycol (PLGA- β -PEG) permet l'utilisation de dose plus faible de DZNep pour diminuer la survie de cellules cancéreuses pancréatiques *in vitro* (Hung et al., 2013). De plus, l'encapsulation du cisplatine dans un nanopolymère avec un inhibiteur de la phosphatase 2A (réduisant la réparation de l'ADN) augmente son accumulation dans les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*. Cette stratégie d'encapsulation du cisplatine pourrait être transposée au DZNep dans les chondrosarcomes afin d'optimiser sa distribution au niveau de la tumeur et ainsi éviter ou diminuer ses effets secondaires (atrophie testiculaire, réticulopénie).

Enfin, l'analyse des données de transcriptomique suggère que le DZNep induirait l'apoptose dans les chondrosarcomes en augmentant l'expression de Rho β et en diminuant l'expression d'EGFR. Des analyses fonctionnelles consistant à inhiber ou à surexprimer ces facteurs sont en cours afin de valider leur implication ou non dans le mécanisme d'action du DZNep. Si nous parvenons à le valider, il sera pertinent de cibler EGFR et Rho β dans les chondrosarcomes. En effet, nous savons déjà que des inhibiteurs d'EGFR sont utilisés et approuvés par l'Agence Européenne de Médecine (EMA) pour le traitement de nombreux cancers : le cetuximab est autorisé pour traiter les cancers colorectaux et les cancers de la tête et du cou, l'erlotinib pour les carcinomes pulmonaires non à petites cellules et les cancers pancréatiques, le gefitinib pour les carcinomes pulmonaires non à petites cellules, le lapatinib pour les cancers du sein et le panitumumab pour les cancers colorectaux. A notre connaissance, seulement deux études ont été menées sur les chondrosarcomes. La première a montré que les lignées de chondrosarcome surexpriment le récepteur EGFR et que cette surexpression contribue à la résistance de ces tumeurs au cisplatine. Aussi, elle a permis de mettre en évidence que l'association d'un inhibiteur d'EGFR, l'erlotinib, avec le cisplatine induit l'apoptose dans les lignées de chondrosarcomes (Song et al., 2014). La seconde étude montre que le gefitinib inhibe la croissance et diminue la capacité métastatique de deux lignées de chondrosarcome (Song et al.,

2015). D'autre part, l'activation de Rho β peut être induite par des inhibiteurs de la farnesyltransférase tels que le tipifarnib dont le développement pour le traitement des leucémies myéloïdes aiguës est autorisé par l'EMA. L'augmentation de Rho β par cet inhibiteur est responsable de l'induction de l'apoptose. Ainsi, nous évaluerons in vitro la sensibilité des chondrosarcomes aux inhibiteurs d'EGFR ou de la farnesyltransférase en évaluant plusieurs paramètres tels que l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, l'invasion, la migration et l'angiogenèse. Nous étudierons également in vivo les effets anti-tumoraux de l'inhibiteur ayant la meilleure efficacité in vitro par suivi du volume tumoral et par analyse histochimique des tissus sains.

Cependant, il a été rapporté que des mécanismes de résistance aux inhibiteurs d'EGFR se mettent en place dans les cancers pulmonaires non à petites cellules, en induisant des mutations sur le récepteur (Giaccone and Wang, 2011). Aussi, pour contrer leur effet, la cellule tumorale active les voies de signalisation en aval (Figure 34). Ainsi, il a été montré que ces tumeurs étaient résistantes à une exposition prolongée à l'erlotinib ou au gefitinib dû à l'induction de la phosphorylation de STAT3 (Tang et al., 2015). C'est pourquoi, des auteurs ont testé l'efficacité de certains inhibiteurs des voies situées en aval d'EGFR sur les chondrosarcomes. Aussi, ils ont mis en évidence que l'inhibition de PI3K, par le GDC-0941, ou l'inhibition de mTOR, par la rapamycine, inhibe leur croissance. De plus, la double inhibition de PI3K et mTOR, par le BEZ235, inhibe de façon plus importante leur croissance cellulaire. Aussi, si des mécanismes de résistance se mettent en place dans les chondrosarcomes, il sera judicieux de tester l'efficacité de ces inhibiteurs sur les chondrosarcomes seuls ou en association avec le cisplatine. En effet, Zhu et col ont montré que la surexpression du miRNA-100, un miRNA ciblant l'ARN de mTOR, restaure l'apoptose induite par le cisplatine dans des clones des lignées CH2879 et JJ012 rendus résistants au cisplatine (Zhu et al., 2014). Au sein du laboratoire, l'effet de la rapamycine sur les quatre lignées de chondrosarcome, seul ou en association avec le cisplatine est en cours.

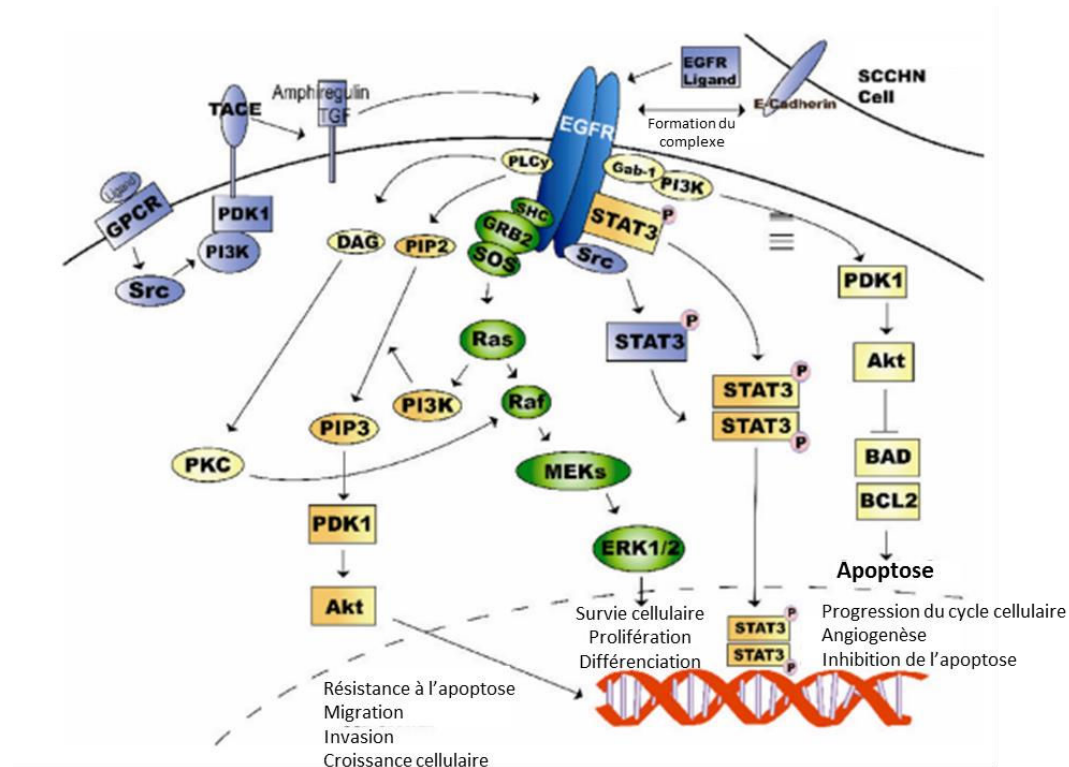


Figure 34 : La voie de signalisation EGFR.

La liaison du ligand à EGFR entraîne une modification conformationnelle du récepteur permettant son homodimérisation ou l'hétérodimérisation avec un autre membre de la famille HER. Le récepteur transphosphorylé active les protéines en aval et déclenche une cascade de signalisation, incluant les voies Ras, Raf, MAPK, PI3K et Akt et l'initiation de la transcription des gènes (Morgan and Grandis, 2009).

Au cours de ce travail, nous avons utilisé une seconde approche thérapeutique pour les chondrosarcomes en ciblant la déméthylation de H3K27 et ses histone déméthylases UTX (KDM6A) et JMJD3 (KDM6B). H3K27 joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes qui déterminent l'équilibre entre la différenciation cellulaire et la prolifération. Cependant, l'altération du niveau de méthylation de H3K27 est récurrente dans de nombreux types de cancers, démontrant que l'excès ou le manque de méthylation de H3K27 peut avoir des effets pro-tumoraux. En effet, il a été montré que la surexpression d'UTX, dans les cancers du sein, favorise la prolifération et l'invasion cellulaire (Kim et al., 2014). Il serait intéressant d'étudier l'expression de ces deux histone déméthylases dans les chondrosarcomes en effectuant une analyse immunohistochimique de l'expression d'UTX et de JMJD3 sur des coupes de chondrosarcomes.

Par ailleurs, nous avons montré que le GSK-J4, un inhibiteur des déméthylases UTX et JMJD3, induit une diminution de la prolifération des chondrosarcomes permettant ainsi de diminuer leur propriété oncogénique. De plus, il provoque l'apoptose uniquement dans les lignées CH2879 et JJ012. Cette différence de réponse peut être due à un profil génétique différent entre les lignées cellulaires. En effet, des mutations des gènes IDH1 et IDH2 codant l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 interviennent lors de la phase précoce du développement des chondrosarcomes. Ces mutations activent la production du 2-hydroxyglutarate (2-HG) à partir de l' α -cétoglutarate. Le 2-HG est un inhibiteur compétitif des dioxygénases dépendantes de l' α -cétoglutarate incluant les histone déméthylases JmJc. Aussi, les mutations IDH1 et IDH2 inhibent une large gamme d'histone déméthylases y compris les histones UTX et JMJD3 (Losman and Kaelin, 2013; Lu et al., 2012; Xu et al., 2011). Ainsi, l'analyse des données d'exome (Tableau VII) a permis de mettre en évidence que ces histone déméthylases ne sont pas mutées dans les quatre lignées de chondrosarcomes mais que le gène IDH1 est muté dans les lignées JJ012 et FS090 et le gène IDH2 est muté dans la lignée SW1353. Toutefois, ces mutations prédites délétères in silico ne sont pas corrélées à la différence de réponse au GSK-J4 entre les lignées CH2879 et JJ012 et la lignée SW1353, en particulier pour ce qui concerne l'apoptose.

Tableau VII : Profil génétique des gènes UTX, JMJD3, IDH1, IDH2 et TP53 dans les quatre lignées de chondrosarcome par analyse des données d'exome.

Le gène IDH1 est muté dans la lignée JJ012 pour laquelle une cytosine (C) est substituée par une guanine (G) en position 394 et dans la lignée FS090 où en position 394, une cytosine est remplacée par une thymine (T). Le gène IDH2 est muté uniquement dans la lignée SW1353, une guanine est substituée par une thymine en position 516. htz : mutation à l'état hétérozygote, hom : mutation à l'état homozygote, wt : wild type, Dup : duplication, p. : protéine, c. : codant à l'état hétérozygote, LOH : Loss of heterozygosity.

	UTX	JMJD3	IDH1	IDH2	TP53		
CH2879	wt	wt	wt	wt	NM_000546 c.1096T>G (hom → LOH ?) p.S366A	Apoptose par GSK-J4	Apoptose par DZNep
JJ012	wt	wt	NM_005896 c.394C>G (htz) p.R132G	wt	NM_000546 c.596G>T (hom → LOH ?) p.G199V	Apoptose par GSK-J4	Apoptose par DZNep
SW1353	wt	wt	wt	NM_002168 c.516G>T (htz) p.R172S	NM_000546 c.607G>T (htz) p.V203L	Pas d'apoptose par GSK-J4	Apoptose par DZNep
FS090	wt	wt	NM_005896 c.394C>T (htz) p.R132C Dup. 139 Mb	wt	wt	Pas d'apoptose par GSK-J4 (donnée non montrée)	Apoptose par DZNep

Sachant que l'hypoxie affecte la réponse à un traitement par le cisplatine et par irradiation aux rayons X, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'elle peut également affecter la réponse au DZNep et au GSK-J4. Nous savons que le microenvironnement des tumeurs solides est caractérisé par des régions pauvres en oxygène qui jouent un rôle important dans la progression tumorale. Aussi, l'hypoxie peut favoriser la progression tumorale par un mécanisme épigénétique. En effet, l'hypoxie induit une acétylation globale, une augmentation des niveaux de H3K9me2, H3K9me3 et H3K4me3 et une diminution des niveaux de H3K27me3 (Tsai and Wu, 2014; Mimura et al., 2013; Yang et al., 2009).

Les histone déméthylases à domaine JmjC ont besoin d'oxygène pour être actives (Shmakova et al., 2014), et il a été mis en évidence que certaines histone déméthylases (KDM3A, KDM4B et KDM4C) sont induites par l'hypoxie de manière dépendante du facteur HIF- α (Salminen et

al., 2016). Lee et col. ont montré que l'hypoxie augmente l'expression de JMJD3 de façon dépendante du facteur HIF-1 α dans des cellules souches dérivées d'adipocytes humains (hADSC) et que le gène JMJD3 possède des éléments de réponses à l'hypoxie (HRE) (Lee et al., 2014). Une seconde étude a mis en évidence que l'expression de JMJD3 est augmentée par l'hypoxie dans des lignées cancéreuses hépatiques et rénales. Le promoteur de JMJD3 contient également des séquences HRE spécifiques au facteur HIF-2 α . Ainsi, les auteurs proposent que JMJD3 serait un nouveau facteur de réponse à l'hypoxie et peut former un complexe avec HIF-2 α afin d'activer des gènes cibles en déméthylant H3K27me3 au niveau des séquences HRE (Guo et al., 2015). Ces deux études montrent que les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α sont impliqués dans l'augmentation de l'expression de JMJD3 par l'hypoxie et confortent notre perspective d'évaluer leur rôle dans la réponse des chondrosarcomes aux traitements.

Nous avons mis en évidence que le GSK-J4 diminue la prolifération des chondrosarcomes. Dans un premier temps, il sera nécessaire de vérifier que l'action du GSK-J4 agit par JMJD3 et/ou UTX. Pour cela, nous inhiberons l'expression d'UTX ou de JMJD3, à l'aide de siRNA dirigés contre ces deux déméthylases, dans des chondrosarcomes et évaluerons la prolifération cellulaire et l'apoptose. Puis, nous étudierons l'activité déméthylases de ces deux histones. Dans un second temps, sachant que l'hypoxie favorise la progression tumorale à travers des modifications épigénétiques dont la modulation des histones à travers l'augmentation de l'expression de JMJD3, il serait pertinent d'étudier son expression et de déterminer quel isoforme de HIF est impliqué dans sa régulation, à l'aide de siRNA dirigés contre HIF-1 α ou HIF-2 α . De plus, un test d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) pourrait être réalisé sur des chondrosarcomes afin de savoir si le facteur HIF-1 et/ou le facteur HIF-2 se fixe sur le promoteur du gène JMJD3. Enfin, un test de co-immunoprécipitation pourrait également être effectué afin de savoir si JMJD3 interagit directement ou indirectement avec les facteurs HIF- α .

Enfin, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence une hétérogénéité de réponse des chondrosarcomes aux différents traitements. En effet, nous montrons qu'ils ont des réponses différentes à un traitement par le cisplatine, par le GSK-J4 ou par irradiation aux rayons X, avec des sensibilités plus ou moins différentes en fonction de la lignée et du traitement. Or, ces mêmes lignées sont toutes sensibles à un traitement par le DZNep.

Concernant les rayons X et le cisplatine, comme mentionné précédemment, leur mécanisme d'action consiste à induire des lésions à l'ADN. Ainsi, la résistance des chondrosarcomes à ces traitements peut être due à une diminution du nombre de cassures ou à une augmentation de l'expression des enzymes de réparation des lésions à l'ADN (Siddik, 2003). Pour le cisplatine, elle peut être également due à une diminution de l'accumulation du cisplatine intracellulaire et à une augmentation de son excrétion réduisant ainsi sa présence dans le noyau (Galluzzi et al., 2014; Siddik, 2003). De plus, l'analyse de l'apoptose a été menée par marquage d'Apo2.7, une protéine mitochondriale exprimée lors des phases précoces de l'apoptose et suggérant une implication de la voie intrinsèque de l'apoptose. Or, il existe une deuxième voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs membranaires de mort. Une hypothèse pourrait être que l'hypoxie en réponse à un traitement au cisplatine ou aux rayons X induirait cette seconde voie dans les lignées de chondrosarcome. Afin de valider cette hypothèse, il sera nécessaire d'étudier le clivage des caspases 8 et 10, spécifiques de la voie extrinsèque de l'apoptose, par western-blot.

Concernant le cisplatine et le GSK-J4, nous avons montré que ces deux traitements, indépendamment l'un de l'autre, induisent l'apoptose dans les lignées JJ012 et CH2879. Bien que le cisplatine soit un agent alkylant et le GSK-J4 un inhibiteur compétitif de l' α -cétoglutarate, il semblerait que ces deux agents chimiothérapeutiques pourraient agir sur des voies moléculaires ou cellulaires identiques. Un point commun entre ces deux traitements est qu'ils nécessitent de rentrer à l'intérieur des cellules pour être efficaces. Aussi, il se pourrait que le cisplatine et le GSK-J4 utilisent les mêmes transporteurs présents uniquement dans ces deux lignées.

Enfin, le DZNep est le seul traitement capable d'induire l'apoptose dans les chondrosarcomes quelque soit le modèle d'étude utilisé. Une hypothèse pourrait être que ces molécules n'ont pas la même conformation, facilitant plus ou moins l'accès aux cellules. Cette différence de réponse peut être également due au fait qu'ils n'utilisent pas les mêmes types de transporteurs. En effet, le cisplatine utilise des transporteurs de cuivre (Galluzzi et al., 2014) alors que le DZNep utilise des transporteurs de nucléosides (Hung et al., 2013). Une autre hypothèse serait que ces molécules n'ont pas les mêmes propriétés physicochimiques. En effet, le DZNep a une meilleure affinité avec l'eau et sera donc moins retenu par les molécules hydrophobes présentes dans la matrice cartilagineuse que le cisplatine et le GSK-J4, permettant ainsi une meilleure diffusion. Il semblerait donc que les propriétés physicochimiques représentent un

facteur important à prendre en compte dans le choix des potentiels agents thérapeutiques pour traiter les chondrosarcomes.

En conclusion, contrairement à ce qui est communément admis, l'hypoxie n'est pas forcément responsable de la résistance des chondrosarcomes à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Ce travail a également permis d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques en utilisant le DZNep ou le GSK-J4 contre les chondrosarcomes. Le DZNep induit l'apoptose dans ces tumeurs, par un mécanisme indépendant de la méthylation de H3K27 et de sa méthylase EZH2 mais induit des effets indésirables sur la fertilité masculine limitant son utilisation. Il semblerait agir par la voie Rho β /EGFR et des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de le confirmer. Le GSK-J4, quant à lui, ralentit la croissance cellulaire des chondrosarcomes, suggérant que cet inhibiteur pourrait être utilisé en thérapie adjuvante, notamment afin de réduire les récurrences. Enfin, cette étude confirme que l'association du cisplatine avec le DZNep potentialise ces effets sur les chondrosarcomes et que son association avec le GSK-J4 augmente son effet sur la diminution de la prolifération des chondrosarcomes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbosh, P.H., Montgomery, J.S., Starkey, J.A., Novotny, M., Zuhowski, E.G., Egorin, M.J., Moseman, A.P., Golas, A., Brannon, K.M., Balch, C., et al. (2006). Dominant-negative histone H3 lysine 27 mutant derepresses silenced tumor suppressor genes and reverses the drug-resistant phenotype in cancer cells. *Cancer Res.* 66, 5582–5591.
- Angelini, A., Guerra, G., Mavrogenis, A.F., Pala, E., Picci, P., and Ruggieri, P. (2012). Clinical outcome of central conventional chondrosarcoma. *J. Surg. Oncol.* 106, 929–937.
- Arcipowski, K.M., Martinez, C.A., and Ntziachristos, P. (2016). Histone demethylases in physiology and cancer: a tale of two enzymes, JMJD3 and UTX. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 36, 59–67.
- Asp, J., Sangiorgi, L., Inerot, S.E., Lindahl, A., Molendini, L., Benassi, M.S., and Picci, P. (2000). Changes of the p16 gene but not the p53 gene in human chondrosarcoma tissues. *Int. J. Cancer* 85, 782–786.
- Avan, A., Crea, F., Paolicchi, E., Funel, N., Galvani, E., Marquez, V.E., Honeywell, R.J., Danesi, R., Peters, G.J., and Giovannetti, E. (2012). Molecular mechanisms involved in the synergistic interaction of the EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A with gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1735–1746.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.
- Baugé, C., Bazille, C., Girard, N., Lhuissier, E., and Boumediene, K. (2014). Histone methylases as novel drug targets: developing inhibitors of EZH2. *Future Med. Chem.* 6, 1943–1965.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407–412.
- Bernard, S.A., Murphey, M.D., Flemming, D.J., and Kransdorf, M.J. (2010). Improved differentiation of benign osteochondromas from secondary chondrosarcomas with standardized measurement of cartilage cap at CT and MR imaging. *Radiology* 255, 857–865.
- Bernstein-Molho, R., Kollender, Y., Issakov, J., Bickels, J., Dadia, S., Flusser, G., Meller, I., Sagi-Eisenberg, R., and Merimsky, O. (2012). Clinical activity of mTOR inhibition in combination with cyclophosphamide in the treatment of recurrent unresectable chondrosarcomas. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 70, 855–860.
- Bindra, R.S., Schaffer, P.J., Meng, A., Woo, J., Måseide, K., Roth, M.E., Lizardi, P., Hedley, D.W., Bristow, R.G., and Glazer, P.M. (2005). Alterations in DNA repair gene expression under hypoxia: elucidating the mechanisms of hypoxia-induced genetic instability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1059, 184–195.
- Black, J.C., Van Rechem, C., and Whetstine, J.R. (2012). Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol. Cell* 48, 491–507.

- Boeuf, S., Bovée, J.V.M.G., Lehner, B., Hogendoorn, P.C.W., and Richter, W. (2010). Correlation of hypoxic signalling to histological grade and outcome in cartilage tumours. *Histopathology* 56, 641–651.
- Bovée, J.V.M.G., Hogendoorn, P.C.W., Wunder, J.S., and Alman, B.A. (2010). Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* 10, 481–488.
- Bray, M., Driscoll, J., and Huggins, J.W. (2000). Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral Res.* 45, 135–147.
- Burchfield, J.S., Li, Q., Wang, H.Y., and Wang, R.-F. (2015). JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 67, 148–157.
- Camidge, D.R. (2008). Apomab: an agonist monoclonal antibody directed against Death Receptor 5/TRAIL-Receptor 2 for use in the treatment of solid tumors. *Expert Opin. Biol. Ther.* 8, 1167–1176.
- Chan, N., Koritzinsky, M., Zhao, H., Bindra, R., Glazer, P.M., Powell, S., Belmaaza, A., Wouters, B., and Bristow, R.G. (2008). Chronic hypoxia decreases synthesis of homologous recombination proteins to offset chemoresistance and radioresistance. *Cancer Res.* 68, 605–614.
- Chase, A., and Cross, N.C.P. (2011). Aberrations of EZH2 in Cancer. *Clin. Cancer Res.* 17, 2613–2618.
- Chen, Y., and Zhu, W.-G. (2016). Biological function and regulation of histone and non-histone lysine methylation in response to DNA damage. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 48, 603–616.
- Chen, C., Zhou, H., Wei, F., Jiang, L., Liu, X., Liu, Z., and Ma, Q. (2011a). Increased levels of hypoxia-inducible factor-1 α are associated with Bcl-xL expression, tumor apoptosis, and clinical outcome in chondrosarcoma. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 29, 143–151.
- Chen, C., Ma, Q., Ma, X., Liu, Z., and Liu, X. (2011b). Association of elevated HIF-2 α levels with low Beclin 1 expression and poor prognosis in patients with chondrosarcoma. *Ann. Surg. Oncol.* 18, 2364–2372.
- Chen, J., Ding, Z., Peng, Y., Pan, F., Li, J., Zou, L., Zhang, Y., and Liang, H. (2014). HIF-1 α inhibition reverses multidrug resistance in colon cancer cells via downregulation of MDR1/P-glycoprotein. *PloS One* 9, e98882.
- Cheng, L.L., Itahana, Y., Lei, Z.D., Chia, N.-Y., Wu, Y., Yu, Y., Zhang, S.L., Thike, A.A., Pandey, A., Rozen, S., et al. (2012). TP53 Genomic Status Regulates Sensitivity of Gastric Cancer Cells to the Histone Methylation Inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep). *Clin. Cancer Res.* 18, 4201–4212.
- Chiche, J., Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 771–794.

- Cho, K.-H., Park, J.-H., Kwon, K.-B., Lee, Y.-R., So, H.-S., Lee, K.-K., Lee, S.-Y., Moon, S.-R., and Yang, S.-H. (2014). Autophagy induction by low-dose cisplatin: the role of p53 in autophagy. *Oncol. Rep.* 31, 248–254.
- Choi, J.Y., Jang, Y.S., Min, S.Y., and Song, J.Y. (2011). Overexpression of MMP-9 and HIF-1 α in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions. *J. Breast Cancer* 14, 88–95.
- Clark, J.C., Akiyama, T., Dass, C.R., and Choong, P.F. (2010). New clinically relevant, orthotopic mouse models of human chondrosarcoma with spontaneous metastasis. *Cancer Cell Int.* 10, 20.
- Conway, E., Healy, E., and Bracken, A.P. (2015). PRC2 mediated H3K27 methylations in cellular identity and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 37, 42–48.
- Crea, F., Paolicchi, E., Marquez, V.E., and Danesi, R. (2012). Polycomb genes and cancer: Time for clinical application? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 83, 184–193.
- Cui, B., Yang, Q., Guan, H., Shi, B., Hou, P., and Ji, M. (2014). PRIMA-1, a Mutant p53 Reactivator, Restores the Sensitivity of TP53 Mutant-Type Thyroid Cancer Cells to the Histone Methylation Inhibitor 3-Deazaneplanocin A. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E962–E970.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., and Yamada, K.M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294, 1708–1712.
- Dai, X., Ma, W., He, X., and Jha, R.K. (2011). Review of therapeutic strategies for osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing’s sarcoma. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 17, RA177-190.
- Ding, Z.-B., Shi, Y.-H., Zhou, J., Qiu, S.-J., Xu, Y., Dai, Z., Shi, G.-M., Wang, X.-Y., Ke, A.-W., Wu, B., et al. (2008). Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 68, 9167–9175.
- Doktorova, H., Hrabeta, J., Khalil, M.A., and Eckschlager, T. (2015). Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* 159, 166–177.
- Duval, E., Baugé, C., Andriamanalijaona, R., Bénateau, H., Leclercq, S., Dutoit, S., Poulain, L., Galéra, P., and Boumédiène, K. (2012). Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 33, 6042–6051.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457–463.
- Evans, H.L., Ayala, A.G., and Romsdahl, M.M. (1977). Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer* 40, 818–831.
- Ezponda, T., and Licht, J.D. (2014). Molecular pathways: deregulation of histone h3 lysine 27 methylation in cancer-different paths, same destination. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 5001–5008.

- Fiskus, W., Wang, Y., Sreekumar, A., Buckley, K.M., Shi, H., Jillella, A., Ustun, C., Rao, R., Fernandez, P., Chen, J., et al. (2009). Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 114, 2733–2743.
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 273–286.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., Castedo, M., and Kroemer, G. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* 5, e1257.
- Gannon, O.M., Merida de Long, L., Endo-Munoz, L., Hazar-Rethinam, M., and Saunders, N.A. (2013). Dysregulation of the repressive H3K27 trimethylation mark in head and neck squamous cell carcinoma contributes to dysregulated squamous differentiation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 428–441.
- Gelderblom, H., Hogendoorn, P.C.W., Dijkstra, S.D., van Rijswijk, C.S., Krol, A.D., Taminiau, A.H.M., and Bovée, J.V.M.G. (2008). The clinical approach towards chondrosarcoma. *The Oncologist* 13, 320–329.
- Giaccone, G., and Wang, Y. (2011). Strategies for Overcoming Resistance to EGFR Family Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* 37, 456–464.
- Gil-Benso, R., Lopez-Gines, C., López-Guerrero, J.A., Carda, C., Callaghan, R.C., Navarro, S., Ferrer, J., Pellín, A., and Llombart-Bosch, A. (2003). Establishment and characterization of a continuous human chondrosarcoma cell line, ch-2879: comparative histologic and genetic studies with its tumor of origin. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 83, 877–887.
- Girard, N., Bazille, C., Lhuissier, E., Benateau, H., Llombart-Bosch, A., Boumediene, K., and Bauge, C. (2014). 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells. *PLoS One* 9, e98176.
- Greer, E.L., and Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 13, 343–357.
- Guo, X., Tian, Z., Wang, X., Pan, S., Huang, W., Shen, Y., Gui, Y., Duan, X., and Cai, Z. (2015). Regulation of histone demethylase KDM6B by hypoxia-inducible factor-2 α . *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 47, 106–113.
- Harris, A.L. (2002). Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2, 38–47.
- Harrison, L., and Blackwell, K. (2004). Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *The Oncologist* 9 Suppl 5, 31–40.
- Hashizume, R., Andor, N., Ihara, Y., Lerner, R., Gan, H., Chen, X., Fang, D., Huang, X., Tom, M.W., Ngo, V., et al. (2014). Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat. Med.* 20, 1394–1396.

Heinemann, B., Nielsen, J.M., Hudlebusch, H.R., Lees, M.J., Larsen, D.V., Boesen, T., Labelle, M., Gerlach, L.-O., Birk, P., and Helin, K. (2014). Inhibition of demethylases by GSK-J1/J4. *Nature* 514, E1–E2.

Hinz, S., Magheli, A., Weikert, S., Schulze, W., Krause, H., Schrader, M., Miller, K., and Kempkensteffen, C. (2010). Deregulation of EZH2 expression in human spermatogenic disorders and testicular germ cell tumors. *World J. Urol.* 28, 631–635.

Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Löfstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, A., Gradin, K., et al. (2006). Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 10, 413–423.

Hu, S., Yu, L., Li, Z., Shen, Y., Wang, J., Cai, J., Xiao, L., and Wang, Z. (2010). Overexpression of EZH2 contributes to acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.* 10, 788–795.

Hung, S.W., Mody, H., Marrache, S., Bhutia, Y.D., Davis, F., Cho, J.H., Zastre, J., Dhar, S., Chu, C.K., and Govindarajan, R. (2013). Pharmacological reversal of histone methylation presensitizes pancreatic cancer cells to nucleoside drugs: in vitro optimization and novel nanoparticle delivery studies. *PLoS One* 8, e71196.

Italiano, A., Le Cesne, A., Bellera, C., Piperno-Neumann, S., Duffaud, F., Penel, N., Cassier, P., Domont, J., Takebe, N., Kind, M., et al. (2013). GDC-0449 in patients with advanced chondrosarcomas: a French Sarcoma Group/US and French National Cancer Institute Single-Arm Phase II Collaborative Study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 24, 2922–2926.

Jamil, N., Howie, S., and Salter, D.M. (2010). Therapeutic molecular targets in human chondrosarcoma. *Int. J. Exp. Pathol.* 91, 387–393.

Jankowska, A.M., Makishima, H., Tiu, R.V., Szpurka, H., Huang, Y., Traina, F., Visconte, V., Sugimoto, Y., Prince, C., O’Keefe, C., et al. (2011). Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood* 118, 3932–3941.

Jong, N.N., and McKeage, M.J. (2014). Emerging roles of metal solute carriers in cancer mechanisms and treatment. *Biopharm. Drug Dispos.* 35, 450–462.

Karakashev, S.V., and Reginato, M.J. (2015). Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy. *Cancer Manag. Res.* 7, 253–264.

Keith, B., Johnson, R.S., and Simon, M.C. (2011). HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* 12, 9–22.

Kim, B.M., Hong, Y., Lee, S., Liu, P., Lim, J.H., Lee, Y.H., Lee, T.H., Chang, K.T., and Hong, Y. (2015). Therapeutic Implications for Overcoming Radiation Resistance in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26880–26913.

Kim, D.W., Seo, S.W., Cho, S.K., Chang, S.S., Lee, H.W., Lee, S.E., Block, J.A., Hei, T.K., and Lee, F.Y. (2007). Targeting of cell survival genes using small interfering RNAs (siRNAs)

enhances radiosensitivity of Grade II chondrosarcoma cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 25, 820–828.

Kim, D.W., Kim, K.-O., Shin, M.J., Ha, J.H., Seo, S.W., Yang, J., and Lee, F.Y. (2009). siRNA-based targeting of antiapoptotic genes can reverse chemoresistance in P-glycoprotein expressing chondrosarcoma cells. *Mol. Cancer* 8, 28.

Kim, J.-H., Sharma, A., Dhar, S.S., Lee, S.-H., Gu, B., Chan, C.-H., Lin, H.-K., and Lee, M.G. (2014). UTX and MLL4 coordinately regulate transcriptional programs for cell proliferation and invasiveness in breast cancer cells. *Cancer Res.* 74, 1705–1717.

Kim, M.-J., Cho, K.-J., Ayala, A.G., and Ro, J.Y. (2011). Chondrosarcoma: with updates on molecular genetics. *Sarcoma* 2011, 405437.

Kim, W., Bird, G.H., Neff, T., Guo, G., Kerenyi, M.A., Walensky, L.D., and Orkin, S.H. (2013). Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer. *Nat. Chem. Biol.* 9, 643–650.

Koh, M.Y., and Powis, G. (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem. Sci.* 37, 364–372.

Konno, Y., Dong, P., Xiong, Y., Suzuki, F., Lu, J., Cai, M., Watari, H., Mitamura, T., Hosaka, M., Hanley, S.J.B., et al. (2014). MicroRNA-101 targets EZH2, MCL-1 and FOS to suppress proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of aggressive endometrial cancer cells. *Oncotarget* 5, 6049–6062.

Konze, K.D., Ma, A., Li, F., Barsyte-Lovejoy, D., Parton, T., Macnevin, C.J., Liu, F., Gao, C., Huang, X.-P., Kuznetsova, E., et al. (2013). An orally bioavailable chemical probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1. *ACS Chem. Biol.* 8, 1324–1334.

Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P., et al. (2003). Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 63, 1138–1143.

Kruidenier, L., Chung, C., Cheng, Z., Liddle, J., Che, K., Joberty, G., Bantscheff, M., Bountra, C., Bridges, A., Diallo, H., et al. (2012). A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* 488, 404–408.

Kubo, T., Sugita, T., Shimose, S., Matsuo, T., Arihiro, K., and Ochi, M. (2008). Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J. Bone Joint Surg. Br.* 90, 364–370.

Lee, H.-P., Lin, C.-Y., Shih, J.-S., Fong, Y.-C., Wang, S.-W., Li, T.-M., and Tang, C.-H. (2015). Adiponectin promotes VEGF-A-dependent angiogenesis in human chondrosarcoma through PI3K, Akt, mTOR, and HIF- α pathway. *Oncotarget* 6, 36746–36761.

Lee, H.-Y., Choi, K., Oh, H., Park, Y.-K., and Park, H. (2014). HIF-1-dependent induction of Jumonji domain-containing protein (JMJD) 3 under hypoxic conditions. *Mol. Cells* 37, 43–50.

Lee, S.T., Li, Z., Wu, Z., Aau, M., Guan, P., Karuturi, R.K.M., Liou, Y.C., and Yu, Q. (2011). Context-Specific Regulation of NF- κ B Target Gene Expression by EZH2 in Breast Cancers. *Mol. Cell* 43, 798–810.

- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 662–673.
- Li, Y., Zhang, W., Li, S., and Tu, C. (2016). Prognosis value of Hypoxia-inducible factor-1 α expression in patients with bone and soft tissue sarcoma: a meta-analysis. *SpringerPlus* 5, 1370.
- Li, Z., Wang, Y., Qiu, J., Li, Q., Yuan, C., Zhang, W., Wang, D., Ye, J., Jiang, H., Yang, J., et al. (2013). The polycomb group protein EZH2 is a novel therapeutic target in tongue cancer. *Oncotarget* 4, 2532–2549.
- Lim, S., Metzger, E., Schüle, R., Kirfel, J., and Buettner, R. (2010). Epigenetic regulation of cancer growth by histone demethylases. *Int. J. Cancer* 127, 1991–1998.
- Lin, C., McGough, R., Aswad, B., Block, J.A., and Terek, R. (2004). Hypoxia induces HIF-1 α and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 22, 1175–1181.
- Liu, L., Xu, Z., Zhong, L., Wang, H., Jiang, S., Long, Q., Xu, J., and Guo, J. (2016). Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes tumour cell migration and invasion via epigenetic repression of E-cadherin in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 117, 351–362.
- Lomax, M.E., Folkes, L.K., and O’Neill, P. (2013). Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clin. Oncol.* 25, 578–585.
- Losman, J.-A., and Kaelin, W.G. (2013). What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev.* 27, 836–852.
- Lu, C., Han, H.D., Mangala, L.S., Ali-Fehmi, R., Newton, C.S., Ozbun, L., Armaiz-Pena, G.N., Hu, W., Stone, R.L., Munkarah, A., et al. (2010). Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell* 18, 185–197.
- Lu, C., Ward, P.S., Kapoor, G.S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C.R., Khanin, R., Figueroa, M.E., Melnick, A., et al. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483, 474–478.
- Majer, C.R., Jin, L., Scott, M.P., Knutson, S.K., Kuntz, K.W., Keilhack, H., Smith, J.J., Moyer, M.P., Richon, V.M., Copeland, R.A., et al. (2012). A687V EZH2 is a gain-of-function mutation found in lymphoma patients. *FEBS Lett.* 586, 3448–3451.
- Mar, B., Bullinger, L., Basu, E., Schlis, K., Silverman, L., Döhner, K., and Armstrong, S. (2012). Sequencing Histone Modifying Enzymes Identifies UTX mutations in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia* 26, 1881–1883.
- Mathur, R., Sehgal, L., Havranek, O., Köhrer, S., Khashab, T., Jain, N., Burger, J.A., Neelapu, S.S., Davis, R.E., and Samaniego, F. (2017). Inhibition of demethylase KDM6B sensitizes diffuse large B-cell lymphoma to chemotherapeutic drugs. *Haematologica* 102, 373–380.
- Mazzoleni, G., Di Lorenzo, D., and Steimberg, N. (2009). Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.* 4, 13–22.
- McCabe, M.T., Graves, A.P., Ganji, G., Diaz, E., Halsey, W.S., Jiang, Y., Smitheman, K.N., Ott, H.M., Pappalardi, M.B., Allen, K.E., et al. (2012a). Mutation of A677 in histone

methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2989–2994.

McCabe, M.T., Ott, H.M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Van Aller, G.S., Liu, Y., Graves, A.P., Della Pietra, A., Diaz, E., et al. (2012b). EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492, 108–112.

Mimura, I., Tanaka, T., and Nangaku, M. (2013). Novel Therapeutic Strategy With Hypoxia-Inducible Factors via Reversible Epigenetic Regulation Mechanisms in Progressive Tubulointerstitial Fibrosis. *Semin. Nephrol.* 33, 375–382.

Miranda, T.B., Cortez, C.C., Yoo, C.B., Liang, G., Abe, M., Kelly, T.K., Marquez, V.E., and Jones, P.A. (2009). DNep Is a Global Histone Methylation Inhibitor that Reactivates Developmental Genes Not Silenced by DNA Methylation. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1579–1588.

Momparler, R.L., Idaghdour, Y., Marquez, V.E., and Momparler, L.F. (2012). Synergistic antileukemic action of a combination of inhibitors of DNA methylation and histone methylation. *Leuk. Res.* 36, 1049–1054.

Monderer, D., Luseau, A., Bellec, A., David, E., Ponsolle, S., Saiagh, S., Bercegeay, S., Piloquet, P., Denis, M.G., Lodé, L., et al. (2013). New chondrosarcoma cell lines and mouse models to study the link between chondrogenesis and chemoresistance. *Lab. Invest.* 93, 1100–1114.

Morgan, S., and Grandis, J.R. (2009). ErbB Receptors in the Biology and Pathology of the Aerodigestive Tract. *Exp. Cell Res.* 315, 572–582.

Moussavi-Harami, F., Mollano, A., Martin, J.A., Ayoob, A., Domann, F.E., Gitelis, S., and Buckwalter, J.A. (2006). Intrinsic radiation resistance in human chondrosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 379–385.

Mu, W., Starmer, J., Shibata, Y., Yee, D., and Magnuson, T. (2017). EZH1 in germ cells safeguards the function of PRC2 during spermatogenesis. *Dev. Biol.* 424, 198–207.

Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., and Azab, A.K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia Auckl. NZ* 3, 83–92.

Nakagawa, S., Sakamoto, Y., Okabe, H., Hayashi, H., Hashimoto, D., Yokoyama, N., Tokunaga, R., Sakamoto, K., Kuroki, H., Mima, K., et al. (2014). Epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A inhibits the growth of cholangiocarcinoma cells. *Oncol. Rep.* 31, 983–988.

Ntziachristos, P., Tsirigos, A., Welstead, G., Trimarchi, T., Bakogianni, S., Xu, L., Loizou, E., Holmfeldt, L., Strikoudis, A., King, B., et al. (2014). Contrasting roles for histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 514, 513–517.

Onishi, A.C., Hincker, A.M., and Lee, F.Y. (2011). Surmounting chemotherapy and radioresistance in chondrosarcoma: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Sarcoma* 2011, 381564.

van Oosterwijk, J.G., Anninga, J.K., Gelderblom, H., Cleton-Jansen, A.-M., and Bovée, J.V.M.G. (2013). Update on targets and novel treatment options for high-grade osteosarcoma and chondrosarcoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 27, 1021–1048.

van Oosterwijk, J.G., Plass, J.R.M., Meijer, D., Que, I., Karperien, M., and Bovée, J.V.M.G. (2015). An orthotopic mouse model for chondrosarcoma of bone provides an *in vivo* tool for drug testing. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 466, 101–109.

Paolicchi, E., Gemignani, F., Krstic-Demonacos, M., Dedhar, S., Mutti, L., and Landi, S. (2016). Targeting hypoxic response for cancer therapy. *Oncotarget* 7, 13464–13478.

Pedersen, M.T., and Helin, K. (2010). Histone demethylases in development and disease. *Trends Cell Biol.* 20, 662–671.

Polychronidou, G., Karavasilis, V., Pollack, S.M., Huang, P.H., Lee, A., and Jones, R.L. (2017). Novel therapeutic approaches in chondrosarcoma. *Future Oncol.* 13, 637–648.

Poon, E., Harris, A.L., and Ashcroft, M. (2009). Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Rev. Mol. Med.* 11, e26.

Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 9, 677–684.

Qu, K., Lin, T., Wei, J., Meng, F., Wang, Z., Huang, Z., Wan, Y., Song, S., Liu, S., Chang, H., et al. (2013). Cisplatin induces cell cycle arrest and senescence via upregulating P53 and P21 expression in HepG2 cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 33, 1253–1259.

Reed, M.W., Mullins, A.P., Anderson, G.L., Miller, F.N., and Wieman, T.J. (1989). The effect of photodynamic therapy on tumor oxygenation. *Surgery* 106, 94–99.

Reijnders, C.M.A., Waaijer, C.J.F., Hamilton, A., Buddingh, E.P., Dijkstra, S.P.D., Ham, J., Bakker, E., Szuhai, K., Karperien, M., Hogendoorn, P.C.W., et al. (2010). No Haploinsufficiency but Loss of Heterozygosity for EXT in Multiple Osteochondromas. *Am. J. Pathol.* 177, 1946–1957.

Roos, W.P., and Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 332, 237–248.

Rosier, R.N., O’Keefe, R.J., Teot, L.A., Fox, E.J., Nester, T.A., Puzas, J.E., Reynolds, P.R., and Hicks, D.G. (1997). P-glycoprotein expression in cartilaginous tumors. *J. Surg. Oncol.* 65, 95–105.

Salminen, A., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2016). Hypoxia-Inducible Histone Lysine Demethylases: Impact on the Aging Process and Age-Related Diseases. *Aging Dis.* 7, 180–200.

Samuel, A.M., Costa, J., and Lindskog, D.M. (2014). Genetic alterations in chondrosarcomas - keys to targeted therapies? *Cell. Oncol. Dordr.* 37, 95–105.

Schrage, Y.M., Briaire-de Bruijn, I.H., de Miranda, N.F.C.C., van Oosterwijk, J., Taminiau, A.H.M., van Wezel, T., Hogendoorn, P.C.W., and Bovée, J.V.M.G. (2009). Kinome profiling of chondrosarcoma reveals SRC-pathway activity and dasatinib as option for treatment. *Cancer Res.* 69, 6216–6222.

- Selvendiran, K., Bratasz, A., Kuppusamy, M.L., Tazi, M.F., Rivera, B.K., and Kuppusamy, P. (2009). Hypoxia induces chemoresistance in ovarian cancer cells by activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Int. J. Cancer* 125, 2198–2204.
- Semenza, G.L. (2000). Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 71–103.
- Semenza, G.L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J. Clin. Invest.* 118, 3835–3837.
- Shannon, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., Condrón, C.M., and Toomey, D. (2003). Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat. Rev.* 29, 297–307.
- Shen, D.-W., Pouliot, L.M., Hall, M.D., and Gottesman, M.M. (2012). Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol. Rev.* 64, 706–721.
- Shi, B., Liang, J., Yang, X., Wang, Y., Zhao, Y., Wu, H., Sun, L., Zhang, Y., Chen, Y., Li, R., et al. (2007). Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5105–5119.
- Shmakova, A., Batie, M., Druker, J., and Rocha, S. (2014). Chromatin and oxygen sensing in the context of JmjC histone demethylases. *Biochem. J.* 462, 385–395.
- Siddik, Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265–7279.
- Song, J., Zhu, J., Zhao, Q., and Tian, B. (2015). Gefitinib causes growth arrest and inhibition of metastasis in human chondrosarcoma cells. *J. BUON Off. J. Balk. Union Oncol.* 20, 894–901.
- Song, Y., Zhang, K., Liu, D., Guo, Y., Wang, D., Cui, M., Li, G., Sun, Y., Shen, J., Li, X., et al. (2014). Inhibition of EGFR-induced glucose metabolism sensitizes chondrosarcoma cells to cisplatin. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 35, 7017–7024.
- Stapleton, S., Jaffray, D., and Milosevic, M. (2017). Radiation effects on the tumor microenvironment: Implications for nanomedicine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 109, 119–130.
- Subbiah, V., Brown, R.E., Buryanek, J., Trent, J., Ashkenazi, A., Herbst, R., and Kurzrock, R. (2012). Targeting the Apoptotic Pathway in Chondrosarcoma Using Recombinant Human Apo2L/TRAIL (dulcanermin), a Dual Pro-apoptotic Receptor (DR4/DR5) Agonist. *Mol. Cancer Ther.* 11, 2541–2546.
- Sun, X., Wei, L., Chen, Q., and Terek, R.M. (2010). CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol. Cancer* 9, 17.
- Sun, X., Charbonneau, C., Wei, L., Yang, W., Chen, Q., and Terek, R.M. (2013). CXCR4-targeted Therapy Inhibits VEGF Expression and Chondrosarcoma Angiogenesis and Metastasis. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1163–1170.

- Sun, X., Wei, L., Chen, Q., and Terek, R.M. (2015a). MicroRNA Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Chondrosarcoma Cells. *Clin. Orthop.* 473, 907–913.
- Sun, X., Charbonneau, C., Wei, L., Chen, Q., and Terek, R.M. (2015b). miR-181a Targets RGS16 to Promote Chondrosarcoma Growth, Angiogenesis, and Metastasis. *Mol. Cancer Res. MCR* 13, 1347–1357.
- Sun, Y., Guan, Z., Liang, L., Cheng, Y., Zhou, J., Li, J., and Xu, Y. (2016). HIF-1 α /MDR1 pathway confers chemoresistance to cisplatin in bladder cancer. *Oncol. Rep.* 35, 1549–1556.
- Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P.L., Karuturi, R.K.M., Tan, P.B.O., Liu, E.T., and Yu, Q. (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* 21, 1050–1063.
- Tan, J., Yan, Y., Wang, X., Jiang, Y., and Xu, H.E. (2014). EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 35, 161–174.
- Tang, J., Guo, F., Du, Y., Liu, X., Qin, Q., Liu, X., Yin, T., Jiang, L., and Wang, Y. (2015). Continuous exposure of non-small cell lung cancer cells with wild-type EGFR to an inhibitor of EGFR tyrosine kinase induces chemoresistance by activating STAT3. *Int. J. Oncol.* 46, 2083–2095.
- Tarpey, P.S., Behjati, S., Cooke, S.L., Van Loo, P., Wedge, D.C., Pillay, N., Marshall, J., O’Meara, S., Davies, H., Nik-Zainal, S., et al. (2013). Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma. *Nat. Genet.* 45, 923–926.
- Terek, R.M., Schwartz, G.K., Devaney, K., Glantz, L., Mak, S., Healey, J.H., and Albino, A.P. (1998). Chemotherapy and P-glycoprotein expression in chondrosarcoma. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 16, 585–590.
- Thornton, K.A., Chen, A.R., Trucco, M.M., Shah, P., Wilky, B.A., Gul, N., Carrera-Haro, M.A., Ferreira, M.F., Shafique, U., Powell, J.D., et al. (2013). A Dose Finding Study of Temsirolimus and Liposomal Doxorubicin for Patients with Recurrent and Refractory Bone and Soft Tissue Sarcoma. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 133.
- Tubiana, M., Averbek, D., Bourguignon, M., Bourhis, J., Cassiman, J.J., Cosset, J.M., Favaudon, V., Gardès-Albert, M., Girinski, T., Gourmelon, P., et al. (2008). Radiobiologie, radiothérapie et radioprotection, Bases fondamentales. Hermann/Médecine.
- Uchida, T., Rossignol, F., Matthay, M.A., Mounier, R., Couette, S., Clottes, E., and Clerici, C. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α . *J. Biol. Chem.* 279, 14871–14878.
- Unland, R., Borchardt, C., Clemens, D., Kool, M., Dirksen, U., and Frühwald, M.C. (2015). Analysis of the antiproliferative effects of 3-deazaneoplanocin A in combination with standard anticancer agents in rhabdoid tumor cell lines. *Anticancer. Drugs* 26, 301–311.
- Vella, S., Gnani, D., Crudele, A., Ceccarelli, S., De Stefanis, C., Gaspari, S., Nobili, V., Locatelli, F., Marquez, V.E., Rota, R., et al. (2013). EZH2 down-regulation exacerbates lipid

accumulation and inflammation in in vitro and in vivo NAFLD. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 24154–24168.

Wigerup, C., Pählman, S., and Bexell, D. (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol. Ther.* 164, 152–169.

Xie, J., Li, D.-W., Chen, X.-W., Wang, F., and Dong, P. (2013). Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and MDR1/P-glycoprotein in laryngeal carcinoma tissue and hypoxic Hep-2 cells. *Oncol. Lett.* 6, 232–238.

Xie, Z., Bi, C., Cheong, L.L., Liu, S.C., Huang, G., Zhou, J., Yu, Q., Chen, C.-S., and Chng, W.J. (2011). Determinants of Sensitivity to DZNep Induced Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE* 6.

Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.-H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.-T., et al. (2011). Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell* 19, 17–30.

Xu, Y., Lin, Z., Zhao, N., Zhou, L., Liu, F., Cichacz, Z., Zhang, L., Zhan, Q., and Zhao, X. (2014). Receptor interactive protein kinase 3 promotes Cisplatin-triggered necrosis in apoptosis-resistant esophageal squamous cell carcinoma cells. *PloS One* 9, e100127.

Yang, J., Ledaki, I., Turley, H., Gatter, K.C., Montero, J.-C.M., Li, J.-L., and Harris, A.L. (2009). Role of hypoxia-inducible factors in epigenetic regulation via histone demethylases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1177, 185–197.

Yonezawa, A., Masuda, S., Yokoo, S., Katsura, T., and Inui, K. (2006). Cisplatin and Oxaliplatin, but Not Carboplatin and Nedaplatin, Are Substrates for Human Organic Cation Transporters (SLC22A1–3 and Multidrug and Toxin Extrusion Family). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 879–886.

Yoo, K.H., and Hennighausen, L. (2012). EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 59–65.

Zhu, Z., Wang, C.-P., Zhang, Y.-F., and Nie, L. (2014). MicroRNA-100 resensitizes resistant chondrosarcoma cells to cisplatin through direct targeting of mTOR. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 15, 917–923.

ANNEXES



3-Deazaneplanocin A (DZNep), an Inhibitor of the Histone Methyltransferase EZH2, Induces Apoptosis and Reduces Cell Migration in Chondrosarcoma Cells

Nicolas Girard^{1,2}, Céline Bazille^{1,2,3}, Eva Lhuissier^{1,2}, Hervé Benateau^{1,2,4}, Antonio Llombart-Bosch⁵, Karim Boumediene^{1,2}, Catherine Bauge^{1,2*}

1 Normandie Univ, Caen, France, **2** UNICAEN, EA4652 MILPAT, Caen, France, **3** Service d'Anatomie Pathologique, CHU, Caen, France, **4** Service de Chirurgie Maxillo-faciale, CHU, Caen, France, **5** Pathology Department, University of Valencia, Valencia, Spain

Abstract

Objective: Growing evidences indicate that the histone methyltransferase EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) may be an appropriate therapeutic target in some tumors. Indeed, a high expression of EZH2 is correlated with poor prognosis and metastasis in many cancers. In addition, 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an S-adenosyl-L homocysteine hydrolase inhibitor which induces EZH2 protein depletion, leads to cell death in several cancers and tumors. The aim of this study was to determine whether an epigenetic therapy targeting EZH2 with DZNep may be also efficient to treat chondrosarcomas.

Methods: EZH2 expression was determined by immunohistochemistry and western-blot. Chondrosarcoma cell line CH2879 was cultured in the presence of DZNep, and its growth and survival were evaluated by counting adherent cells periodically. Apoptosis was assayed by cell cycle analysis, Apo2.7 expression using flow cytometry, and by PARP cleavage using western-blot. Cell migration was assessed by wound healing assay.

Results: Chondrosarcomas (at least with high grade) highly express EZH2, at contrary to enchondromas or chondrocytes. In vitro, DZNep inhibits EZH2 protein expression, and subsequently reduces the trimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27me3). Interestingly, DZNep induces cell death of chondrosarcoma cell lines by apoptosis, while it slightly reduces growth of normal chondrocytes. In addition, DZNep reduces cell migration.

Conclusion: These results indicate that an epigenetic therapy that pharmacologically targets EZH2 via DZNep may constitute a novel approach to treat chondrosarcomas.

Citation: Girard N, Bazille C, Lhuissier E, Benateau H, Llombart-Bosch A, et al. (2014) 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an Inhibitor of the Histone Methyltransferase EZH2, Induces Apoptosis and Reduces Cell Migration in Chondrosarcoma Cells. PLoS ONE 9(5): e98176. doi:10.1371/journal.pone.0098176

Editor: Marta M. Alonso, University Hospital of Navarra, Spain

Received: February 18, 2014; **Accepted:** April 29, 2014; **Published:** May 22, 2014

Copyright: © 2014 Girard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funding by Cancéropole Nord-Ouest, Conseil Régional Basse-Normandie and La Ligue contre le cancer. NG is recipient of a fellowship from Conseil Régional de Basse-Normandie. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: catherine.bauge@unicaen.fr

Introduction

Polycomb group proteins (PcGs) can remodel chromatin by influencing the degree of compaction, leading to epigenetic gene silencing. In particular, EZH2, the catalytic subunit of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), induces histone methyltransferase activity primarily by trimethylating histone H3 at lysine 27 (H3K27me3), hence mediating gene silencing. PcGs are crucial in the chromatin control of stem cell self-renewal and differentiation [1–7]. They also play a crucial role in malignant progression and are implicated in cancer metastasis [8]. In particular, the methylase EZH2 functions as an oncogene in different human cancers mainly through epigenetic silencing of tumor and metastasis suppressor genes, including E-cadherin [9], RUNX3 [10], SLIT2 [11], DAB2IP [12], FBXO32 [13], and KLF2 [14].

Recent articles showed that EZH2 knockdown results in a significant decrease in cellular proliferation and invasiveness [15–18], leading to emerge the concept of epigenetic therapy targeting

PcG machinery to cure various tumors, and the development of drugs inhibiting the trimethylation of the lysine 27 on histone 3 (H3K27me3) [19–23].

Recently, it has been shown that 3-deazaneplanocin A (DZNep), a carbocyclic analog of adenosine, depletes cellular levels of the PRC2 components, and notably EZH2, and inhibits H3K27me3 [13]. Interestingly, similarly to EZH2 knockdown, DZNep reverts epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and prevents tumor progression, making it a highly promising antimetastatic agent [24]. While the mechanisms and effects of DZNep have been studied in numerous solid tumors and leukemia [13,25–33], less is known about the potential of this compound for sarcomas. In particular its impact on chondrosarcoma, a radio- and chemo-resistant tumor, has never been studied.

Here, we show that high grade chondrosarcomas express EZH2 protein, and that DZNep reduces its expression and subsequently H3K27me3. Interestingly, DZNep treatment induces apoptosis of

chondrosarcoma cell lines whereas it has a weak effect on normal chondrocyte, and reduces cell migration, suggesting that targeting EZH2, for instance using DZNep, may be an innovative therapeutic strategy to treat chondrosarcomas.

Material and Methods

Reagents

DZNep was provided by R&D Biosystems (Lille, France) and resuspended in phosphate buffered saline (PBS). Inhibitors and propidium iodide were purchased from Sigma and dissolved in PBS. Oligonucleotides were supplied by Eurogentec (Angers, France).

Human material

This study was approved by the local ethic committee (Comité de protection des personnes Nord Ouest III). Tumoral and normal cartilage was collected from surgical departments of Caen University hospital. All donors signed agreement forms before the surgery, according to local legislations.

Immunohistochemistry

Multiple specimens of chondrosarcomas ($n = 7$) or enchondromas ($n = 8$) were fixed, routinely processed and embedded in paraffin. H&E-stained sections from original block were used to select a representative tumor area. 4- μm sections of non-decalcified chondrosarcomas were prepared from paraffin-embedded tumor blocks and placed on superfrost plus slides. After antigen retrieval with pH 6.0 citrate buffer, immunohistochemistry was performed using an automated immunohistochemical staining processor (Autostainer plus, Dako, Glostrup, Denmark). After incubation with primary antibody EZH2 (Cell signaling, 1:100), detection was performed using an indirect biotin avidin system, LSABTM2 detection kit (Dako) according to the manufacturer's instructions.

Cell culture

SW1353 (from ATCC) and CH2879 chondrosarcoma cell line [34] were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), or Roswell Park Memorial Institute 1640's medium (RPMI 1640) (Lonza AG, Verviers, Belgium), respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Lonza AG), 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of fungizone and 10 μM of ciprofloxacin, and then incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were passaged twice a week. Cells were seeded for experiments at 5400 cells/cm² unless indicated otherwise.

The normal cartilage was obtained from biopsy of nasal cartilage. Chondrocytes were released by digestion with XIV Pronase (2 mg/ml for 30 minutes, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and type I collagenase (2 mg/ml for 15 hours, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The cells were incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% FBS, 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone and 10 μM of ciprofloxacin, and then incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Protein extraction and Western blot

Cells were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) to remove residual FBS and scraped into RIPA lysis buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; IGEPAL 1%; NaCl 150 mM; EGTA 1 mM; NaF 1 mM) supplemented with phosphatase (NA₃VO₄ 10 $\mu\text{L}/\text{ml}$) and protease inhibitors (leupeptin 1 $\mu\text{L}/\text{ml}$, aprotinin 1 $\mu\text{L}/\text{ml}$, pepstatin 1 $\mu\text{L}/\text{ml}$ and phenylmethylsulfonyl fluoride 4 $\mu\text{L}/\text{ml}$). Proteins (20 to 50 μg) were resolved by SDS-PAGE and transferred to

polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad). The membranes were incubated with 10% nonfat milk or 1% bovin serum albumin (BSA) 1 hour at room temperature, incubated with primary antibodies overnight at 4°C at the appropriated dilutions (EZH2, 1:1000 dilution, Cell signaling, catalog no. 5246; PARP, 1:1000 dilution, Cell signaling, catalog no. 9542; H3K27me3, 1:1000 dilution, Abcam, catalog no. ab6002; actin, 1:200 dilution, Santa cruz biotechnology, catalog no. sc-8432; H3, 1:2000 dilution, Abcam, catalog no. ab1791). The membranes were washed with TBS-T and probed with a corresponding secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase in TBS-T at room temperature (goat anti-mouse IgG-HRP and goat anti-rabbit IgG-HRP, 1:10000, Santa cruz biotechnology). Signals were revealed with Western Lightning[®] Plus-ECL (Perkin Elmer) and exposed to X-ray film (Kodak). Actin or histone H3 were used to verify that similar amounts of protein were loaded in all lanes.

RNA isolation and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted with Trizol reagent according to the manufacturer's condition (Invitrogen). Samples (2 μg) were treated with DNase I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and the reverse transcriptase was effected with oligo dT and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. Complementary DNA was diluted (1:100) and stocked at -20°C pending for PCR. This product (5 μL) was mixed with appropriated reverse and forward primers and SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) in 15 μL volume final. RT-PCR was run in an ABI Prism 7000 sequence detection system apparatus. Relative expression was calculated according to the 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} method [35].

Cell growth experiment

Cells were seeded at 750 cells/cm² and treated with DZNep (1 μM) for 14 days. The medium was changed twice during the treatment. Adherent cells were counted each indicated time (4, 7, 9, 14 days).

Flow cytometry

Cells were treated with DZNep (1 μM) for 7 days. Then, cells were washed with PBS, treated with trypsin-EDTA (Lonza AG, Verviers, Belgium) and fixed with 70% ethanol at -20°C and conserved at 4°C. For analysis, cells were washed twice with PBS and resuspended in 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide (IP) (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) to label the DNA. DNA content was measured using Gallios (Beckman Coulter, Villepinte, France) on the technical platform of SFR 146 (Structure Federative de Recherche 146, Caen, France). Results were analyzed with Kaluza software.

To study apoptosis, living cells were stained with Apo 2.7-PE antibody according to the manufacturer's condition (Beckman Coulter, Villepinte, France). The expression of Apo 2.7 was detected using Gallios on the technical platform of the SFR 146.

Wound healing assay

Cells were seeded at 40000 cells/cm², treated with DZNep (1 μM) for 5 days. At day 4, a straight scratch was made with a 200 μl pipette tip and the wound was photographed under the microscope. After 24 h, cells were stained with crystal violet 0.1% for 10 minutes and photographed under the microscope. The area of the remaining scratch was calculated using Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Statistical analysis

For in vitro experiments, three different experiments were performed. The values are means \pm SEM. Statistical significance was calculated with Student's t test.

Results

EZH2 is expressed in chondrosarcomas

First, we investigated whether EZH2 is expressed in chondrosarcomas. Immunohistochemistry analysis from patient biopsies showed that EZH2 is expressed in nucleus of high grade chondrosarcomas (for 6/7 samples). Interestingly, we could not detect EZH2 in all enchondromas tested (n=8) (figure 1A). Furthermore, by Western-Blot, we found that EZH2 expression was higher in chondrosarcoma cells than normal chondrocytes (figure 1B). Since EZH2 is highly expressed in chondrosarcomas, we hypothesized that these tumors may be sensitive to EZH2 inhibitors, such as DZNep.

DZNep inhibits EZH2 and reduces H3K27me3

As expected, DZNep treatment reduced EZH2 protein level, and subsequently H3K27me3 level in two chondrosarcoma cell lines, CH2879 and SW1353 (figure 2A and B). To investigate whether decreased levels of EZH2 protein resulted from transcriptional regulation, we performed quantitative real time-PCR analysis. DZNep treatment had no effect on EZH2 expression at mRNA level (figure 2C).

DZNep selectively induces cytotoxicity in cancerous but not normal cartilage cells

Furthermore, we evaluated the effect of DZNep treatment on growth of chondrosarcoma cells and chondrocytes. DZNep induced death of chondrosarcoma cells with a delay (figure 3A), whereas it slightly decreased chondrocyte growth (figure 3B). These results confirm the potential therapeutic of DZNep on chondrosarcoma.

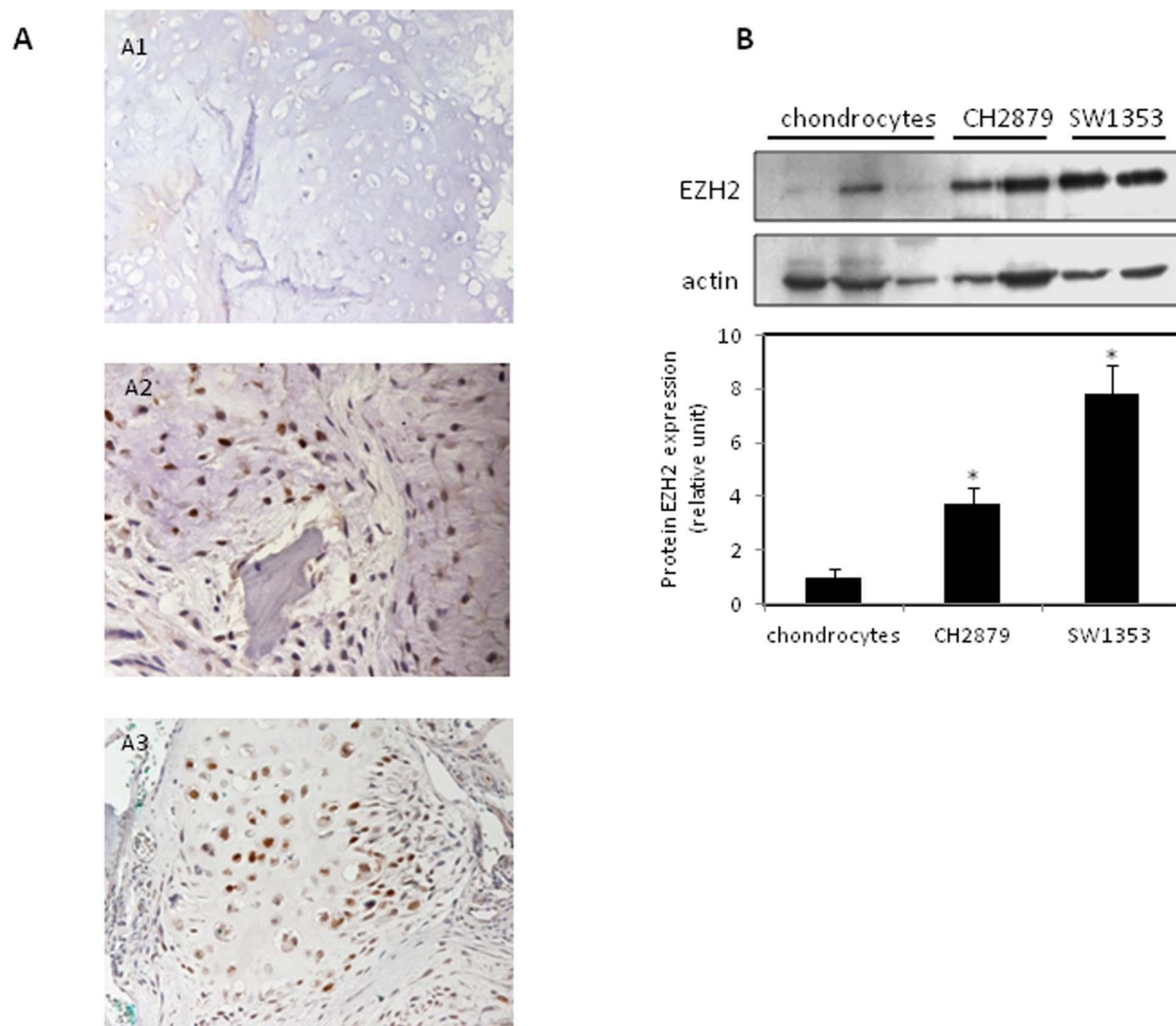


Figure 1. EZH2 is expressed in chondrosarcoma. A. EZH2 expression was analyzed by immunostaining in enchondromas (n=8) (A1), or grade 2 and 3 chondrosarcomas (n=7; 6 samples were positive for EZH2 staining) (A2 and A3 respectively). B. EZH2 expression was analyzed in two batches of both SW1353 and CH2879 chondrosarcoma cell lines and normal chondrocytes by Western blot. Actin was used to compare protein loading. doi:10.1371/journal.pone.0098176.g001

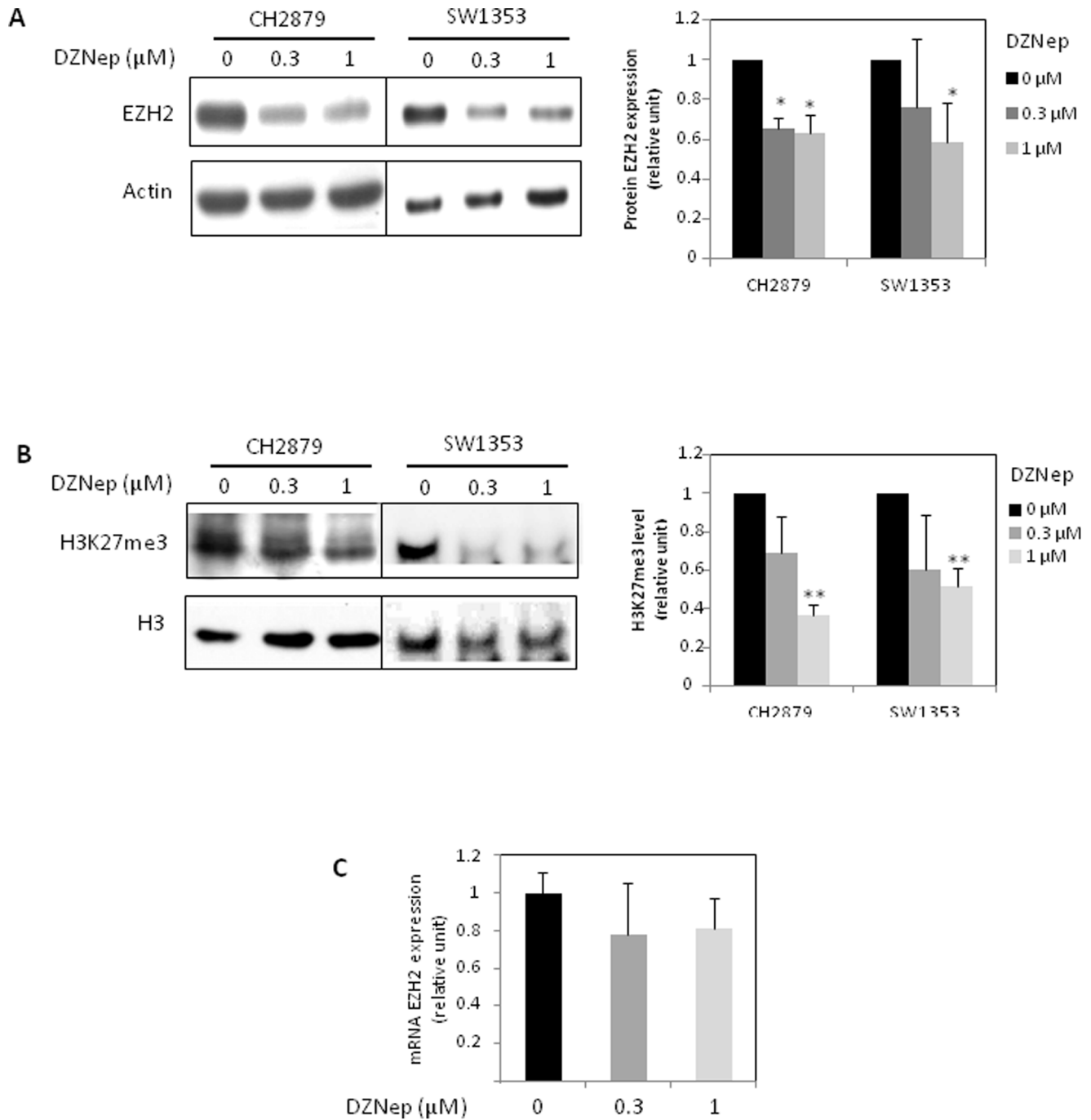


Figure 2. DZNep reduces EZH2 protein expression and H3K27me3 and but not mRNA. SW1353 and CH2879 cells were treated with DZNep (1 μM) for 72 h. A) EZH2 protein expression was analyzed by Western blot. Histograms represent the quantification of three independent experiments after normalization with actin. B) H3K27me3 was also analyzed by Western blot. H3 was used to compare protein loading. Histograms represent the quantification of three independent experiments after normalization with H3. C) EZH2 mRNA expression was analyzed by RT-PCR from CH2879 treated with DZNep for 72 h. Data were expressed as means ± SEM. doi:10.1371/journal.pone.0098176.g002

DZNep induces apoptosis in chondrosarcomas

We then examined whether DZNep affects cell cycle. DZNep treatment increased sub-G1 peak, without visible arrest in cell cycle (figure 4A). DZNep also induced PARP cleavage and Apo 2.7 protein expression (figures 4 B and C) demonstrating an apoptotic death of chondrosarcomas.

DZNep reduces cell migration

Finally, the effect of DZNep on migration was also examined by wound healing assay (figure 5). We found that compared to control, DZNep reduced the migration of chondrosarcomas.

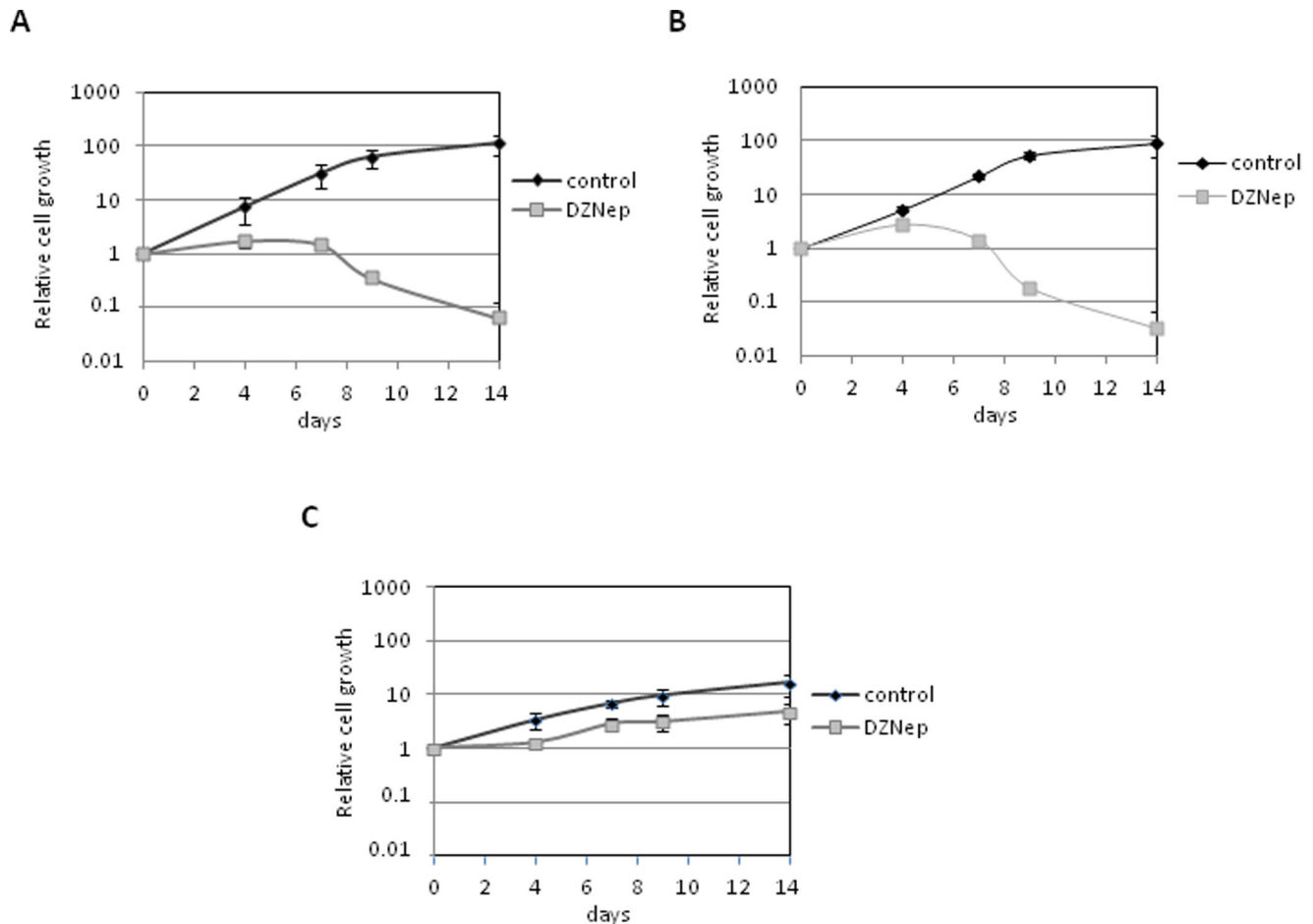


Figure 3. DZNep induces death in chondrosarcoma but not chondrocytes. CH2878 cells (A), SW1353 (B), or chondrocytes (C) were treated with DZNep (1 μ M) for 14 days. Treatment was renewed at each medium changes (at days 4, 7 and 10), and adherent cells regularly counted. The results of three independent experiments are shown. Data are expressed as means \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0098176.g003

Discussion

With the advent of systemic chemotherapy in the management of mesenchymal malignancies such as osteosarcoma and Ewing's sarcoma, there has been an increase in the long-term survival of patients. In contrast, chondrosarcomas continue to have a poor prognosis owing to the absence of an effective therapy [36–38]. Identifying new drugs that enables to reduce chondrosarcoma growth may improve survival of patients. Here, we identified, 3-Deazaneplanocin A (DZNep), a small molecule EZH2 inhibitor [13,39], as a putative treatment of chondrosarcomas. Indeed, we show that DZNep treatment significantly reduces the EZH2 protein and H3K27 trimethylation level, and induces chondrosarcoma death by apoptosis while it decreases their migration ability.

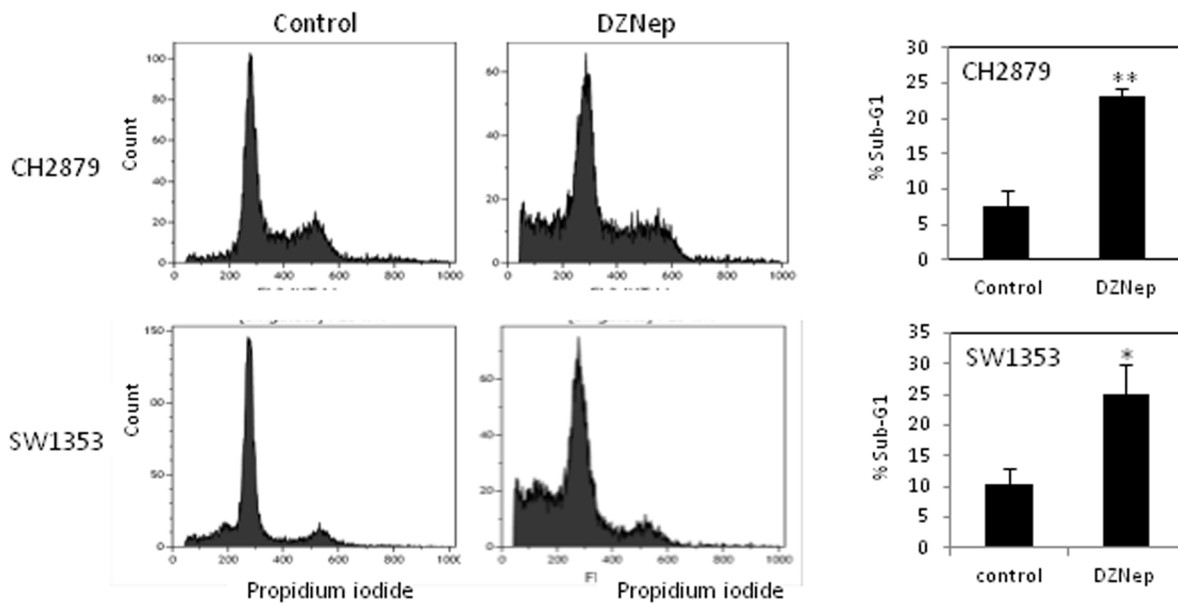
First, we showed for the first time, that human chondrosarcomas, but not enchondromas, express EZH2 protein. In addition, EZH2 level was more elevated in a grade II and III chondrosarcoma cell lines, SW1353 and CH2879, than in chondrocytes. This agrees with observations in other tumors showing that EZH2 is overexpressed in cancers, including melanoma, lymphoma, and breast and prostate cancers [13,27,33,40]. This high expression of EZH2 is related to poor prognostic in these cancers and tumors [8,41,42]. The potential use of EZH2 expression for improving diagnostic of chondrosarcomas and the correlation between its

expression and tumor grade or prognostic for patients is still in process.

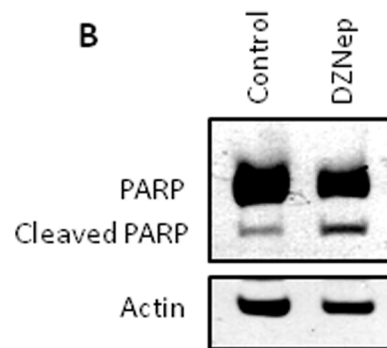
Furthermore, we show for the first time that DZNep is efficient to reduce chondrosarcoma growth, survival and migration, *in vitro*. Numerous studies suggest that DZNep induces death in tumoral cells though EZH2 downregulation and H3K27me3 reduction [13,30,31,43]. In our chondrosarcoma model, we also found that DZNep reduces EZH2 at protein level (but not at mRNA level) and subsequently decreases H3K27me3. This discrepancy between mRNA and protein levels has ever been observed with other tumoral cells [13,44], and can be explained by the mechanism by which DZNep acts on EZH2. Indeed, DZNep acts indirectly by inhibiting an S-adenosylhomocysteine (SAH) hydrolase, which induce an accumulation of SAH, leading to the degradation of EZH2 protein [39].

However, at this point, we cannot ascertain that chondrosarcoma death induced by DZNep is directly due to EZH2 inhibition. Indeed, DZNep is an AdoHcy hydrolase inhibitor and is able to inhibit methylation of another repressive histone marks, such as H4-K20 methylation [13]. More recently, it has been reported, in MCF7 cells, that DZNep also causes a global decrease in most histone modifications, except for H3K9me3 and H3K37me3, implicating that DZNep is effective in decreasing histone modifications with both repressive and active chromatin markers,

A



B



C

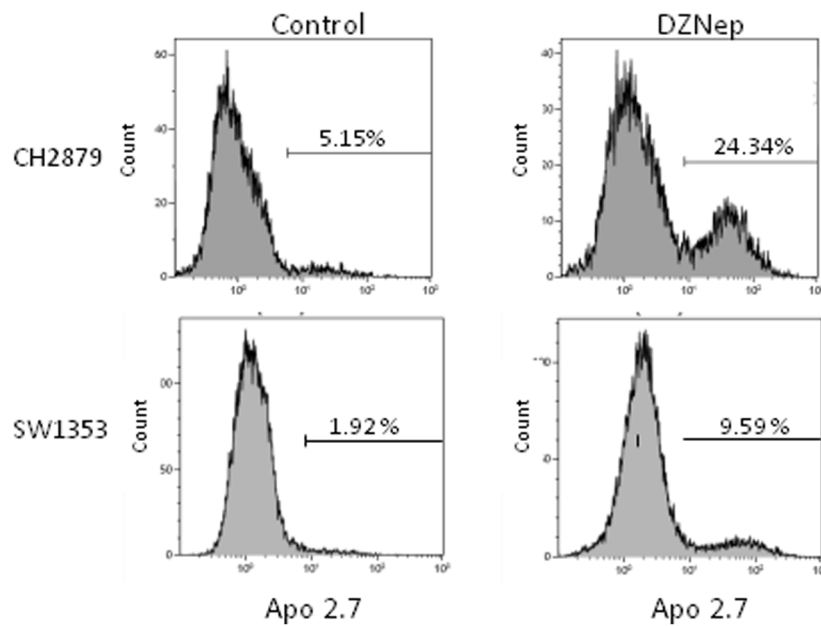


Figure 4. DZNep induces apoptosis in SW1353 and CH2879 chondrosarcoma cell lines. Cells were treated with DZNep (1 μ M) for 7 days (A and C) or 5 days (B). A) At day 7, cells were fixed and cell cycle determined by flow cytometry. Histograms represent the sub-G1 phase percentage from three independent experiments. B) At day 5, proteins were extracted and PARP protein expression was analyzed by Western blot. C) At day 7, cells were stained with Apo 2.7 antibody coupled to phycoerythrin and analyzed by flow cytometry. doi:10.1371/journal.pone.0098176.g004

in a non-selective manner [39,45]. Therefore, the molecular mechanisms of DZNep might be more complex than our current knowledge base, which associates the downregulation of EZH2 with the ability of DZNep to induce tumor cell death.

Contrary to the majority of tumoral cells, we found that DZNep exerts cytotoxicity in chondrosarcomas with a delay. This was also observed in pancreatic tumors [46]. However, similarly to a number of tumor cells, we found that DZNep induced apoptosis in chondrosarcomas, suggesting that the mechanism of death is shared with all tumors cells, whereas here the effect was delayed. We hypothesize that this delay may be due to a slower proliferation kinetic of chondrosarcomas compared to other tumoral cells. Interestingly, normal chondrocytes only show a slight decrease of their growth upon DZNep treatment. Similarly, other report also show that DZNep does not induce apoptosis in normal cells, making it a promising drug candidate for anti-cancer treatment, in particular to treat radioresistant and chemoresistant tumors such as chondrosarcomas.

In conclusion, in this study, we describe the effect of an AdoHcy hydrolase inhibitor, DZNep, on EZH2 expression and subsequent H3K27me3 in chondrosarcomas, as well as its ability to preferentially induce death by apoptosis in tumoral cartilage cells than normal chondrocytes.

Acknowledgments

We thank Marie-Christine ENOS and Céline QUESNELLE (EA4652 MILPAT - Caen) for administrative and technical assistance. We also thank Marilyne GUILLEMAIN (SFR 146 ICORE) for her help for flow cytometry.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: C. Bazille C. Bauge NG KB. Performed the experiments: C. Bazille C. Bauge NG EL. Analyzed the data: C. Bazille C. Bauge NG EL HB. Contributed reagents/materials/

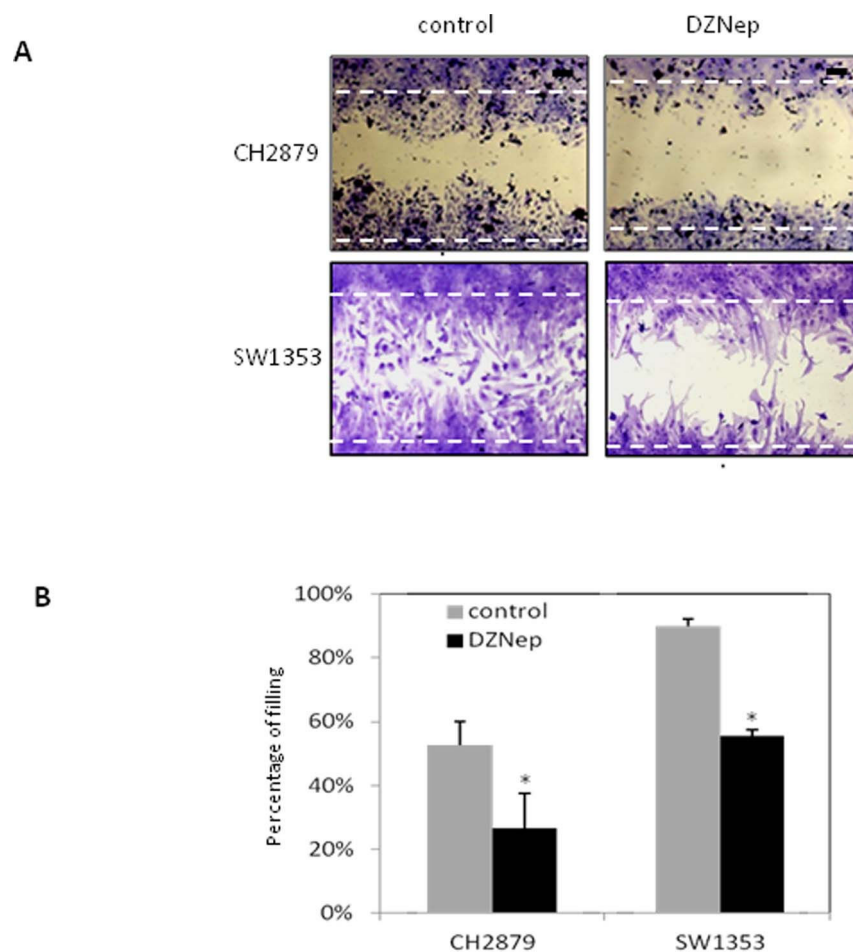


Figure 5. DZNep reduces SW1353 and CH2879 chondrosarcoma migration. Cells were pretreated 4 days with DZNep (1 μ M) and a straight scratch was made in individual 6-wells dishes with a 200 μ L pipette tip. A) Microscopic observations were recorded 24 hours after scratching the cell surface. Dotted lines showed the initial mark of the scratch. B) Graph represents the percentage of filling 24 hours after the wound. Data were expressed as means \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0098176.g005

analysis tools: C. Bazille C. Bauge KB HB ALB. Wrote the paper: C. Bauge NG KB.

References

- Aloia L, Stefano BD, Croce LD (2013) Polycomb complexes in stem cells and embryonic. *Development* 140: 2525–2534. doi:10.1242/dev.091553
- Pereira CF, Piccolo FM, Tsubouchi T, Sauer S, Ryan NK, et al. (2010) ESCs require PRC2 to direct the successful reprogramming of differentiated cells toward pluripotency. *Cell Stem Cell* 6: 547–556. doi:10.1016/j.stem.2010.04.013
- Ding X, Wang X, Sontag S, Qin J, Wanek P, et al. (2013) The Polycomb Protein Ezh2 Impacts on iPS Cell Generation. *Stem Cells Dev*: 131210220315000. doi:10.1089/scd.2013.0267
- Fragola G, Germain P-L, Laise P, Cuomo A, Blasimme A, et al. (2013) Cell reprogramming requires silencing of a core subset of polycomb targets. *PLoS Genet* 9: e1003292. doi:10.1371/journal.pgen.1003292
- Chen Y-H, Hung M-C, Li L-Y (2012) EZH2: a pivotal regulator in controlling cell differentiation. *Am J Transl Res* 4: 364–375.
- Juan AH, Derfoul A, Feng X, Ryall JG, Dell'Orso S, et al. (2011) Polycomb EZH2 controls self-renewal and safeguards the transcriptional identity of skeletal muscle stem cells. *Genes Dev* 25: 789–794. doi:10.1101/gad.2027911
- Wang L, Jin Q, Lee J-E, Su I, Ge K (2010) Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7317–7322. doi:10.1073/pnas.1000031107
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, et al. (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419: 624–629. doi:10.1038/nature01075
- Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, Kim JH, Mani R-S, et al. (2008) Repression of E-cadherin by the Polycomb Group Protein EZH2 in Cancer. *Oncogene* 27: 7274–7284. doi:10.1038/ncr.2008.333
- Fujii S, Ito K, Ito Y, Ochiai A (2008) Enhancer of Zeste Homologue 2 (EZH2) Down-regulates RUNX3 by Increasing Histone H3 Methylation. *J Biol Chem* 283: 17324–17332. doi:10.1074/jbc.M800224200
- Yu J, Cao Q, Yu J, Wu L, Dallol A, et al. (2010) The neuronal repellent SLIT2 is a target for repression by EZH2 in prostate cancer. *Oncogene* 29: 5370–5380. doi:10.1038/ncr.2010.269
- Min J, Zaslavsky A, Fedele G, McLaughlin SK, Reczek EE, et al. (2010) An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and NF- κ B. *Nat Med* 16: 286–294. doi:10.1038/nm.2100
- Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, et al. (2007) Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 21: 1050–1063. doi:10.1101/gad.1524107
- Taniguchi H, Jacinto FV, Villanueva A, Fernandez AF, Yamamoto H, et al. (2012) Silencing of Kruppel-like factor 2 by the histone methyltransferase EZH2 in human cancer. *Oncogene* 31: 1988–1994. doi:10.1038/ncr.2011.387
- Chen Y, Xie D, Yin Li W, Man Cheung C, Yao H, et al. (2010) RNAi targeting EZH2 inhibits tumor growth and liver metastasis of pancreatic cancer in vivo. *Cancer Lett* 297: 109–116. doi:10.1016/j.canlet.2010.05.003
- Eskander RN, Ji T, Huynh B, Wardh R, Randall LM, et al. (2013) Inhibition of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is associated with decreased tumor cell proliferation, migration, and invasion in endometrial cancer cell lines. *Int J Gynecol Cancer Off J Int J Gynecol Cancer Soc* 23: 997–1005. doi:10.1097/IGC.0b013e318296a265
- Li H, Cai Q, Godwin AK, Zhang R (2010) Enhancer of zeste homolog 2 promotes the proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res MCR* 8: 1610–1618. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0398
- Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD (2008) Regulation of Pancreatic Tumor Cell Proliferation and Chemoresistance by the Histone Methyltransferase EZH2. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 14: 6790–6796. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1013
- Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA (2010) Epigenetic Modifications as Therapeutic Targets. *Nat Biotechnol* 28. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022972/>. Accessed 2013 December 19.
- McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, et al. (2012) EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492: 108–112. doi:10.1038/nature11606
- Qi W, Chan H, Teng L, Li L, Chuai S, et al. (2012) Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 21360–21365. doi:10.1073/pnas.1210371110
- Wagner T, Jung M (2012) New lysine methyltransferase drug targets in cancer. *Nat Biotechnol* 30: 622–623. doi:10.1038/nbt.2300
- Zhao X, Lwin T, Zhang X, Huang A, Wang J, et al. (2013) Disruption of the MYC-miRNA-EZH2 loop to suppress aggressive B-cell lymphoma survival and clonogenicity. *Leukemia* 27: 2341–2350. doi:10.1038/leu.2013.94
- Crea F, Paolicchi E, Marquez VE, Danesi R (2012) Polycomb genes and cancer: time for clinical application? *Crit Rev Oncol Hematol* 83: 184–193. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.10.007
- Chase A, Cross NCP (2011) Aberrations of EZH2 in Cancer. *Clin Cancer Res* 17: 2613–2618. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2156
- Cheng LL, Itahana Y, Lei ZD, Chia N-Y, Wu Y, et al. (2012) TP53 genomic status regulates sensitivity of gastric cancer cells to the histone methylation inhibitor 3-deazaneplanocin A (DZNep). *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 18: 4201–4212. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0036
- Choudhury SR, Balasubramanian S, Chew YC, Han B, Marquez VE, et al. (2011) (-)-Epigallocatechin-3-gallate and DZNep reduce polycomb protein level via a proteasome-dependent mechanism in skin cancer cells. *Carcinogenesis* 32: 1525–1532. doi:10.1093/carcin/bgr171
- Crea F, Hurt EM, Mathews LA, Cabarcas SM, Sun L, et al. (2011) Pharmacologic disruption of Polycomb Repressive Complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer. *Mol Cancer* 10: 40. doi:10.1186/1476-4598-10-40
- Crea F, Fornaro L, Bocci G, Sun L, Farrar WL, et al. (2012) EZH2 inhibition: targeting the crossroad of tumor invasion and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 31: 753–761. doi:10.1007/s10555-012-9387-3
- Hayden A, Johnson PWM, Packham G, Crabb SJ (2011) S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibition by 3-deazaneplanocin A analogues induces anti-cancer effects in breast cancer cell lines and synergy with both histone deacetylase and HER2 inhibition. *Breast Cancer Res Treat* 127: 109–119. doi:10.1007/s10549-010-0982-0
- Puppe J, Drost R, Liu X, Joosse SA, Evers B, et al. (2009) BRCA1-deficient mammary tumor cells are dependent on EZH2 expression and sensitive to Polycomb Repressive Complex 2-inhibitor 3-deazaneplanocin A. *Breast Cancer Res BCR* 11: R63. doi:10.1186/bcr2354
- Suvá M-L, Riggi N, Janiszewska M, Radovanovic I, Provero P, et al. (2009) EZH2 Is Essential for Glioblastoma Cancer Stem Cell Maintenance. *Cancer Res* 69: 9211–9218. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1622
- Zhou J, Bi C, Cheong L-L, Mahara S, Liu S-C, et al. (2011) The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML. *Blood* 118: 2830–2839. doi:10.1182/blood-2010-07-294827
- Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Lopez-Guerrero JA, Carda C, Callaghan RC, et al. (n.d.) Establishment and Characterization of a Continuous Human Chondrosarcoma Cell Line, ch-2879: Comparative Histologic and Genetic Studies with Its Tumor of Origin. *Lab Invest* 83: 877–887.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25: 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Duchman KR, Lynch CF, Buckwalter JA, Miller BJ (2014) Estimated Cause-specific Survival Continues to Improve Over Time in Patients With Chondrosarcoma. *Clin Orthop*. doi:10.1007/s11999-014-3600-3
- Italiano A, Mir O, Cioffi A, Palmerini E, Piperno-Neumann S, et al. (2013) Advanced chondrosarcomas: role of chemotherapy and survival. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 24: 2916–2922. doi:10.1093/annonc/mdt374
- Angelini A, Guerra G, Mavrogenis AF, Pala E, Picci P, et al. (2012) Clinical outcome of central conventional chondrosarcoma. *J Surg Oncol* 106: 929–937. doi:10.1002/jso.23173
- Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, et al. (2009) DZNep Is a Global Histone Methylation Inhibitor that Reactivates Developmental Genes Not Silenced by DNA Methylation. *Mol Cancer Ther* 8: 1579–1588. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0013
- Holm K, Grabau D, Lövgren K, Aradottir S, Gruvberger-Saal S, et al. (2012) Global H3K27 trimethylation and EZH2 abundance in breast tumor subtypes. *Mol Oncol* 6: 494–506. doi:10.1016/j.molonc.2012.06.002
- Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, et al. (2006) EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 24: 268–273. doi:10.1200/JCO.2005.01.5180
- Mallen-St. Clair J, Soydaner-Azeloglu R, Lee KE, Taylor L, Livanos A, et al. (2012) EZH2 couples pancreatic regeneration to neoplastic progression. *Genes Dev* 26: 439–444. doi:10.1101/gad.181800.111
- Chiba T, Suzuki E, Negishi M, Saraya A, Miyagi S, et al. (2012) 3-Deazaneplanocin A is a promising therapeutic agent for the eradication of tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 130: 2557–2567. doi:10.1002/ijc.26264
- Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A, Kobayashi M, Okitsu Y, et al. (2014) 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an Inhibitor of S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferase, Promotes Erythroid Differentiation. *J Biol Chem* 289: 8121–8134. doi:10.1074/jbc.M114.548651
- Varier RA, Timmers HTM (2011) Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 1815: 75–89. doi:10.1016/j.bbcan.2010.10.002
- Hung SW, Mody H, Marrache S, Bhutia YD, Davis F, et al. (2013) Pharmacological Reversal of Histone Methylation Presensitizes Pancreatic Cancer Cells to Nucleoside Drugs: In Vitro Optimization and Novel Nanoparticle Delivery Studies. *PLoS ONE* 8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3735519/>. Accessed 2013 September 10.

For reprint orders, please contact reprints@future-science.com

Histone methylases as novel drug targets: developing inhibitors of EZH2

Post-translational modifications of histones (so-called epigenetic modifications) play a major role in transcriptional control and normal development, and are tightly regulated. Disruption of their control is a frequent event in disease. In particular, the methylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27), induced by the methylase EZH2, emerges as a key control of gene expression and a major regulator of cell physiology. The identification of driver mutations in EZH2 has already led to new prognostic and therapeutic advances, and new classes of potent and specific inhibitors for EZH2 show promising results in preclinical trials. This review examines the roles of histone lysine methylases and demethylases in cells and focuses on the recent knowledge and developments about EZH2.

Histone modifications & histone code Epigenetics has been defined as inheritable changes in gene expression that occur without a change in DNA sequence. Key components of epigenetic processes are DNA methylation, histone modifications and variants, non-histone chromatin proteins, siRNA and miRNA. They induce changes in gene expression in modifying accessibility of the eukaryotic transcription machinery to specific genes. In particular, the role of histones as active participants in gene regulation has only recently been appreciated.

Histones were discovered in 1884 by Albrecht Kossel. But until the early 1990s, these proteins, which are assembled into nucleosomes, forming beads around which the DNA is wrapped, were considered to be relatively inert scaffolding for packaging the genetic material. It is now known that histones play also a key role in gene expression regulation, through post-translational modifications of histone (Figure 1). In 2000, the concept of a 'histone code' emerged [1].

The histones' amino-terminal tails extend away from the central core, and are thus available for reversible acetylation, methylation, phosphorylation, ADP-ribosylation and ubiquitination (Figure 2). Histone modifica-

tions interact with DNA methylation to mark genes for silencing or transcription. By reading the combinatorial and/or sequential histone modifications that constitute the histone code (Table 1), it was thought that it might be possible to predict which gene products will be transcribed and thus determine a cell's RNA repertoire and ultimately its proteome, just as reading the DNA code allows us to predict the encoded protein sequence. However, some gene loci present both histone 3 lysine 4 trimethylation (H3K4-me3), associated with transcriptional activation and histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K-27me3), and are linked with repression. These bivalent domains are posited to be poised for either up- or down-regulation and to provide an epigenetic blueprint for lineage determination [2], and are usually found in stem cells.

These post-translational modifications undergone by histones have a profound effect on the remodeling of chromatin. Two distinct chromatin states can be distinguished: condensed 'closed' heterochromatin, and decondensed 'open' euchromatin. The change from transcriptionally silenced heterochromatin to gene expression euchromatin is mediated by post-translational modifications of histones and uses of distinct histone variants.

Catherine Bauge^{*1,2,3}, Céline Bazille^{1,2,4}, Nicolas Girard^{1,2}, Eva Lhuissier^{1,2} & Karim Boumediene^{1,2}

¹Normandie University, France

²UNICAEN, EA4652 MILPAT, Caen, France

³EA4652 MILPAT, UFR de médecine, Université de Caen Basse-Normandie, CS14032 Caen Cedex 5, France

⁴Service d'Anatomie Pathologique, CHU, Caen, France

*Author for correspondence:

Tel.: +33 231068218

Fax: +33 231068224

catherine.bauge@unicaen.fr

FUTURE
SCIENCE

part of

fsg

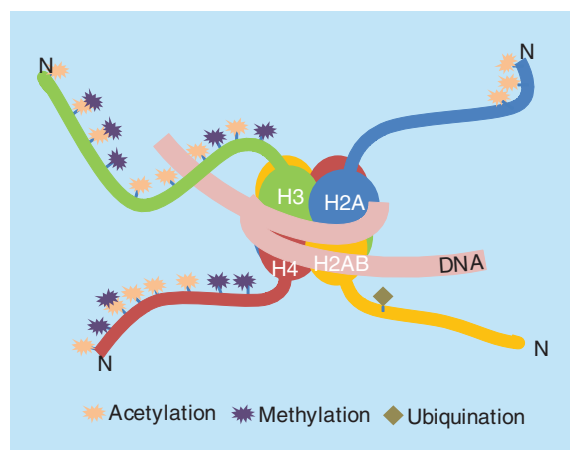


Figure 1. Nucleosome organization. The fundamental DNA packing unit is known as a nucleosome. Each nucleosome is approximately 11 nm in diameter. The DNA double helix wraps around a central core of eight histone protein molecules (an octamer containing two H2A, two H2B, two H3 and two H4) to form a single nucleosome. The N-terminal 'tail' of these histones can undergo post-translational modifications (acetylation, methylation or phosphorylation).

Histone lysine methylation

Histone methylation is an epigenetic mark actively studied in recent years. Of approximately 11,000 articles referenced in Pubmed since 1964, more than half of them have been published during the last 4 years.

The most well-characterized histone methylation appears on lysine [3,4]. Histone lysine methylation

occurs primarily on histone H3 at lysines 4, 9, 14, 18, 23, 27, 36 and 79 and on histone H4 at lysine 20 [4–6]. A number of these methylation events have been linked to transcriptional regulation, including those at H3 lysines 4, 36 and 79 (associated with active transcription) and those at H3 lysines 9 and 27 (associated with gene repression and heterochromatin formation) [3,7]. Unlike acetylation and phosphorylation, which in addition to recruiting proteins to chromatin can also directly affect chromatin structure by altering the histone charge, lysine methylation does not alter the charge of the residue and is, therefore, thought to primarily modulate chromatin structure through the recruitment of distinct reader proteins that possess the ability to facilitate transcriptional activation or repression [3,4,6,8].

Lysine residues can be modified with up to three methyl groups (mono-, di- and tri-methylation) on the epsilon amine of the side chain (Figure 3). Importantly, reader domains can distinguish between the different methyl states producing distinct functional outcomes [3,4,6,8]. These observations demonstrate the complexity and fine level of control that lysine methylation contributes to chromatin function and transcriptional regulation.

Among activation marks, trimethylation at lysine 4 of histone H3 (H3K4me3) is the prominent methyl-lysine species at active promoter regions [9–13]. This mark plays a major role in transcription initiation, notably in recruiting the general transcription

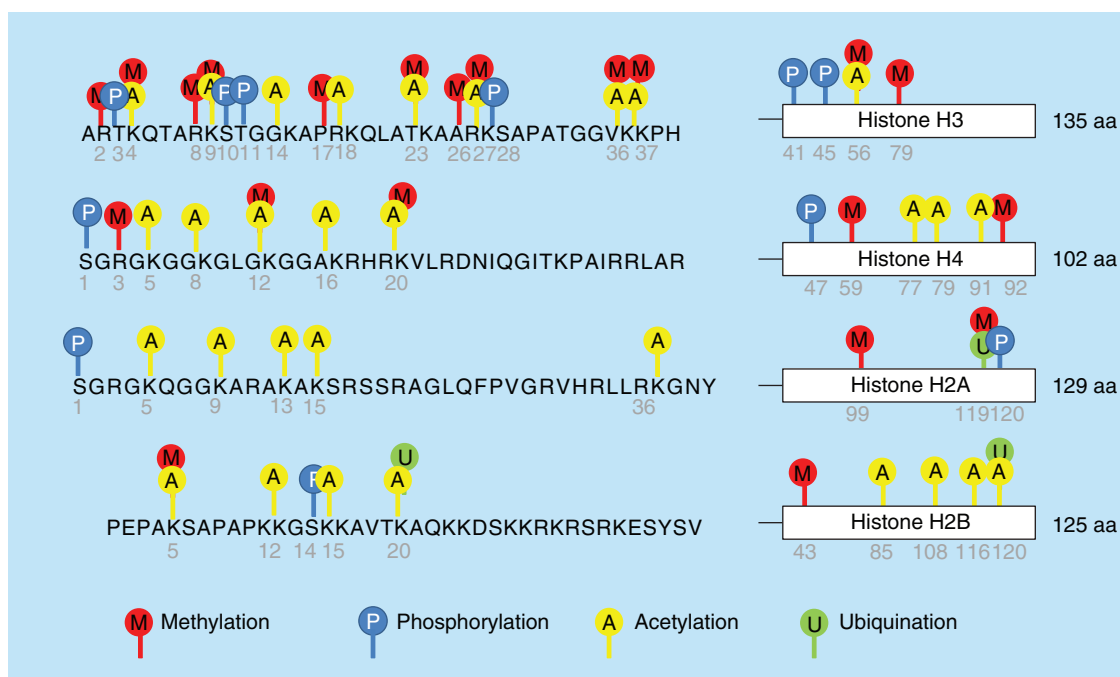


Figure 2. Major histone modifications. Histone modifications mainly occur on the N-terminal tails of histones but also on the C-terminal tails and globular domains. The major modifications shown include acetylation (A), methylation (M), phosphorylation (P) and ubiquitination (U).

Table 1. The histone code.

Histone code	Methylation			Acetylation	Ubiquitination
	Monomethylation	Dimethylation	Trimethylation		
H2AK119	–	–	–	–	Repression
H2BK5	Activation	–	Repression	–	–
H3K4	Activation	Activation	Activation	–	–
H3K9	Activation	Repression	Repression	Activation	–
H3K14	–	–	–	Activation	–
H3K18	–	–	–	Activation	–
H3K27	Activation	Repression	Repression	Activation	–
H3K36	Repression	Activation	Activation	–	–
H3K56	–	–	–	Activation	–
H3K79	Activation	Activation	Activation, repression	–	–
H4K12	–	–	–	Activation	–
H4K20	Activation	–	Repression	–	–

For each post-translational modification, the known functional association on gene transcription is shown. By reading the combinatorial and/or sequential histone modifications that constitute the histone code, it may be possible to predict which gene products will be transcribed. However, this code is controversial, since some gene loci present marks both associated with transcriptional activation and linked with repression. These bivalent domains are posited to be poised for either up- or down-regulation and to provide an epigenetic blueprint for lineage determination, and are usually found in stem cells.

factors, or in mediating interactions with RNA polymerase-associated proteins [6]. H3K36 methylation, meanwhile, primarily exists with the lower methylation states (H3K36-me1 and -me2) present near 5' regions and higher methylation states (H3K36-me2 and -me3) at the 3' ends of genes [11,14]. The role of H3K36 methylation is also quite diverse and has been shown to be involved in numerous functions, including transcription, mRNA splicing, DNA replication and DNA repair [15,16]. Its function that has been most well defined is its role in transcription elongation. Another modification found in gene bodies is methylation of H3K79; however, unlike H3K36 methylation, its role in actively transcribed genes is less clear. It may act as a protection from silencing [6].

At opposite, histone H3 lysine 9 methylation (H3K9) has been correlated with heterochromatin formation and transcriptional repression, making the methylation state of lysine 9 an interesting marker of transcriptional activity. H3K9me3 binds heterochromatin protein 1 (HP1) to constitutive heterochromatin [17]. HP1 is responsible for transcriptional repression and the actual formation and maintenance of heterochromatin. H3K9me2 is a characteristic mark of the inactivated X chromosome [18,19]. H3K9 methylation is also involved in cell reprogramming or cancer. H3K27 methylation is also another epigenetic repressive mark, which plays a major role in a plethora of cellular processes, such as stem cell renewal, cell fate, reprogramming, cancer and inflammation.

Histone arginine methylation

As lysine, arginine on histone can also be methylated. The addition of one or two methyl groups on arginine residues results in three different methylation states: monomethylated, asymmetrically dimethylated or symmetrically dimethylated arginine. The methyl groups are deposited by protein arginine methyltransferases. Histone arginine methylation associates with both active and repressed chromatin states depending on the residue involved and the status of methylation [20]. This process is involved in several cellular processes, such as transcription, RNA processing, signal transduction and DNA repair. Besides, it is now clear that there is crosstalk between arginine and lysine methylation: this has been termed 'arginine/lysine-methyl/methyl switch' [21,22].

Key term

Epigenetic: A current search of the PubMed database for the term 'epigenetic' returns more than 33,000 papers, with approximately half of them published during the past 4 years, marking an explosion of research efforts on this topic. Striking is the diversity of biological processes that are described in these articles, including fundamental aspects of development, cell fate or reprogramming in diverse organisms, as well as basic mechanisms of transcriptional control or DNA damage repair. Thus, epigenetics, through the modulation of genetic information, plays roles in fundamental life processes, such as cell proliferation, cell development, cell fate or decision between cell survival and cell death.

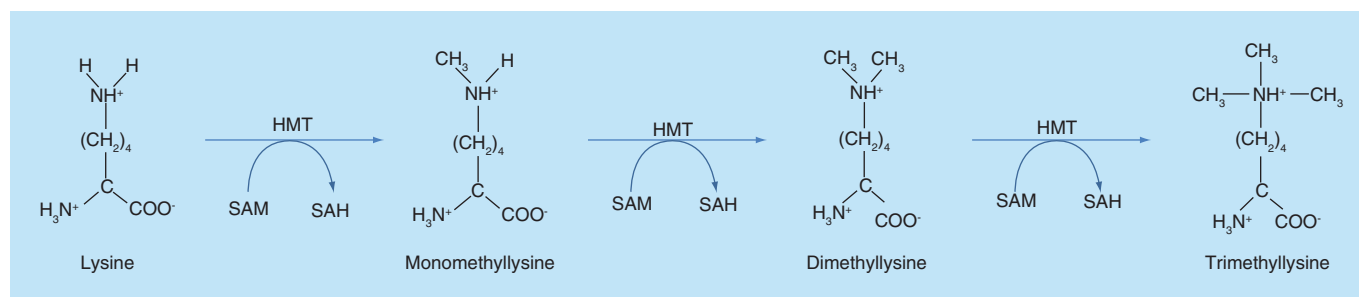


Figure 3. Methyl group transfer reaction on lysine. The lysine amino group of the substrate histone polypeptide engages in a SN2 reaction with the activated co-factor *S*-adenosyl-L-methionine, resulting in the formation of an *N*-methylated lysine and *S*-adenosyl-L-homocysteine.

Histone methyltransferases & demethylases

There are currently more than 60 predicted lysine methyltransferases and 30 predicted lysine demethylases in the human genome [23–25].

Histone methyltransferase (HMT) activity towards lysine (and arginine) residues is found in a family of enzymes with a conserved catalytic domain called SET. The human genome encodes 49 SET domain-containing proteins and the histone lysine methyltransferase DOT1L, which does not contain a SET domain (Table 2). The importance of HMTs for embryonic development has been demonstrated in numerous mouse knockout studies [26]. In addition, misregulation of HMTs has been linked to diseases or cancer aggressiveness. In particular, the Polycomb group transcriptional repressor Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) (methylase of H3K27), is overexpressed in many different types of cancer [27], and has been proposed as a molecular marker of some cancer progression and metastasis [28–33].

In 2004, the first histone demethylase (HDM) was discovered, and called lysine-specific demethylase 1 (LSD1). Since then, more than 20 demethylases have been identified and characterized (Table 3). They belong to either the LSD family or the JMJC family, demonstrating the reversibility of all methylation states at almost all major histone lysine methylation sites (Table 3). The identification of these HDMs has completely changed our initial view of histone methylation as a permanent, heritable mark [34]. The presence of both HMTs and HDMs in the same

complexes permits modifying of chromatin marks and subsequently switching of transcriptional states from silenced to activated status or *vice versa*. Thus, a tight regulation of the expression, activity and recruitment of HMTs and HDMs is necessary. A deregulation of their activity or expression might modify the transcriptional balance, and lead to inappropriate gene expression programs that, in turn, could induce human disease (Supplementary Table 1). In particular, the histone methylase EZH2 plays a major role in cell fate and cancer development, and appears now as a promising target for treat some diseases.

Role of the lysine methyltransferase EZH2

The methyltransferase Polycomb Group (PcG) protein EZH2, also called KMT6, is the catalytic subunit of the Polycomb Repressor Complex 2 (PRC2). Its C-terminal SET domain exhibits methyltransferase activity, leading to repressed gene transcription by silencing target genes through methylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27me3) [35]. In addition to methylation of H3K27, EZH2 has been shown to methylate cellular proteins and act as a coactivator of steroid hormone receptors [36]. This function is hypothesized to be independent of PRC2 and potentially induced by phosphorylation of EZH2 [36,37]. Besides its ability to methylate H3K27, EZH2 has recently been described to methylate lysine 120 of histone H2B, which competes with ubiquitination on this site [38]. EZH2 is post-translationally regulated by O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase-mediated O-GlcNAcylation at S75, which stabilizes EZH2 and hence facilitates the formation of H3K27me3 [39].

Unlike other SET domains, the methylase EZH2 is inactive on its own for histone substrates. To be functional, EZH2 needs to form the PRC2 complex (Figure 4) by interacting with other partners, including embryonic ectoderm development (EED), suppressor of zeste 12 homolog (SUZ12) and RBAP48/RBBP4 [40–43]. Collectively, these proteins regulate vital cellular processes, such as differentiation, cell identity, stem

Key terms

EZH2: *Enhancer of Zeste Drosophila Homolog 2* was initially cloned in 1996. This gene, located on human chromosome 21, encodes a histone methyltransferase and constitutes the catalytic component of the polycomb repressive complex-2 (PRC2). EZH2 specifically methylates the histone H3 at lysine-27 (H3K27). It plays a major role in a plethora of biological processes, including development, cell fate or reprogramming, as well as regulation of immune system or cancers.

Table 2. Histone target substrates and domain structure of histone lysine methyl-transferases.		
Synonyms	Protein structure	Histone substrates
With SET domain MLL, KMT2A		H3K4me1/2/3
MLL2, KMT2D		H3K4me1/2/3
SETD1A, SET1A, KMT2F		H3K4me1/2/3
SETD1D1B, SET1B, KMT2G		H3K4me1/2/3
MLL4, KMT2B		H3K4me1/2/3
MLL3, HALR, KMT2C		H3K4me1/2/3
EZH2, KTM6A, KTM6		H3K27me2/3
EZH1, KTM6B		H3K27me2/3
NSD2, WHSC1, MMSET		H3K36me3
NSD3, WHSC1L		
NSD1, KMT3B		H3K36me2/3
SET2, HYPB, SETD2		H3K36me3
ASH1L		H3K4me3
SUV39H1, KTM1A		H3K9me2/3
SUV39H2, KTM1B		H3K9me2/3
EHMT2, G9A		H3K9me1/2
EHMT1, GLP1		H3K9me1/2
SETDB1, ESET		H3K9me2/3
SETDB2, CLL8		

Key:

SET	Bromo	TUDOR	C2H2 Znf	CxxC
pre-SET	Chromo	ANK	HMG	MBD
pre-ECT	MID	AT hook	SANT	∞ T

For each protein, the official name as well as the most commonly used synonyms, the histone target substrates and domain structure are provided. ANK: Ankyrin repeats; AT hook: A/T DNA-binding motif; C2H2 Znf: C2H2-type zinc finger; CxxC: CxxC zinc finger; HMG: High-mobility group; MBD: Methyl CpG-binding domain; PHD: Plant homeo-domain zinc finger; pre/post-SET: Cysteine-rich motifs found adjacent to a subset of SET domains; SANT: SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIIB DNA-binding domain; SET: Suppressor of variegation, Enhancer of Zeste, Trithorax domain.

Table 2. Histone target substrates and domain structure of histone lysine methyl-transferases (cont.).

Synonyms	Protein structure	Histone substrates
SETMAR		
SETD8, PR-SET7		H4K20me1
SMYD4		
MLL5, KMT2E		
SETD5		
SETD7, SET7/9		H3K4me1
SETD4		
SUV4-20H1, KMT5B		H4K20me2/3
SUV4-20H2, KMT5C		H4K20me2/3
SMYD5		
SETD3		
SETD6		
SMYD1, KMT3D		
SMYD2, KMT3C		H3K36me2 H3K4
SMYD3, KMT3E		H3K4me2/3
PRDM1, BLIMP1		
PRDM14		
PRDM9, MEISETZ		H3K4me3
PRDM11, PFM8		
PRDM4, PFM1		
PRDM15, PFM15		
PRDM6, PFM3		
PRDM12, PFM9		
PRDM5, PFM2		
PRDM8, PFM5		
PRDM13, PFM10		

Key:

SET	Bromo	TUDOR	C2H2 Znf	CxxC
pre-SET	Chromo	ANK	HMG	MBD
pre-ECT	MID	AT hook	SANT	∞ T

For each protein, the official name as well as the most commonly used synonyms, the histone target substrates and domain structure are provided. ANK: Ankyrin repeats; AT hook: A/T DNA-binding motif; C2H2 Znf: C2H2-type zinc finger; CxxC: CxxC zinc finger; HMG: High-mobility group; MBD: Methyl CpG-binding domain; PHD: Plant homeo-domain zinc finger; pre/post-SET: Cysteine-rich motifs found adjacent to a subset of SET domains; SANT: SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIB DNA-binding domain; SET: Suppressor of variegation, Enhancer of Zeste, Trithorax domain.

Table 2. Histone target substrates and domain structure of histone lysine methyl-transferases (cont.).

	Synonyms	Protein structure	Histone substrates
	PRDM3, PDS1-EVI1		
	PRDM6, MEL1, PFM3		
	PRDM2, RIZ1, KMT8		H3K9
Without SET domain	DOT1L, KMT4		H3K79
Key:			
SET	Bromo	TUDOR	C2H2 Znf
pre-SET	Chromo	ANK	HMG
pre-ECT	MID	AT hook	SANT
			CxxC
			MBD
			∞ T
For each protein, the official name as well as the most commonly used synonyms, the histone target substrates and domain structure are provided. ANK: Ankyrin repeats; AT hook: A/T DNA-binding motif; C2H2 Znf: C2H2-type zinc finger; CxxC: CxxC zinc finger; HMG: High-mobility group; MBD: Methyl CpG-binding domain; PHD: Plant homeo-domain zinc finger; pre/post-SET: Cysteine-rich motifs found adjacent to a subset of SET domains; SANT: SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIB DNA-binding domain; SET: Suppressor of variegation, Enhancer of Zeste, Trithorax domain.			

cell plasticity and proliferation [44–46]. As a result, aberrations in any PRC2 component can have powerful physiologic consequences on the cell.

EZH2, stem cells & reprogramming

EZH2 plays a central role in stem cells. Recent report showed that EZH2 is important for establishing embryonic stem (ES) cell lines from blastocysts [47–49]. Additionally, EZH2 is required for efficient somatic cell reprogramming by cell fusion and nuclear transfer [49,50]. EZH2 is abundantly expressed in induced pluripotent stem (iPS) cells (at a similar level as in ES cells), and EZH2 knockdown severely impaired iPS cell generation. Proper differentiation of iPS cells and reprogramming, thus, require EZH2 [51]. However, once pluripotency is established, EZH2 knockdown leaves the pluripotent phenotype of iPS cells unaffected [52]. All this indicates that EZH2 is critical for induction of pluripotency, but once pluripotency is established, EZH2 is not required anymore. The mechanism of EZH2 in reprogramming is still poorly known, but it has been recently found that EZH2 impacts on iPS cell generation at least in part through repression of the CDK inhibitor *Ink4a/Arf*, which represents a major roadblock for iPS cell generation [52]. Furthermore, *c-Myc*, one of the iPS cell-inducing factors, was recently shown to directly regulate EZH2 expression and to be required for maintaining high EZH2 expression in ES cells [53].

The role of EZH2 in reprogramming is, however, unclear. Indeed, in a recent paper [54], Fragola *et al.* generated iPS cells from MEF with a conditional *EZH2*-knockout allele for the deletion of the catalytic EZH2 SET domain [54]. EZH2-deficient iPS cells,

obtained using a cell-permeable TAT-Cre recombinase, exhibited a global loss of H3K27me3, and presented a typical iPS cell phenotype, including ES cell-like morphology, growth and differentiation potential. This result on EZH2-deficient iPS cells contrasts with other papers that showed the essential role of EZH2 in reprogramming [51,52]. It might be explained by the methodology used, in that EZH2 inactivation could have occurred after reprogramming.

EZH2 & cell fate

EZH2 also regulates expression of tissue-specific genes involved in cellular differentiation and developmental programs [35,55–58]. It is involved in differentiation of embryonic and adult stem cells into several cell lineages (myogenesis, adipogenesis, osteogenesis, neurogenesis, hematopoiesis, lymphopoiesis, epidermal differentiation and hepatogenesis) [59].

For instance, EZH2 was clearly shown to act as a negative regulator of skeletal muscle differentiation favoring the proliferation of myogenic precursors [60–62]. This function results from an EZH2-dependent direct repression of genes related to myogenic differentiation [60], through the H3K27me3 mark deposition on the promoters of myogenic genes [60,63]. EZH2 is expressed early in the myotomal compartment of developing somites and in proliferation satellite cells and is downregulated in terminally differentiated muscle cells [60]. In skeletal muscle progenitors, EZH2 is, thus, highly expressed and prevents an unscheduled differentiation by repressing muscle-specific gene expression. During the course of their differentiation, EZH2 is downregulated, favoring the expression of muscle-specific genes, such as mCK, MyoG, myh or

MyoD [64,65]. Furthermore, the key-role of EZH2 in control of self-renewal and safeguarding the transcriptional identity of skeletal muscle stem cells has been shown using mice with conditional ablation of EZH2 in satellite cells. These mice have reduced muscle mass and fail to appropriately regenerate. These defects were associated with derepression of genes expressed in non-muscle cell lineages [66]. Besides, in humans, abnormal expression of EZH2 is observed in the muscular disorder Duchenne muscular dystrophy [67].

EZH2 was also found to be involved in commitment of mesenchymal stem cells towards osteoblast lineage [68]. Suppression of EZH2 activity promotes differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts. The mechanism might be linked to Runx2 regulation, since a striking decrease in EZH2 mRNA levels has been found to be correlated with increased Runx2 binding, suggesting that the transcription of EZH2 is potentially negatively regulated by Runx2 [69]. By contrast, deletion of EZH2 inhibits adipogenesis, by eliminating H3K27me3 on Wnt promoters and derepressing Wnt expression, which leads to activation of Wnt/ β -catenin signaling [70]. These data show that EZH2 facilitates adipogenesis whereas it suppresses osteogenesis.

EZH2 & the immune system

EZH2 also plays a role in the immune system, for both T- and B-cell development. EZH2 is most abundant at sites of embryonic lymphopoiesis, such as fetal liver and thymus [71].

In B-cell progenitors, EZH2 expression is down-regulated during differentiation. It is the highest in pro-B cells and very low in mature recirculating B cells [159]. Upregulation of EZH2 in proliferating human germinal center B cells (centroblasts) [72] and mitogen-stimulated lymphocytes [73] suggested an important role for this histone methylase in B-cell division and activation. This is further supported by the association of EZH2 with Vav, one of the key regulators of receptor-mediated signaling in lymphocytes [74]. But the major proof of a critical role for EZH2 in early B-cell development and rearrangement of the immunoglobulin heavy chain gene (*Igh*) has been established, in 2002, using Cre-mediated conditional mutagenesis. EZH2 deficiency leads to diminished generation of pre-B cells and immature B cells in the bone marrow. Defective B-cell development cannot be restored by the presence of the wild-type cells in the mixed bone marrow chimeras. The requirement for EZH2 is development stage-specific: EZH2 is a key regulator of histone H3 methylation in early B-cell progenitors [75].

EZH2 is a master regulator of the germinal center (GC) B-cell phenotype [76]. It represses genes involved in proliferation checkpoints (e.g., *CDKN1A*)

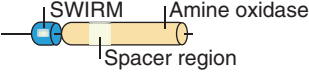
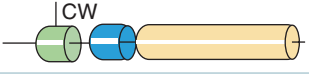
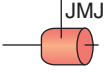
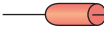





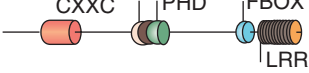





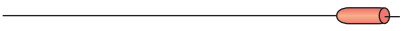





and in exit from the GC and terminal differentiation (e.g., *IRF4* and *PRDM1*). This function is aberrantly reinforced by mutant *EZH2*^{Y146N} lymphoma disease alleles [76]. EZH2 also established bivalent chromatin domains at key regulatory loci to transiently suppress GC B-cell differentiation. Besides, EZH2 cooperates with *BCL2* to generate GC-derived lymphomas [76].

A recent study also established a functional link between this histone methyltransferase EZH2 and transcriptional regulation of lineage-specifying genes in terminally differentiated CD4⁺ T cells. EZH2 inactivation specifically enhanced T helper (Th) 1 and Th2 cell differentiation and plasticity. EZH2 directly binds *Tbx21* and *Gata3* genes, leading to substantial trimethylation at lysine 27 of histone 3 (H3K27me3) at these loci, thereby facilitating correct expression of these primordial genes in differentiating Th1 and Th2 cells. Additionally, EZH2 deficiency leads to spontaneous generation of small IFN- γ and Th2 cytokine-producing populations in non-polarizing cultures and, under these conditions, IFN- γ expression was largely dependent on increased expression of the transcription factor Eomesodermin. Besides, *in vivo*, in a model of allergic asthma, EZH2 loss results in exacerbated pathology with a progressive accumulation of memory phenotype Th2 cells [77].

EZH2 & cancer

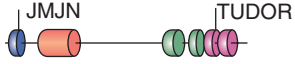


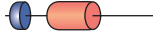

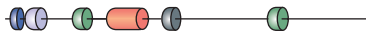



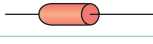
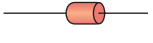
Among EZH2 roles, its implication in cancer is the most studied: more than 70% of articles referenced in PubMed for 'EZH2' search term are related to cancer. Alterations in *EZH2* were first discovered in breast and prostate cancer, where amplification and overexpression first implied it may function as an oncogene [28,31]. Since then, increasing evidence demonstrates that EZH2 is not only aberrantly expressed in several types of human cancers, but often behaves as a molecular biomarker of poor prognosis [27–28,31,78–84]. The role of EZH2 in cancer development was initially validated both *in vitro* and *in vivo*, with *EZH2* overexpression proving sufficient to drive proliferation in cancer cells and transform primary fibroblasts [27,85].

Overexpression of EZH2 has now been found in a number of human cancers, such as prostate cancers, gastric cancers, breast cancer, renal cancer, colorectal cancer, non-small-cell lung cancer, squamous cell carcinomas, urothelial carcinomas in addition to synovial sarcomas, chondrosarcoma, lymphomas and melanomas [31,86–91]. EZH2 expression is correlated with aggressiveness, metastasis and poor prognosis in most of these cancers. Elevated expression of EZH2 has also been identified as a marker for breast cancer-initiating cells, possibly reflecting its role in maintaining 'stemness' [31,92].

Table 3. Histone target substrates and domain structure of histone lysine demethyltransferases.				
	Synonyms	Protein structure [†]	Histone substrates	Other substrates
LSD demethylases	LSD1, KDM1A, AOF2, BHC110		H3K4me1, H3K4me2	p53, E2F1, DNMT1
	LSD2, KDM1B, AOF1		H3K9me1, H3K9me2 H3K4me1, H3K4me2	
JMJC demethylases	JMJD7			
	HIF1AN			
	HSPBAP1			
	JMJD5, KDM8		H3K36me2	
	JMJD4			
	JMJD6, PSR, PTDSR		H3R2 H4R3	
	JMJD8			
	FBXL10, JHDM1B, KDM2B		H3K36me1, H3K36me2, H3K4me3	
	FBXL11, JHDM1A, KDM2A		H3K36me1, H3K36me2	NFκB (p65)
	KIAA1718, JHDM1D		H3K9me1, H3K9me2 H3K27me1, H3K27me2	
	PHF8, JHDM1F		H3K9me1, H3K9me2 H4K20me1	
	PHF2, JHDM1E		H3K9me2	ARID5B
	HR			
	KDM3B			
	JMJD1A, JHDM2A, TSGA, KDM3A		H3K9me1, H3K9me2	
	JMJD1C			
	JMJD3, KDM6B		H3K27me2, H3K27me3	
	UTX, KDM6A		H3K27me2, H3K27me3	
UTY				

[†]Structural domains are annotated.
 ARID: AT-rich interacting domain; amine oxidase: amine oxidase domain; C5HC2: C5HC2 zinc-finger domain; CXXC: CXXC zinc-finger domain; DNMT1: DNA methyltransferase 1; FBOX: F-box domain; FBXL: F-box and Leu-rich repeat protein; HIF1AN: Hypoxia-inducible factor 1A inhibitor; HR: Hairless domain; HSPBAP1: Heat shock protein-associated protein 1; JARID: Jumonji domain-ARID-containing protein; JMJC: Jumonji C domain; LRR: Leu-rich repeat domain; LSD: Lys-specific demethylase; MINA: MYC-induced nuclear antigen; NO66: Nucleolar protein 66; PHD: Plant homeodomain; SWIRM: Swi3p Rsc8p and Moira domain; TPR: Tetratricopeptide domain; TUDOR: Tudor domain; UTX: Ubiquitously transcribed X chromosome tetratricopeptide repeat protein; UTY: Ubiquitously transcribed Y chromosome tetratricopeptide repeat protein.

Table 3. Histone target substrates and domain structure of histone lysine demethyltransferases (cont.).

Synonyms	Protein structure [†]	Histone substrates	Other substrates
JMJD2A, JHDM3A, KDM4A		H3K9me2, H3K9me3	H3K36me2, H3K36me3 H1.4K26me2, H1.4K26me3
JMJD2C, JHDM3C, GASC1, KDM4C		H3K9me2, H3K9me3	H3K36me2, H3K36me3 H1.4K26me2, H1.4K26me3
JMJD2B, JHDM3B, KDM4B		H3K9me2, H3K9me3	H3K36me2, H3K36me3 H1.4K26me2, H1.4K26me3
JMJD2D, JHDM3D, KDM4D		H3K9me2, H3K9me3	H3K36me2, H3K36me3 H1.4K26me2, H1.4K26me3
JARID1B, PLU1, KDM5B		H3K4me2, H3K4me3	
JARID1C, SMCX, KDM5C		H3K4me2, H3K4me3	
JARID1D, SMCY, KDM5D		H3K4me2, H3K4me3	
JARID1A, RBP2, KDM5A		H3K4me2, H3K4me3	
JARID2			
MINA			
NO66		H3K4me2, H3K4me3	H3K36me2, H3K36me3

[†]Structural domains are annotated.

ARID: AT-rich interacting domain; amine oxidase: amine oxidase domain; C5HC2: C5HC2 zinc-finger domain; CXXC: CXXC zinc-finger domain; DNMT1: DNA methyltransferase 1; FBOX: F-box domain; FBXL: F-box and Leu-rich repeat protein; HIF1AN: Hypoxia-inducible factor 1A inhibitor; HR: Hairless domain; HSPBAP1: Heat shock protein-associated protein 1; JARID: Jumonji domain-ARID-containing protein; JMJC: Jumonji C domain; LRR: Leu-rich repeat domain; LSD: Lys-specific demethylase; MINA: MYC-induced nuclear antigen; NO66: Nucleolar protein 66; PHD: Plant homeodomain; SWIRM: Swi3p Rsc8p and Moira domain; TPR: Tetratricopeptide domain; TUDOR: Tudor domain; UTX: Ubiquitously transcribed X chromosome tetratricopeptide repeat protein; UTY: Ubiquitously transcribed Y chromosome tetratricopeptide repeat protein.

In addition, several mutations, located the most often in the SET domain leading to increased trimethylation efficiency, have been associated with cancers (Table 4) [93–98]. Recurrent mutations of EZH2 have

been found in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and melanoma [99]. The mutated residues alter the substrate specificity of EZH2 and facilitate the conversion from a dimeth-

ylated to a trimethylated state, thus, resulting in significantly elevated global H3K27me3 levels [93,98]. The most frequently identified mutation appears on Y641 (mutations Y/F, Y/N, Y/H, Y/C) [98,100–101]. Another mutation has been identified (A677G and A687V), although these mutants are less prevalent [93,102].

Together this data suggests a causative role for elevated catalytic activity of EZH2 in the development of cancer. The functional consequence of increased EZH2 (either by overexpression or mutations) in cancer tissues includes the silencing of genes that promote differentiation and restrain proliferation.

Nonetheless, a high expression of EZH2 and trimethylation of histone H3 at lysine 27 were sometimes associated with improvements in survival. Thus, increased EZH2 expression is correlated with better overall survival in diffuse large B-cell lymphoma and lung cancer [103,104]. In the same way, a recent report showed that EZH2 serves as a tumor suppressor in myelodysplastic syndromes, which was evidenced by

EZH2 deletions, missense and frameshift mutations [105]. Besides, enhanced trimethylation of H3K27me3 has been correlated with longer overall survival and better prognosis in non-small-cell lung cancer, breast, ovarian and pancreatic cancers [106,107].

Mechanistically, EZH2 is usually believed to function predominately as a transcriptional repressor that silences an array of target genes, including more than 200 tumor suppressors [88,108]. EZH2 is identified as a downstream mediator of the retinoblastoma protein (pRB) pathway–E2F pathway, which controls multiple key cell cycle regulators during cell proliferation in normal and cancer cells [27]. Additionally, EZH2 represses p16, p19 and p15 directly or indirectly, which activates the cyclin D–CDK4/6 complex and promotes progression through G1 phase and cell proliferation [109,110]. Furthermore, enforced expression of EZH2 increases cancer cell proliferation, epithelial–mesenchymal transition, metastatic spreading and other oncogenic properties, whereas its depletion inhibited

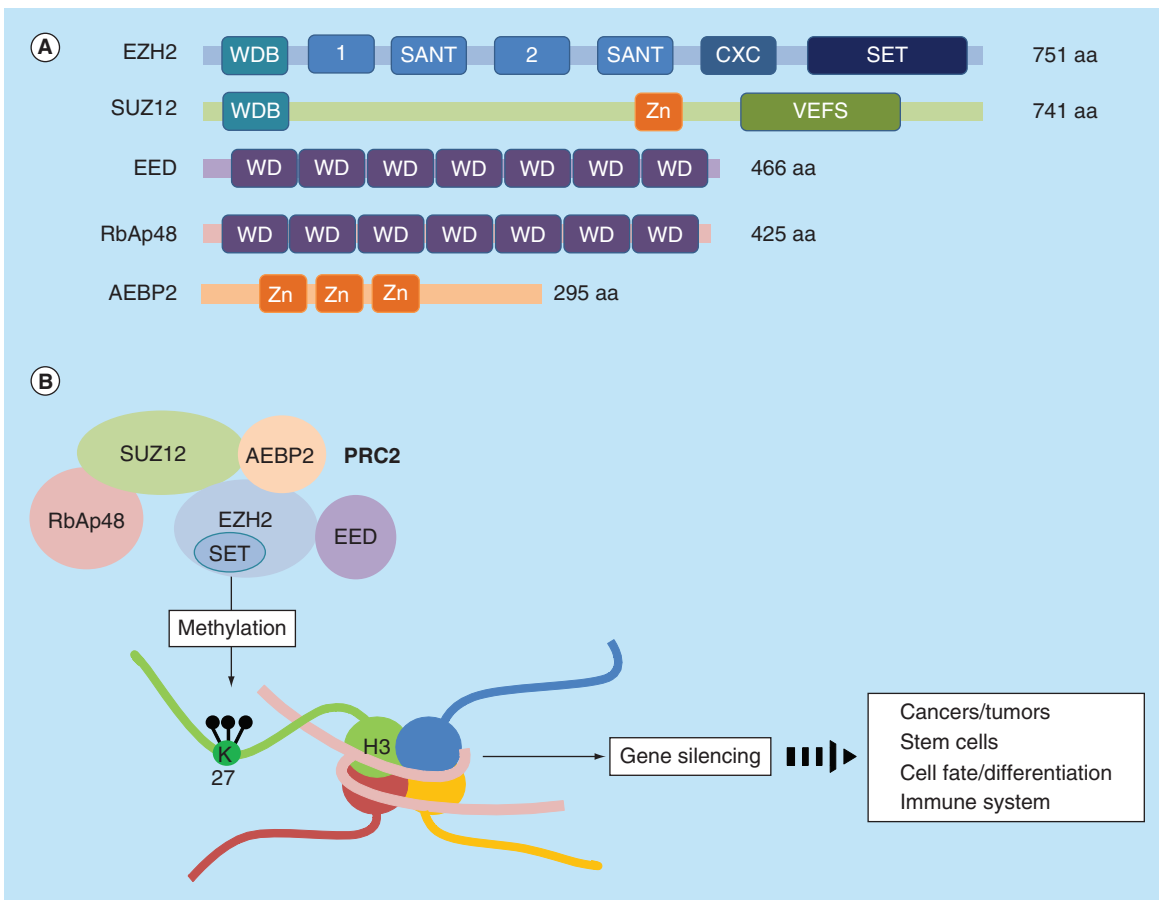


Figure 4. PRC2 complex. (A) Domain organizations of each subunit in the human PRC2 complex. **(B)** The subunits of human PRC2 complexes, their interactions and schematic function of PRC2 are shown. Aa: Amino acid; CXC: Cysteine-rich domain; Domain '1': Binding region for PHF1 in human cells; Domain '2a': Binding region for SUZ12; SANT: Domain that allows chromatin remodeling protein to interact with histones; SET: Catalytic domain of EZH2; VEFS: VRN2-EMF2-FIS2-SUZ12 domain; WD: WD-40 domain; WDB: WD-40 binding domain; Zn: Zn-finger region.

Table 4. Association between EZH2 mutations and disease.		
Mutated domain	Mutation [†]	Phenotype
CXC domain (503–605)	H530N	Acute myeloid leukemia
	C547fs	Acute myeloid leukemia
	Q553X	Acute myeloid leukemia
	C571Y	Myelofibrosis
	C576W	Myelodysplastic syndrome, myeloproliferative neoplasms
	P577L R583X	Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia Chronic myelomonocytic leukemia
SET domain (612–727)	V626M	Werner syndrome
	K639E	Werner syndrome
	Y646N, H, F, C	Diffuse large B-cell lymphoma
	I651F	Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia
	V662fs	Myelodysplastic syndrome
	D644E	Atypical chronic myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, myeloproliferative neoplasms
	D664V	Werner syndrome
	D664fs	Acute megakaryoblastic leukemia
	N673S	Chronic myelomonocytic leukemia
	L647V	Myelodysplastic syndrome, Acute myeloid leukemia
	N675K	Refractory cytopenia with multilineage dysplasia
	V679E	Myelofibrosis
	A682G	Lymphoma
	A682T	Werner syndrome, neuroblastoma
	A682V	Acute myeloid leukemia
	R684C	Werner syndrome, myelofibrosis
	R684H	Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia
	K685fs	Chronic myelomonocytic leukemia
	R690H	Refractory cytopenia with multilineage dysplasia, chronic myelomonocytic leukemia
	R690C	Myelodysplastic syndrome
	A692V	Diffuse large B-cell lymphoma
	N693T	Acute myelomonocytic leukemia
	N693Y	Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, myelofibrosis
	H694Y	Werner syndrome
	H694R	Chronic myelomonocytic leukemia
	S695L	Werner syndrome, Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia
I727fs	Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable	

[†]The sequence is numbered in accordance with EZH2 isoform A and the numbering for some mutations has been transposed from the original references so that all mutations can be referred to relative to the same sequence.
FS: Frameshift; X: Nonsense.

Table 4. Association between EZH2 mutations and disease (cont.).

Mutated domain	Mutation [†]	Phenotype
Other domain	F728fs	Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia
	Y731X	Chronic myelomonocytic leukemia
	Y733fs	Myelodysplastic syndrome
	Y733X	Werner syndrome
	Y741C	Werner syndrome
	V742ins	Acute myeloid leukemia
	V742D	Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia
	I744fs	Acute myeloid leukemia
	E745K	Werner syndrome, lymphoma
	E745fs	Acute myeloid leukemia

[†]The sequence is numbered in accordance with EZH2 isoform A and the numbering for some mutations has been transposed from the original references so that all mutations can be referred to relative to the same sequence.
FS: Frameshift; X: Nonsense.

cell proliferation, migration and invasion and induced cell apoptosis and senescence both *in vitro* and *in vivo* [87,111–112]. Besides, EZH2 could cause a rise in cell migration and invasion in cancer cells by regulating E-cadherin and MMP [113]. Increasing evidence also suggests that aberrant overexpression of EZH2 could contribute to acquired chemotherapeutic resistance in multiple cancers [114–116].

In addition to its role as a transcriptional repressor, several studies have shown that EZH2 may also function in target gene activation [36,117–118]. Recently, Xu *et al.* reported that EZH2 plays an important role in castration-resistant prostate cancer and its oncogenic function does not depend on silencing but rather on transcriptional induction of its target genes [36]. Many of these genes were downregulated upon EZH2 knock-down, suggesting that the role of EZH2 as an activator was independent of the PRC2 complex. This function is hypothesized to be induced by phosphorylation of EZH2 [36,37].

Antagonistic relationship between PRC2 & SWI/SNF

Accumulating evidence has suggested that SWI/SNF chromatin-remodeling complex opposes epigenetic silencing by PcG proteins, and functions as a tumor suppressor in some cancers. This SWI/SNF complex is a multisubunit chromatin remodeling complex that uses the energy of ATP hydrolysis to reposition nucleosomes, thereby regulating access to the DNA and modulating transcription and DNA replication/repair [119].

The activity of the SWI/SNF complex can be counteracted by polycomb group (PcG) proteins [120,121]. This antagonistic relationship between SWI/SNF components and PcG proteins was first uncovered

via genetic studies in *Drosophila*. In 1988, mutations in core components of the SWI/SNF complex were found to suppress defects in body segment identity conferred by mutations in PcG proteins [122]. Later, in the 1990s, it was discovered that the SWI/SNF complex promotes *Hox* gene activation during embryogenesis, while PcG proteins maintain their repression [123,124]. SWI/SNF is also capable of displacing PcG proteins from the INK4a/ARF locus [125].

Furthermore, there seems to be a balanced function between SWI/SNF and PcG. Accumulating evidence raises the possibility that the antagonistic relationship between these two complexes plays an important role in preventing tumor formation in mammals. Intriguingly, while PcG proteins are frequently overexpressed in cancers, specific inactivating mutations of the SWI/SNF complex have been identified in several human cancers [126]. The most compelling case has been that of *SMARCB1* (SNF5), which was discovered to be homozygously inactivated in nearly all rhabdoid tumors (a rare pediatric malignancy) [127]. Interestingly, *SMARCB1*-heterozygous mice develop sarcomas that closely resemble human rhabdoid tumors [128]. Tumorigenesis can be completely suppressed by tissue-specific codeletion of *EZH2*, suggesting an antagonistic interaction between PRC2 and SWI/SNF [129].

EZH2 inhibitors

As described above, most findings have established that EZH2 functions as an important oncogenic biomarker for cancer initiation and progression, thus leading to the hypothesis that blocking EZH2 expression/activity and its downstream signaling cascade may represent a promising strategy for novel anticancer treatment.

That is why several groups have developed small-molecule inhibitors of EZH2 [130]. Over the past few years, several potent inhibitors of EZH2, with various selectivities, have been discovered and demonstrated promising preclinical results (Figure 5 & Table 5).

DZNep as an indirect inhibitor

The first EZH2 inhibitor that was described was a cyclopentanyl analog of 3-deazaadenosine, called 3-deazaneplanocin A (DZNep). It is a cyclopentanyl analog of 3-deazaadenosine that potently inhibits the activity of *S*-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAH), resulting in cellular accumulation of SAH, which in turn represses the *S*-adenosyl-L-methionine-dependent histone lysine methyltransferase activities (Figure 5) [143]. Initially studied for its antiviral properties, recent findings indicate that DZNep is a chromatin-remodeling compound that induces degradation of cellular PRC2 proteins, including EZH2 and concomitant removal of H3K27me3 mark [79,132].

Disruption of EZH2 by DZNep leads to the reactivation of the epigenetically silenced targets. This induces apoptosis, inhibits cell invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity in tumoral cells, but not in normal and untransformed cells at tumor-inhibiting doses [79]. As DZNep has minimal toxicity *in vivo* [144], it may be a promising drug candidate for anticancer treatment. As a result, it has been widely examined as a possible epigenetic therapeutic agent for the treatment of various cancers, including lung cancer [145], gastric cancer [146], myeloma [133], acute myeloid leukemia [132], lymphoma [147] and also chondrosarcoma [91]. DZNep-induced inhibition of EZH2 dramatically diminished the number and self-renewal capacity of cancer cells with tumor-initiating properties and significantly decreased tumor xenograft growth and improved survival [134,148].

DZNep selectively induced apoptosis in cancer cells but not in normal cells by preferential reactivation of genes repressed by PRC2, including the apoptosis effector FBOX32 [79]. EZH2 depletion induced not only cell cycle arrest and apoptosis, but also cell senescence. EZH2 decrease triggered simultaneous remarkable gains of two senescence-associated regulators p16 and p21. These data suggest that DZNep exerts its anticancer roles partially through inducing cell apoptosis and senescence and inhibiting cell proliferation [149]. Interestingly, DZNep also reduces tumoral cell migration and invasion, in part through upregulating E-cadherin [150].

These findings suggested DZNep may be a promising therapeutic agent for cancer treatment through multiple mechanisms. Besides its antitumoral role, DZNep has been reported to modulate allogeneic T-cell responses and may represent a novel therapeutic approach for treat-

ment of graft versus host disease [151]. DZNep also promotes erythroid differentiation of K562 cells, presumably through a mechanism that is not directly related to EZH2 inhibition [152], suggesting that this inhibitor may also be exploited for therapeutic applications for hematological diseases, including anemia.

S-adenosyl-L-methionine-competitive inhibitor

Because DZNep is not totally specific to EZH2, significant efforts have been made over the past few years to obtain compounds that are potent and highly selective for EZH2 (Table 6) [99,138,140–141,153]. To identify inhibitors of EZH2 methyltransferase activity, high-throughput biochemical screening experiments have been performed. Although the structure of the EZH2 active site has not yet been determined, the conserved SET domain architecture predicts two essential binding pockets: one for the *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) methyl donor and another for the Lys27 substrate. Because more than 50 SET domain proteins have been identified in humans thus far, the selectivity of the inhibitors is crucial for minimizing off-target effects [154]. From the end of 2012, several SAM-competitive inhibitors were announced with promising preclinical results (Figure 5 & Table 6) [153].

The compound EPZ005687 has a K_i value of 24 nmol/l and is over 500-fold more selective for EZH2 versus 15 other protein methyltransferases (PMTs) and 50-fold more selective for EZH2 versus the closely related enzyme EZH1 [138]. Interestingly, EPZ005687 can also inhibit H3K27 methylation induced by the EZH2 mutants Y646 and A682 and it has been shown to selectively kill lymphoma cells that are heterozygous for one of these EZH2 mutations, with minimal effect on the proliferation of wild-type cells [138]. Another EZH2 inhibitor developed by Epizyme Inc. (Cambridge, USA) is EPZ-6438 (also called E7438). It shares similar *in vitro* properties (i.e., mechanism of action, specificity and cellular activity) to EPZ005687, but it demonstrates significantly improved pharmacokinetic properties, including good oral bioavailability in animals. Interestingly, oral dosing of EPZ-6438 leads to potent *in vivo* target inhibition and antitumor activity in a SMARCB1-deleted malignant rhabdoid tumor xenograft model (21). The ability of EPZ-6438 to reduce global H3K27Me3 levels was further demonstrated in several other human lymphoma cell lines, including lines expressing either wild-type or mutant EZH2. This compound is currently under study in a Phase I/II trial as a single agent in subjects with advanced solid tumors or with B-cell lymphomas. The primary goal of the Phase I trial is to establish the safety and define the maximal tolerated dose of the drug.

EI1, another inhibitor of EZH2, was developed by Novartis (Basel, Switzerland) [140] and shows very good selectivity with a low K_i value (approximately 13 nmol/l). Loss of the H3K27 methylation function and activation of PRC2 target genes have been observed in EI1-treated cells. EI1 is equally active against both wild-type and the Y646 mutant form of EZH2, and the inhibition of the EZH2 Y646 mutant in B-cell lymphomas decreases the H3K27 methylation level genome-wide and activates PRC2 target genes, leading to decreased proliferation, cell cycle arrest and apoptosis [140].

Another EZH2 inhibitor is GSK126 (developed by GlaxoSmithKline), which has a K_i of 0.5–3 nmol/l [99]. The selectivity of GSK126 for EZH2 is more than 1000-fold higher than its selectivity for 20 other human methyltransferases containing SET or non-SET domains, and it is over 150-fold more selective for EZH2 than for EZH1. McCabe *et al.* showed that the compound GSK126 decreased global methylation at H3K27 and reactivated silenced PRC2 target genes in EZH2-mutant diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) cell lines [99].

Furthermore, this compound effectively inhibited the proliferation of the EZH2-mutant DLBCL cells and suppressed tumor growth in a mouse xenograft model.

UNC1999, an analog of GSK126, is the first orally bioavailable inhibitor that has high *in vitro* potency against wild-type and mutant EZH2 over a broad range of epigenetic and non-epigenetic targets. As with GSK126, UNC1999 potently reduced H3K27me3 levels in cells (IC_{50} <50 nmol/l) and selectively killed DLBCL cell lines harboring the Y646N mutation [141]. However, UNC1999 shows less selectivity for EZH1 than the inhibitors mentioned above.

Stabilized α -helix of EZH2

Most recently, Kim *et al.* developed a peptide called stabilized α -helix of EZH2 (SAH-EZH2), which inhibits EZH2 inhibition by a different mechanism from previous inhibitors [142]. SAH-EZH2 selectively disrupts the contact between EZH2 and EED, another subunit in the PRC2 complex, whereas the other EZH2 inhibitors target the HMT catalytic domain (Figure 5).

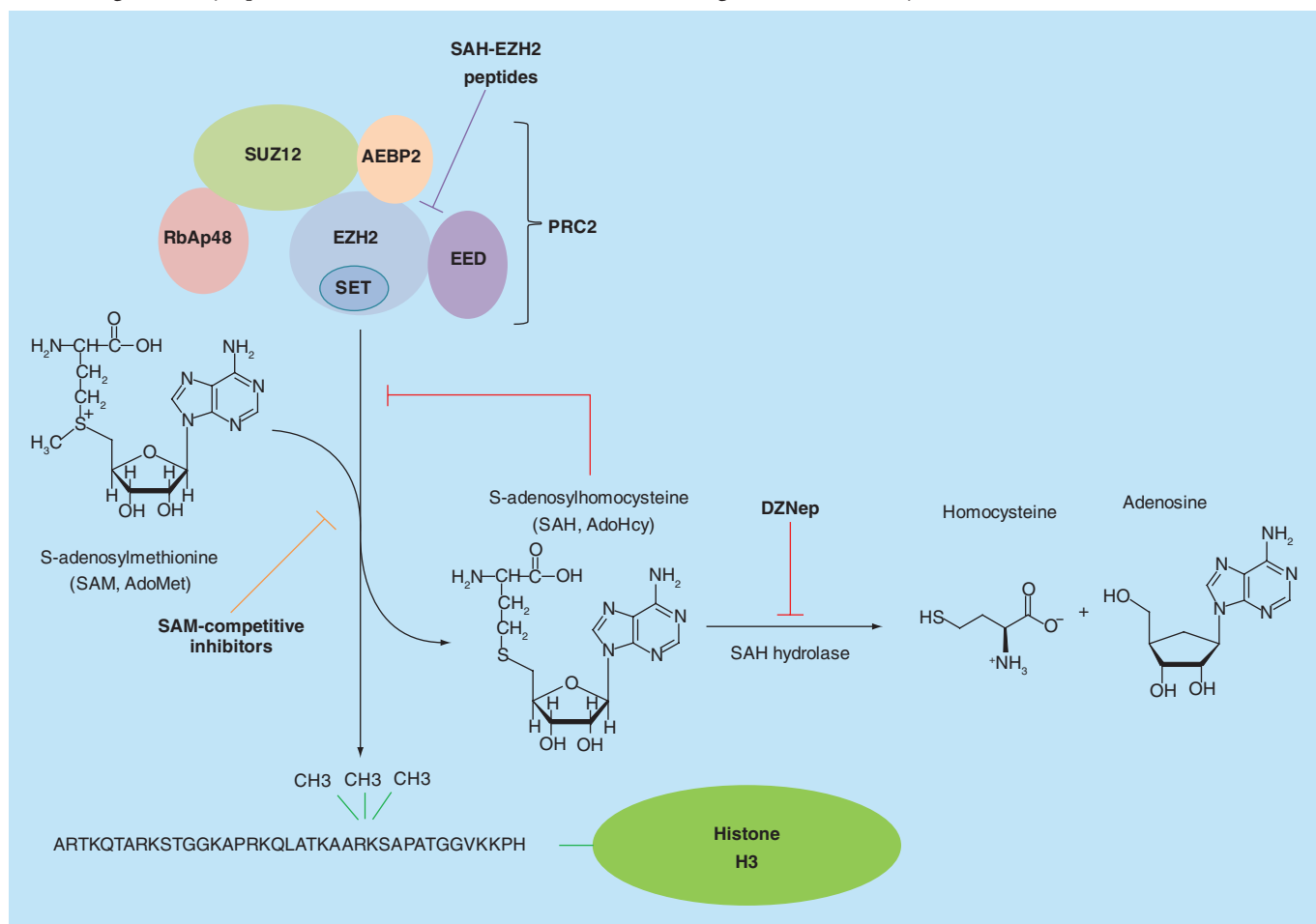
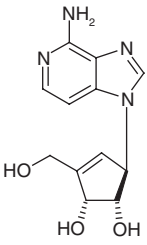
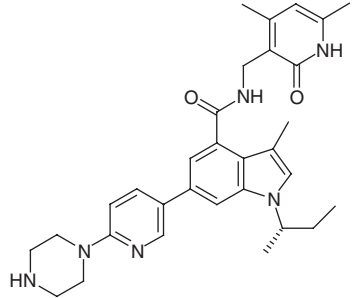
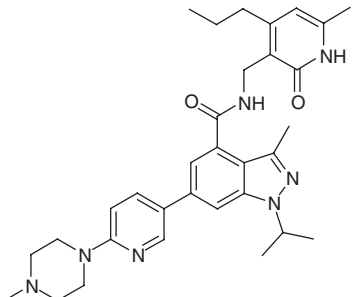
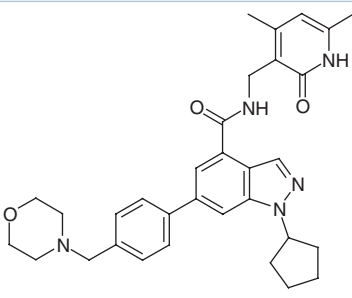
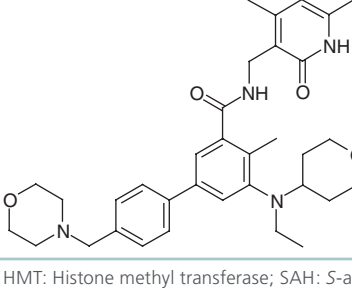
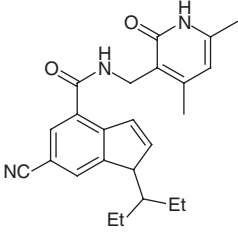
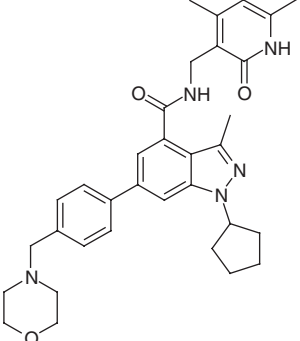


Figure 5. Modes of inhibition of PRC2. Three types of inhibitors are indicated: DZNep as an *S*-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor, *S*-adenosyl-L-methionine competitive inhibitors, and *S*-adenosyl-L-homocysteine-EZH2 peptides as disrupters of the contact between EZH2 and EED.

Table 5. Chemical structures and biochemical data for small-molecule inhibitors of EZH2.

Structure	Compound	Mechanism and potency	Selectivity toward EZH2	Highest clinical status	Ref.
	DZNep	SAH hydrolase inhibitor	Non-selective	Preclinical	[79,131–134]
	GSK126	SAM-competitive inhibitor of PRC2, $K_i = 0.5\text{--}3\text{ nM}$	>1000-fold over 20 other HMTs; over EZH1	Preclinical	[99,135]
	GSK343	SAM-competitive inhibitor of PRC2, $K_i = 0.5\text{--}3\text{ nM}$	$IC_{50} = 4\text{ nM}$ and is over 1000-fold selective for other HMTs except EZH1 (60-fold selectivity)	Preclinical	[136,137]
	EPZ005687	SAM-competitive inhibitor of PRC2, $K_i = 24\text{ nM}$	>500-fold over 15 other HMTs; approximately 50-fold over EZH1	Preclinical	[138]
	EPZ-6438	SAM-competitive inhibitor of PRC2, $K_i = 0.5\text{--}3\text{ nM}$, $IC_{50} = 11\text{ nM}$	35-fold selectivity versus EZH1; >4500-fold selectivity relative to 14 other HMTs	Phase I/II	[139]

HMT: Histone methyl transferase; SAH: S-adenosyl-L-homocysteine; SAM: S-adenosyl-L-methionine.

Table 5. Chemical structures and biochemical data for small-molecule inhibitors of EZH2 (cont.).					
Structure	Compound	Mechanism and potency	Selectivity toward EZH2	Highest clinical status	Ref.
	E11	SAM-competitive inhibitor of PRC2 IC ₅₀ = 15 nM; K _i = 13 nM		Preclinical	[140]
	UNC1999	SAM-competitive inhibitor of PRC2 IC ₅₀ = 2–15 nM; K _i = 13 nM	Over 1000-fold selective for other HMTs except EZH1 (22-fold selectivity)	Preclinical	[141]
Peptide: FSSNRXKILXRTQILNQEWKQRRIQPV	Stabilized α-helix of EZH2 peptide (SAH-EZH2)	Hydrocarbon-stapled peptide that mimics the α-helical EED-binding domain of EZH2, disrupting the EZH2–EED complex	Not selective for EZH1	Preclinical	[142]

HMT: Histone methyl transferase; SAH: S-adenosyl-L-homocysteine; SAM: S-adenosyl-L-methionine.

As in the case of GSK126, SAH-EZH2 decreases the H3K27 trimethylation level, resulting in growth arrest of PRC2-dependent MLL-AF9 leukemia cells (Table 6).

Future perspective

Due to frequent activation of *EZH2* in cancers, these new targeted therapies hold exciting promise in the clinic. Indeed, as discussed above, several reports have shown that genetic silencing and pharmacologic inhibition of EZH2-induced cell apoptosis, inhibited cell invasion and tumor angiogenesis, ultimately suppressed cancer growth and progression [155,156]. More importantly, given the advantages of specific chemical compounds, including convenience to use and the reversible nature of epigenetic modifications, behind carcinogenesis, administration of small molecules targeting EZH2 seems to be a plausible and appealing as a novel anti-cancer strategy [157]. However, the down-regulation of EZH2 causes the hepatocytes to become more susceptible to lipid accumulation and inflammation. Significantly, from a translational point of view, because EZH2 inhibitors are potential and promising

drugs useful in the treatment of various types of cancer, the patients who will be eventually treated with them should be monitored for the induction of non-alcoholic fatty liver disease as a potential side effect [158].

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at www.future-science.com/doi/full/10.4155/FMC.14.123.

Financial & competing interests disclosure

Research by the authors is supported by Cancéropole Nord-Ouest, Conseil Régional de Basse-Normandie, La Ligue Contre le Cancer, and Société Française de Rhumatologie (SFR). N Girard is a recipient of a fellowship from Conseil regional de Basse-Normandie. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

Histone modifications & histone code

- Post-translational modifications of histone play a major role in transcriptional control and normal development and are tightly regulated (histone code).

Role of the lysine methyltransferase EZH2

- H3K27 methylation is a major epigenetic mark, related to gene silencing, and its control by histone methyltransferases (EZH2) and histone demethylases (JMJD3 and UTX) and is a major regulator of cell physiology (reprogramming, cell differentiation, immune system, cancers, etc.).
- EZH2 is overexpressed or mutated in numerous types of cancers.

EZH2 inhibitors

- EZH2 inhibitors are promising anticancer drugs.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest; •• of considerable interest

- 1 Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765), 41–45 (2000).
- One of the first papers about the concept of the ‘histone code’.
- 2 Marks H, Kalkan T, Menafra R *et al.* The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* 149(3), 590–604 (2012).
- 3 Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21(3), 381–395 (2011).
- 4 Black JC, Van Rechem C, Whetstone JR. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol. Cell* 48(4), 491–507 (2012).
- An excellent review about the discovery, characterization and regulation of the lysine methyltransferase (KMTs) and lysine demethylase (KDMs).
- 5 Tan M, Luo H, Lee S *et al.* Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146(6), 1016–1028 (2011).
- 6 Wozniak GG, Strahl BD. Hitting the “mark”: interpreting lysine methylation in the context of active transcription. *Biochim. Biophys. Acta* doi:10.1016/j.bbagr.2014.03.002 (2014) (Epub ahead of print).
- 7 Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447(7143), 407–412 (2007).
- 8 Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14(11), 1025–1040 (2007).
- 9 Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K *et al.* Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120(2), 169–181 (2005).
- 10 Schubeler D, MacAlpine DM, Scalzo D *et al.* The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* 18(11), 1263–1271 (2004).
- 11 Pokholok DK, Harbison CT, Levine S *et al.* Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122(4), 517–527 (2005).
- 12 Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ *et al.* Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419(6905), 407–411 (2002).
- 13 Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96(26), 14967–14972 (1999).
- 14 Rao B, Shibata Y, Strahl BD, Lieb JD. Dimethylation of histone H3 at lysine 36 demarcates regulatory and nonregulatory chromatin genome-wide. *Mol. Cell. Biol.* 25(21), 9447–9459 (2005).
- 15 Wagner EJ, Carpenter PB. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 13(2), 115–126 (2012).
- 16 Lee J-S, Shilatifard A. A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation. *Mutat. Res.* 618(1–2), 130–134 (2007).
- 17 Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AHA *et al.* Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.* 13(14), 1192–1200 (2003).
- 18 Rougeulle C, Chaumeil J, Sarma K *et al.* Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Mol. Cell. Biol.* 24(12), 5475–5484 (2004).
- 19 Escamilla-Del-Arenal M, da Rocha ST, Spruijt CG *et al.* Cdy1, a new partner of the inactive X chromosome and potential reader of H3K27me3 and H3K9me2. *Mol. Cell. Biol.* 33(24), 5005–5020 (2013).
- 20 Molina-Serrano D, Schiza V, Kirmizis A. Cross-talk among epigenetic modifications: lessons from histone arginine methylation. *Biochem. Soc. Trans.* 41(3), 751–759 (2013).
- 21 Migliori V, Phalke S, Bezzi M, Guccione E. Arginine/lysine-methyl/methyl switches: biochemical role of histone arginine methylation in transcriptional regulation. *Epigenomics* 2(1), 119–137 (2010).
- 22 Lorenzo AD, Bedford MT. Histone arginine methylation. *FEBS Lett.* 585(13), 2024–2031 (2011).
- 23 Petrossian TC, Clarke SG. Uncovering the human methyltransferasome. *Mol. Cell Proteomics* 10(1), M110.000976 (2011).
- 24 Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 13(5), 343–357 (2012).

- 25 Kooistra SM, Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 13(5), 297–311 (2012).
- 26 Hublitz P, Albert M, Peters AHFM. Mechanisms of transcriptional repression by histone lysine methylation. *Int. J. Dev. Biol.* 53(2–3), 335–354 (2009).
- 27 Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* 22(20), 5323–5335 (2003).
- 28 Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M *et al.* The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419(6907), 624–629 (2002).
- **First paper to identify the role of EZH2 in cancer.**
- 29 Collett K, Eide GE, Arnes J *et al.* Expression of enhancer of zeste homolog 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 12(4), 1168–1174 (2006).
- 30 Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K *et al.* EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J. Clin. Oncol.* 24(2), 268–273 (2006).
- 31 Kleer CG, Cao Q, Varambally S *et al.* EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100(20), 11606–11611 (2003).
- 32 Weikert S, Christoph F, Köllermann J *et al.* Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *Int. J. Mol. Med.* 16(2), 349–353 (2005).
- 33 Albert M, Helin K. Histone methyltransferases in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21(2), 209–220 (2010).
- 34 Agger K, Christensen J, Cloos PAC, Helin K. The emerging functions of histone demethylases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18(2), 159–168 (2008).
- 35 Kirmizis A, Bartley SM, Kuzmichev A *et al.* Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev.* 18(13), 1592–1605 (2004).
- 36 Xu K, Wu ZJ, Groner AC *et al.* EZH2 oncogenic activity in castration resistant prostate cancer cells is polycomb-independent. *Science* 338(6113), 1465–1469 (2012).
- 37 Kim E, Kim M, Woo D-H *et al.* Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* 23(6), 839–852 (2013).
- 38 Kogure M, Takawa M, Saloura V *et al.* The oncogenic polycomb histone methyltransferase EZH2 methylates lysine 120 on histone H2B and competes ubiquitination. *Neoplasia* 15(11), 1251–1261 (2013).
- 39 Chu C-S, Lo P-W, Yeh Y-H *et al.* O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111(4), 1355–1360 (2014).
- 40 Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol. Cell* 15(1), 57–67 (2004).
- 41 Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzarini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J.* 23(20), 4061–4071 (2004).
- 42 Sewalt RG, van der Vlag J, Gunster MJ *et al.* Characterization of interactions between the mammalian polycomb-group proteins Enx1/EZH2 and EED suggests the existence of different mammalian polycomb-group protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* 18(6), 3586–3595 (1998).
- 43 Denisenko O, Shnyreva M, Suzuki H, Bomsztyk K. Point mutations in the WD40 domain of EED block its interaction with EZH2. *Mol. Cell. Biol.* 18(10), 5634–5642 (1998).
- 44 Margueron R, Reinberg D. The polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469(7330), 343–349 (2011).
- 45 Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 12(9), 599–612 (2012).
- 46 Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6(11), 846–856 (2006).
- 47 O’Carroll D, Erhardt S, Pagani M, Barton SC, Surani MA, Jenuwein T. The polycomb-group gene EZH2 is required for early mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 21(13), 4330–4336 (2001).
- 48 Shen X, Liu Y, Hsu Y-J *et al.* EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol. Cell* 32(4), 491–502 (2008).
- 49 Pereira CF, Piccolo FM, Tsubouchi T *et al.* ESCs require PRC2 to direct the successful reprogramming of differentiated cells toward pluripotency. *Cell Stem Cell* 6(6), 547–556 (2010).
- 50 Zhang M, Wang F, Kou Z, Zhang Y, Gao S. Defective chromatin structure in somatic cell cloned mouse embryos. *J. Biol. Chem.* 284(37), 24981–24987 (2009).
- 51 Villasante A, Piazzolla D, Li H, Gomez-Lopez G, Djabali M, Serrano M. Epigenetic regulation of Nanog expression by EZH2 in pluripotent stem cells. *Cell Cycle* 10(9), 1488–1498 (2011).
- 52 Ding X, Wang X, Sontag S *et al.* The polycomb protein EZH2 impacts on iPS cell generation. *Stem Cells Dev.* 23(9), 931–940 (2013).
- 53 Neri F, Zippo A, Krepelova A, Cherubini A, Rocchigiani M, Oliviero S. Myc regulates the transcription of the PRC2 gene to control the expression of developmental genes in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 32(4), 840–851 (2012).
- 54 Fragola G, Germain P-L, Laise P *et al.* Cell reprogramming requires silencing of a core subset of polycomb targets. *PLoS Genet.* 9(2), e1003292 (2013).
- 55 Müller J, Hart CM, Francis NJ *et al.* Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* 111(2), 197–208 (2002).
- 56 Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirootta V. *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111(2), 185–196 (2002).

- 57 Cao R, Wang L, Wang H *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298(5595), 1039–1043 (2002).
- Shows that Polycomb and H3K27me3 are associated with gene silencing.
- 58 Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, Reinberg D. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol. Cell* 14(2), 183–193 (2004).
- 59 Chen Y-H, Hung M-C, Li L-Y. EZH2: a pivotal regulator in controlling cell differentiation. *Am. J. Transl Res.* 4(4), 364–375 (2012).
- 60 Caretti G, Di Padova M, Micales B, Lyons GE, Sartorelli V. The Polycomb EZH2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* 18(21), 2627–2638 (2004).
- 61 Juan AH, Kumar RM, Marx JG, Young RA, Sartorelli V. Mir-214-dependent regulation of the polycomb protein EZH2 in skeletal muscle and embryonic stem cells. *Mol. Cell* 36(1), 61–74 (2009).
- 62 Wong CF, Tellam RL. MicroRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste homolog 2 during myogenesis. *J. Biol. Chem.* 283(15), 9836–9843 (2008).
- 63 Palacios D, Mozzetta C, Consalvi S *et al.* TNF/p38 α /polycomb signaling to Pax7 locus in satellite cells links inflammation to the epigenetic control of muscle regeneration. *Cell Stem Cell* 7(4), 455–469 (2010).
- 64 Marchesi I, Fiorentino FP, Rizzolio F, Giordano A, Bagella L. The ablation of EZH2 uncovers its crucial role in rhabdomyosarcoma formation. *Cell Cycle* 11(20), 3828–3836 (2012).
- 65 Woodhouse S, Pugazhendhi D, Brien P, Pell JM. EZH2 maintains a key phase of muscle satellite cell expansion but does not regulate terminal differentiation. *J. Cell Sci.* 126(Pt 2), 565–579 (2013).
- 66 Juan AH, Derfoul A, Feng X *et al.* Polycomb EZH2 controls self-renewal and safeguards the transcriptional identity of skeletal muscle stem cells. *Genes Dev.* 25(8), 789–794 (2011).
- 67 Acharyya S, Sharma SM, Cheng AS *et al.* TNF inhibits notch-1 in skeletal muscle cells by EZH2 and DNA methylation mediated repression: implications in duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE* 5(8), e12479 (2010).
- 68 Wei Y, Chen Y-H, Li L-Y *et al.* CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nat. Cell Biol.* 13(1), 87–94 (2011).
- 69 Wu H, Whitfield TW, Gordon JA *et al.* Genomic occupancy of Runx2 with global expression profiling identifies a novel dimension to control of osteoblastogenesis. *Genome Biol.* 15(3), R52 (2014).
- 70 Wang L, Jin Q, Lee J-E, Su I, Ge K. Histone H3K27 methyltransferase EZH2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(16), 7317–7322 (2010).
- 71 Hobert O, Sures I, Ciossek T, Fuchs M, Ullrich A. Isolation and developmental expression analysis of Enx-1, a novel mouse Polycomb group gene. *Mech. Dev.* 55(2), 171–184 (1996).
- 72 Raaphorst FM, van Kemenade FJ, Blokzijl T *et al.* Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 157(3), 709–715 (2000).
- 73 Fukuyama T, Otsuka T, Shigematsu H *et al.* Proliferative involvement of ENX-1, a putative human polycomb group gene, in haematopoietic cells. *Br. J. Haematol.* 108(4), 842–847 (2000).
- 74 Hobert O, Jallal B, Ullrich A. Interaction of Vav with ENX-1, a putative transcriptional regulator of homeobox gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 16(6), 3066–3073 (1996).
- 75 Su I-H, Basavaraj A, Krutchinsky AN *et al.* EZH2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat. Immunol.* 4(2), 124–131 (2003).
- 76 Beguelin W, Popovic R, Teater M *et al.* EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell* 23(5), 677–692 (2013).
- 77 Tumes DJ, Onodera A, Suzuki A *et al.* The polycomb protein EZH2 regulates differentiation and plasticity of CD4⁽⁺⁾ T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity* 39(5), 819–832 (2013).
- 78 Raaphorst FM, Meijer CJLM, Fieret E *et al.* Poorly differentiated breast carcinoma is associated with increased expression of the human polycomb group EZH2 gene. *Neoplasia* 5(6), 481–488 (2003).
- 79 Tan J, Yang X, Zhuang L *et al.* Pharmacologic disruption of polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* 21(9), 1050–1063 (2007).
- First article to demonstrate that DZNep, an inhibitor of EZH2, induces apoptosis in tumoral cells.
- 80 Suvà M-L, Riggi N, Janiszewska M *et al.* EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res.* 69(24), 9211–9218 (2009).
- 81 Kodach LL, Jacobs RJ, Heijmans J *et al.* The role of EZH2 and DNA methylation in the silencing of the tumour suppressor RUNX3 in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31(9), 1567–1575 (2010).
- 82 Takawa M, Masuda K, Kunizaki M *et al.* Validation of the histone methyltransferase EZH2 as a therapeutic target for various types of human cancer and as a prognostic marker. *Cancer Sci.* 102(7), 1298–1305 (2011).
- 83 Varambally S, Cao Q, Mani R-S *et al.* Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 322(5908), 1695–1699 (2008).
- 84 Wagener N, Macher-Goeppinger S, Pritsch M *et al.* Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 10, 524 (2010).
- 85 Croonquist PA, Van Ness B. The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH 2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype. *Oncogene* 24(41), 6269–6280 (2005).
- 86 Yu J, Yu J, Rhodes DR *et al.* A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res.* 67(22), 10657–10663 (2007).

- 87 Chase A, Cross NCP. Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin. Cancer Res.* 17(9), 2613–2618 (2011).
- 88 Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat. Res.* 647(1–2), 21–29 (2008).
- 89 Velichutina I, Shaknovich R, Geng H *et al.* EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood* 116(24), 5247–5255 (2010).
- 90 Sellers WR, Loda M. The EZH2 polycomb transcriptional repressor – a marker or mover of metastatic prostate cancer? *Cancer Cell* 2(5), 349–350 (2002).
- 91 Girard N, Bazille C, Lhuissier E *et al.* 3-deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells. *PLoS ONE* 9(5), e98176 (2014).
- 92 Kunju LP, Cookingham C, Toy KA, Chen W, Sabel MS, Kleer CG. EZH2 and ALDH-1 mark breast epithelium at risk for breast cancer development. *Mod. Pathol.* 24(6), 786–793 (2011).
- 93 McCabe MT, Graves AP, Ganji G *et al.* Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109(8), 2989–2994 (2012).
- 94 Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ *et al.* Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476(7360), 298–303 (2011).
- 95 Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G *et al.* Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat. Genet.* 43(9), 830–837 (2011).
- 96 Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW *et al.* Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(49), 20980–20985 (2010).
- 97 Wigle TJ, Knutson SK, Jin L *et al.* The Y641C mutation of EZH2 alters substrate specificity for histone H3 lysine 27 methylation states. *FEBS Lett.* 585(19), 3011–3014 (2011).
- 98 Yap DB, Chu J, Berg T *et al.* Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* 117(8), 2451–2459 (2011).
- 99 McCabe MT, Ott HM, Ganji G *et al.* EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492(7427), 108–112 (2012).
- 100 Bödör C, Grossmann V, Popov N *et al.* EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood* 122(18), 3165–3168 (2013).
- 101 Bödör C, O’Riain C, Wrench D *et al.* EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia* 25(4), 726–729 (2011).
- 102 Majer CR, Jin L, Scott MP *et al.* A687V EZH2 is a gain-of-function mutation found in lymphoma patients. *FEBS Lett.* 586(19), 3448–3451 (2012).
- 103 Lee HJ, Shin DH, Kim KB *et al.* Polycomb protein EZH2 expression in diffuse large B-cell lymphoma is associated with better prognosis in patients treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. *Leuk. Lymphoma* 55(9), 2056–2063 (2014).
- 104 Li Z, Xu L, Tang N *et al.* The polycomb group protein EZH2 inhibits lung cancer cell growth by repressing the transcription factor Nrf2. *FEBS Lett.* 588(17), 3000–3300 (2014).
- 105 Nikoloski G, Langemeijer SMC, Kuiper RP *et al.* Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 42(8), 665–667 (2010).
- 106 Chen X, Song N, Matsumoto K *et al.* High expression of trimethylated histone H3 at lysine 27 predicts better prognosis in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 43(5), 1467–1480 (2013).
- 107 Wei Y, Xia W, Zhang Z *et al.* Loss of trimethylation at lysine 27 of histone H3 is a predictor of poor outcome in breast, ovarian, and pancreatic cancers. *Mol. Carcinog.* 47(9), 701–706 (2008).
- 108 Chang C-J, Hung M-C. The role of EZH2 in tumour progression. *Br. J. Cancer* 106(2), 243–247 (2012).
- 109 Zhong J, Min L, Huang H *et al.* EZH2 regulates the expression of p16 in the nasopharyngeal cancer cells. *Technol. Cancer Res. Treat.* 12(3), 269–274 (2013).
- 110 Kheradmand Kia S, Solaimani Kartalaei P, Farahbakhshian E, Pourfarzad F, von Lindern M, Verrijzer CP. EZH2-dependent chromatin looping controls INK4a and INK4b, but not ARF, during human progenitor cell differentiation and cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* 2(1), 16 (2009).
- 111 Ferraro A, Mourtzoukou D, Kosmidou V *et al.* EZH2 is regulated by ERK/AKT and targets integrin alpha2 gene to control epithelial-mesenchymal transition and anoikis in colon cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45(2), 243–254 (2013).
- 112 Smits M, Nilsson J, Mir SE *et al.* miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget* 1(8), 710–720 (2011).
- 113 Shin YJ, Kim J-H. The role of EZH2 in the regulation of the activity of matrix metalloproteinases in prostate cancer cells. *PLoS ONE* 7(1), e30393 (2012).
- 114 Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD. Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase EZH2. *Clin. Cancer Res.* 14(21), 6790–6796 (2008).
- 115 Zhang Y, Liu G, Lin C, Liao G, Tang B. Silencing the EZH2 gene by RNA interference reverses the drug resistance of human hepatic multidrug-resistant cancer cells to 5-Fu. *Life Sci.* 92(17–19), 896–902 (2013).
- 116 Hu S, Yu L, Li Z *et al.* Overexpression of EZH2 contributes to acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol. Ther.* 10(8), 788–795 (2010).
- 117 Lee ST, Li Z, Wu Z *et al.* Context-specific regulation of NF- κ B target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol. Cell* 43(5), 798–810 (2011).
- 118 Shi B, Liang J, Yang X *et al.* Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 27(14), 5105–5119 (2007).

- 119 Wilson BG, Roberts CWM. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11(7), 481–492 (2011).
- 120 Shao Z, Raible F, Mollaaghababa R *et al.* Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* 98(1), 37–46 (1999).
- 121 Francis NJ, Saurin AJ, Shao Z, Kingston RE. Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol. Cell* 8(3), 545–556 (2001).
- 122 Kennison JA, Tamkun JW. Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85(21), 8136–8140 (1988).
- 123 Tamkun JW, Deuring R, Scott MP *et al.* Brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68(3), 561–572 (1992).
- 124 Kennison JA. The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu. Rev. Genet.* 29, 289–303 (1995).
- 125 Kia SK, Gorski MM, Giannakopoulos S, Verrijzer CP. SWI/SNF mediates polycomb eviction and epigenetic reprogramming of the INK4b-ARF-INK4a locus. *Mol. Cell. Biol.* 28(10), 3457–3464 (2008).
- 126 Shain AH, Pollack JR. The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers. *PLoS ONE* 8(1), e55119 (2013).
- 127 Versteeg I, Sévenet N, Lange J *et al.* Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394(6689), 203–206 (1998).
- 128 Roberts CW, Galusha SA, McMenamin ME, Fletcher CD, Orkin SH. Haploinsufficiency of Snf5 (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97(25), 13796–13800 (2000).
- 129 Wilson BG, Wang X, Shen X *et al.* Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18(4), 316–328 (2010).
- 130 Verma SK, Knight SD. Recent progress in the discovery of small-molecule inhibitors of the HMT EZH2 for the treatment of cancer. *Future Med. Chem.* 5(14), 1661–1670 (2013).
- 131 Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB *et al.* DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol. Cancer Ther.* 8(6), 1579–1588 (2009).
- 132 Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A *et al.* Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 114(13), 2733–2743 (2009).
- 133 Xie Z, Bi C, Cheong LL *et al.* Determinants of sensitivity to DZNep induced apoptosis in multiple myeloma cells. *PLoS ONE* 6(6), e21583 (2011).
- 134 Chiba T, Suzuki E, Negishi M *et al.* 3-Deazaneplanocin A is a promising therapeutic agent for the eradication of tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 130(11), 2557–2567 (2012).
- 135 Van Aller GS, Pappalardi MB, Ott HM *et al.* Long residence time inhibition of EZH2 in activated polycomb repressive complex 2. *ACS Chem. Biol.* 9(3), 622–629 (2014).
- 136 Amatangelo MD, Garipov A, Li H, Conejo-Garcia JR, Speicher DW, Zhang R. Three-dimensional culture sensitizes epithelial ovarian cancer cells to EZH2 methyltransferase inhibition. *Cell Cycle* 12(13), 2113–2119 (2013).
- 137 Verma SK, Tian X, LaFrance LV *et al.* Identification of potent, selective, cell-active inhibitors of the histone lysine methyltransferase EZH2. *ACS Med. Chem. Lett.* 3(12), 1091–1096 (2012).
- 138 Knutson SK, Wigle TJ, Warholic NM *et al.* A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat. Chem. Biol.* 8(11), 890–896 (2012).
- 139 Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y *et al.* Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* 13(4), 842–854 (2014).
- 140 Qi W, Chan H, Teng L *et al.* Selective inhibition of EZH2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109(52), 21360–21365 (2012).
- 141 Konze KD, Ma A, Li F *et al.* An orally bioavailable chemical probe of the lysine methyltransferases EZH2 and EZH1. *ACS Chem. Biol.* 8(6), 1324–1334 (2013).
- 142 Kim W, Bird GH, Neff T *et al.* Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer. *Nat. Chem. Biol.* 9(10), 643–650 (2013).
- 143 Glazer RI, Hartman KD, Knode MC *et al.* 3-Deazaneplanocin: a new and potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its effects on human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135(2), 688–694 (1986).
- 144 Bray M, Driscoll J, Huggins JW. Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral Res.* 45(2), 135–147 (2000).
- 145 Kikuchi J, Takashina T, Kinoshita I *et al.* Epigenetic therapy with 3-deazaneplanocin A, an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, inhibits growth of non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 78(2), 138–143 (2012).
- 146 Cheng LL, Itahana Y, Lei ZD *et al.* TP53 genomic status regulates sensitivity of gastric cancer cells to the histone methylation inhibitor 3-deazaneplanocin A (DZNep). *Clin. Cancer Res.* 18(15), 4201–4212 (2012).
- 147 Fiskus W, Rao R, Balusu R *et al.* Superior efficacy of a combined epigenetic therapy against human mantle cell lymphoma cells. *Clin. Cancer Res.* 18(22), 6227–6238 (2012).
- 148 Benoit YD, Witherspoon MS, Laursen KB *et al.* Pharmacological inhibition of polycomb repressive complex-2 activity induces apoptosis in human colon cancer stem cells. *Exp. Cell Res.* 319(10), 1463–1470 (2013).
- 149 Li Z, Wang Y, Qiu J *et al.* The polycomb group protein EZH2 is a novel therapeutic target in tongue cancer. *Oncotarget* 4(12), 2532–2549 (2013).

- 150 Liu L, Xu Z, Zhong L *et al.* EZH2 promotes tumor cell migration and invasion via epigenetic repression of E-cadherin in renal cell carcinoma. *BJU Int.* doi:10.1111/bju.12702 (2014) (Epub ahead of print).
- 151 He S, Wang J, Kato K *et al.* Inhibition of histone methylation arrests ongoing graft-versus-host disease in mice by selectively inducing apoptosis of alloreactive effector T cells. *Blood* 119(5), 1274–1282 (2012).
- 152 Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A *et al.* 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of s-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, promotes erythroid differentiation. *J. Biol. Chem.* 289(12), 8121–8134 (2014).
- 153 Tan J, Yan Y, Wang X, Jiang Y, Xu HE. EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 35(2), 161–174 (2014).
- 154 Copeland RA, Solomon ME, Richon VM. Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8(9), 724–732 (2009).
- 155 Crea F, Hurt EM, Mathews LA *et al.* Pharmacologic disruption of Polycomb repressive complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer. *Mol. Cancer.* 10, 40 (2011).
- 156 Chen Y, Lin MC, Yao H *et al.* Lentivirus-mediated RNA interference targeting enhancer of zeste homolog 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth through down-regulation of stathmin. *Hepatol. Baltim. Md.* 46(1), 200–208 (2007).
- 157 Crea F, Fornaro L, Bocci G *et al.* EZH2 inhibition: targeting the crossroad of tumor invasion and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 31(3–4), 753–761 (2012).
- 158 Vella S, Gnani D, Crudele A *et al.* EZH2 down-regulation exacerbates lipid accumulation and inflammation in *in vitro* and *in vivo* NAFLD. *Int. J. Mol. Sci.* 14(12), 24154–24168 (2013).
- 159 Su IH, Basavaraj A, Krutchinsky AN, *et al.* Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat. Immunol.* 4(2), 124–131 (2003).

79 Boulevard Yves Guillou
14000 Caen
eva.lhuissier@wanadoo.fr
0631827590
28 ans

EA7451 BioConnect
Université de Caen Normandie
CHU Niveau 3
14032 Caen Cedex

Diplômes et Formations

- 2014-2017 **Doctorat « Aspect moléculaire et cellulaire de la biologie », en cours de préparation**, Université de Caen Normandie
- 2015 **Diplôme Universitaire Expérimentation animale appliquée à la recherche biomédicale** niveau 1, Université de Caen Normandie
- 2014 **Master Sciences Biomédicales**, Université de Caen Basse Normandie. Mention Bien
- 2012 **Licence Biologie Physiologie animale**, Université de Caen Basse Normandie

Expériences professionnelles

Recherche :

2013 - ... **EA7451 BioConnect, Université de Caen Normandie**

Octobre 2014 - ... : **Doctorat**

Financement : Allocation de recherche du Ministère de la Recherche (MENRT)

Sujet : Chondrosarcomes : Mécanismes de résistance aux traitements et thérapies innovantes

Directeurs de thèse : Catherine Baugé et Karim Boumediene

Septembre à Juin 2014 : **Master 2 Recherche**

Sujet : Rôle de HIF et de l'hypoxie sur le comportement des chondrosarcomes

Avril à Juin 2013 : **Master 1**

Sujet : Chondrosarcomes : physiopathologie et thérapies innovantes

2012 **EA2608 OeReCa, Université de Caen (1 semaine)**

Sujet : Découverte du laboratoire

Enseignement et encadrement :

2015/2016 64h de Travaux Pratiques (Physiologie et Biologie animale Licence 1 et Licence 2), IBFA, Unicaen

2014 Encadrement d'étudiants de licence, lycée et collège

2017 Membre du comité du suivi de thèse de Julie Schwartz et Aimen Al Mahjoub

Vulgarisation scientifique :

2015 Intervention dans le collège St Exupéry de l'académie de Caen en association avec Relais d'Sciences

2014/2016 Maître de stage de deux binômes de collégien/lycéen dans le cadre de l'opération « Arbre de Connaissance »

2017 Finaliste au concours "Ma thèse en 180 secondes"

Formations continues

- 2017 **Préparation au concours "Ma these en 180 secondes"**, Relais d'Sciences, Caen
- 2017 **Préparation à l'entretien d'embauche**, Collège des écoles doctorales
- 2017 **International Communication in English**, Collège des écoles doctorales
- 2016 **Préparation à la recherche d'emploi**, Collège des écoles doctorales
- 2015 **International Communication in English**, Collège des écoles doctorales
- 2015 **Formation à la mission d'enseignement**, Collège des écoles doctorales
- 2015 **Se former à la médiation scientifique**, Relais d'Sciences, Caen

- 2015 **Formation théorique et pratique sur le cytomètre Gallios**, Université de Caen Basse Normandie
2015 **Financement et Management de projets de recherche**, Collège des écoles doctorales
2015 **Carrières et Management**, Collège des écoles doctorales
2013 **Hygiène et Sécurité : Risques spécifiques et généraux dans les laboratoires de biologie et chimie**, Unicaen
2013 **Formation à l'utilisation de l'irradiateur X RAD 225 Cx**, Ganil

Bourses et Prix

Bourses :

- 2017 : Bourse de voyage par la SFBBM pour la participation au Beatson International Cancer Conference, Glasgow, Ecosse
Bourse de voyage par le Cancéropôle Nord-Ouest pour les 10^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville
- 2016 : Bourse de voyage par l'IUBMB pour la participation aux 16th IUBMB Young Scientists Program et aux 16th IUBMB Conference Signalling Pathways in Development, Disease and Aging, Vancouver Canada
Subvention par l'EDNBise (Ecole doctorale) pour la participation aux 16th IUBMB Young Scientists Program et aux 16th IUBMB Conference Signalling Pathways in Development, Disease and Aging, Vancouver Canada
Bourse de voyage par le Cancéropôle Nord-Ouest pour les 9^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville
- 2015 : Subvention pour la participation à la formation du DU Expérimentation animale niveau 1 par l'EDNBise
Bourse de voyage par le Cancéropôle Nord-Ouest pour les 8^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville
- 2014 : Bourse de voyage par le Cancéropôle Nord-Ouest pour les 7^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville

Prix :

- 2015 : Deuxième prix de la meilleure communication affichée lors des journées de l'EDNBise

Compétences

Biologie cellulaire : culture cellulaire (normoxie, hypoxie, bille d'alginate), irradiation des cellules (Rayons X), étude de l'apoptose, cytométrie en flux (cycle cellulaire, analyse et quantification protéiques, prolifération cellulaire), étude de la migration cellulaire (test de blessure), transfection (nucléofection et lipofectamine)

Biochimie : extraction de protéines (totales, cytoplasmiques et nucléaires), western blot, test Elisa

Biologie moléculaire : extraction ARN, Reverse Transcriptase, PCR en temps réel, extraction d'ADN plasmidique, analyse de données de transcriptomique

In vivo : injection en intrapéritonéale, comportement animal, implantation tumorale en sous-cutanée dans des souris nude, suivi des tumeurs

Informatique : FlowJo vX 0.7, Kalusa, Zotero, ImageJ, bioinformatics tools (DAVID, GeneSpring, STRING)

Langues : Français (Natif) Anglais (Niveau intermédiaire oral et écrit)

Compétences transversales : Word, Excel, PowerPoint, recherches bibliographiques, rédaction de rapport, travail en équipe

Publications

Articles et revues à comité de lecture

Girard N, Aury-Landas J, Cauvard O, **Lhuissier E**, Bazille C, Baugé C, Boumediene K. New insight into chondrosarcoma response to irradiations. (soumis à Cancer Letters)

Lhuissier E, Bazille C, Aury-Landas J, Girard N, Pontin J, Boittin M, Boumediene K, Baugé C. Identification of an easy-to use 3D culture model to investigate invasion and anticancer drug response in chondrosarcomas. BMC Cancer 2017 17:490.

Baugé C, **Lhuissier E**, **Girard N**, **Quesnelle C**, Ewert G, **Boumediene K**. Anti-inflammatory effects of an injectable copolymer of fatty acids (Ara 3000 beta®) in joint diseases. J Inflammation 2015 Feb; 12:17.

Baugé C, Bazille C, Girard N, **Lhuissier E**, Boumediene K. Histone methylases as novel drug targets. *Future Med Chem* 2014;6(17):1943-65. (revue)

Baugé C, Girard N, **Lhuissier E**, Bazille C, Boumediene K. Regulation and role of transforming growth factor (TGF) beta signalling pathway in aging joint and osteoarthritis. *Aging Dis.* 2014 Dec 17;5(6):394-405. (revue)

Girard N, Bazille C, **Lhuissier E**, Bénateau H, Llombart-Bosch A, Boumediene K, Baugé C. 3-deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells. *PLoS One* 2014 22;9(5):e98176.

Articles en préparation

Lhuissier E*, Girard N*, Aury-Landas J*, Bazille C, Repesse Y, Bouet V, Boittin M, Fréret T, Boumediene K, Baugé C. The antitumoral effect of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-Deazaneplanocin A, does not require EZH2 inhibition in chondrosarcomas.

*** Les auteurs ont contribué de façon équitable à ce travail**

Lhuissier E, Allas L, Aury-Landas J, Boumediene K, Baugé C. Impact of H3K27 demethylase inhibitor GSKJ4 on chondrosarcoma cells in combination with cisplatin.

Lhuissier E, Bouet V, Aury-Landas J, Bazille C, Fréret T, Boumediene K, Baugé C. Effect of chronic injections of S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaneplanocin A on male immunocompetent mouse: Behaviour and tissue analysis.

Lhuissier E, Aury-Landas J, Boittin M, Baugé C, Boumediene K. Hypoxia differentially modulates the response of chondrosarcomas to cisplatin.

Lhuissier E, Aury-Landas J, Boittin M, Boumediene K, Baugé C. The S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-Deazaneplanocin A (DZNep) enhances the response to platinum-based therapy in chondrosarcomas.

Communications orales

* correspond aux communications que j'ai présentées

Congrès internationaux

***Lhuissier E**, Girard N, Aury-Landas J, Coulbault L, Baugé C, Boumediene K. Impact of hypoxia on the response of chondrosarcomas to cisplatin. 16th IUBMB Young Scientists Program, Vancouver, BC, Canada, July 15-16, 2016.

Girard N, Bazille C, **Lhuissier E**, Boumediene K, Baugé C. Inhibitors of the histone methylase EZH2, a new anti-tumoral therapy? 3rd World Congress on Cancer Science & Therapy. San Francisco, USA October 21-23, 2013.

Congrès nationaux

***Lhuissier E**, Aury-Landas J, Laurent C, Baugé C, Boumediene K. Is the resistance of chondrosarcomas to cisplatin linked to hypoxia? Journée annuelle de l'EdNBISE 2017. Le Havre, 16-17 mars 2017.

***Lhuissier E**, Girard N, Bouet V, Fréret T, Repesse Y, Bazille C, Boumediene K et Baugé C. Effet anti-tumoral du DZNep dans les chondrosarcomes humains : Approche mécanistique et effet in vivo. BIOSARC 2016. Strasbourg, 6-7 octobre 2016.

***Lhuissier E**, Aury-Landas J, Coulbault L, Baugé C et Boumediene K. La résistance des chondrosarcomes aux traitements conventionnels est-elle liée à l'hypoxie? Journée Normande de Recherche Biomédicale. Rouen, 16 septembre 2016.

***Lhuissier E**, Allas L, Bazille C, Boumediene K, Baugé C. GSK-J4 : Nouvel agent chimiothérapeutique contre les chondrosarcomes. Journée annuelle de l'EdNBISE 2016. Caen, 10-11 mars 2016.

Aury-Landas J, Girard N, Barreau M, **Lhuissier E**, Boumediene K, Baugé C. Base moléculaires de la résistance aux rayons X dans les chondrosarcomes. 28ème congrès français de rhumatologie. Paris, 13-15 décembre 2015.

***Lhuissier E**, Girard N, Aury-Landas J, Bazille C, Baugé C, Boumediene K. Influence de l'hypoxie sur le métabolisme et la résistance aux traitements des chondrosarcomes. BIOSARC 2015. Paris, 8-9 octobre 2015.

Girard N, Bazille C, **Lhuissier E**, Aury-Landas J, Boumediene K, Baugé C. Utilisation du 3-deazaneplanocin A (DZNep) comme stratégie innovante pour le traitement des chondrosarcomes. BIOSARC 2015. Paris, 8-9 octobre 2015.

Girard N, Bazille C, **Lhuissier E**, Bénateau H, Boumediene K, Bauge C. L'histone méthyl-transférase EZH2, une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des chondrosarcomes de haut grade ? 27ème congrès français de rhumatologie. Paris, 7-9 décembre 2014.

***Lhuissier E**, Girard N, Bazille C, Boumediene K, Bauge C. Rôle du facteur HIF-2 sur le métabolisme et la réponse aux traitements des chondrosarcomes. Symposium « Métabolisme de la cellule tumorale et de ses cibles thérapeutiques ». Caen, 6-7 novembre 2014.

Girard N, Bazille C, **Lhuissier E**, Bouet C, Benateau H, Freret T, Boumediene K, Bauge C. Le 3-deazaneplanocin A (DZNep), un inhibiteur de l'histone méthyl-transférase EZH2, réduit la croissance des chondrosarcomes in vitro et in vivo. Symposium « Métabolisme de la cellule tumorale et de ses cibles thérapeutiques ». Caen, 6-7 novembre 2014.

Girard N, Bazille C, **Lhuissier E**, Benateau H, Boumediene K, Bauge C. Epigenetic therapy: a treatment for chondrosarcoma? 14th FEBS Young Scientists' Forum (YSF). Paris 27-30 août 2014.

Bazille C, Girard N, **Lhuissier E**, Llombart-Bosch A, Rochcongar G, Bénateau H, Boumediene K, Bauge C. Thérapie épigénétique avec le 3-Deazaneplanocin (DZNep), inhibiteur de l'histone méthyl-transférase EZH2, traitement futur des chondrosarcomes de haut grade ? 6ème journée de la Recherche. Caen, 18 juin 2014.

Girard N, Cauvard O, Bazille C, **Lhuissier E**, Batalla A, Boumediene K, Bauge C. Etude comparative de la sensibilité des chondrosarcomes aux agents endommageant l'ADN. BioSarc 2013 : 2ème journée française dédiée à la Biologie des SARComes. Nantes, 17-18 septembre 2013.

Communications affichées

Congrès internationaux

***Lhuissier E**, Aury-Landas J, Coulbault L, Bauge C, Boumediene K. Is the resistance of chondrosarcomas to cisplatin linked to hypoxia? Beatson International Cancer Conference, Glasgow Ecosse, 2-5 July 2017.

***Lhuissier E**, Girard N, Aury-Landas J, Coulbault L, Bauge C, Boumediene K. Impact of hypoxia on the response of chondrosarcomas to cisplatin. 29th Annual meeting of the European MusculoSkeletal Oncology Society (EMSOS), La Baule, 25-27 mai 2016 and 16th IUBMB Conference Signalling Pathways in Development, Disease and Aging. Vancouver Canada, 17-21 July 2016.

Aury-Landas J, Girard N, Barreau M, **Lhuissier E**, Bazille C, Boumediene K, Bauge C. Whole-exome sequencing strategy to unravel molecular mechanisms of resistance to conventional therapies in chondrosarcomas. 29th Annual meeting of the European MusculoSkeletal Oncology Society (EMSOS), La Baule, 25-27 mai 2016.

Aury-Landas J, Girard N, Barreau M, **Lhuissier E**, Boumediene K, Bauge C. Molecular basis of resistance of chondrosarcomas to conventional therapies. ESHG 2016, European Society of Human Genetics, Barcelona Espagne, 21-24 May 2016.

Bazille C, Girard N, Aury-Landas J, **Lhuissier E**, Boumediene K, Bauge C. 3-deazaneplanocin (DNZep), a new epigenetic treatment for chondrosarcomas ? EACR Conference series 2015 "Basic Epigenetic Mechanisms in Cancer". Berlin Germany, 8-11 November 2015.

Girard N, Bazille C, **Lhuissier E**, Aury-Landas J, Boumediene K, Bauge C. 3-deazaneplanocin A (DZNep), a new molecule to treat chondrosarcomas ? 23rd International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Congress and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Foz do Iguacu Brésil, 24-28 August 2015.

Aury-Landas J, Girard N, Barreau M, **Lhuissier E**, Bauge C, Boumediene K. Comparative study of response of chondrosarcomas to x-rays, and correlation with their genetic characterizations. 23rd International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Congress and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Foz do Iguacu Brésil, 24-28 August 2015.

Girard N, **Lhuissier E**, Cauvard O, Batalla A, Bazille C, Boumédiène K, Baugé C. Hadrontherapy by carbon ions, an innovative approach to treat chondrosarcomas. Japanese Society of Medical Oncology 2015 Annual Meeting (JSMO2015), Sapporo Japan, 16-18 July 2015.

Aury-Landas J, Barreau M, Girard N, **Lhuissier E**, Boumediene K, Bauge C. Molecular characterization of commonly used chondrosarcoma cell lines. The European Human Genetics Conference 2015 (ESHG). Glasgow UK, 6-9 June 2015.

Girard N, **Lhuissier E**, Cauvard O, Batalla A, Bazille C, Boumédiène K, Baugé C. Comparative study of the sensitivity of chondrosarcoma to DNA damaging agents. FEBS-EMBO 2014 congress. Paris, 30 August - 4 September 2014.

Girard N, Bazille C, **Lhuissier E**, Bénateau H, Boumédiène K, Baugé C. Epigenetic therapy: a promising treatment for chondrosarcoma? FEBS-EMBO 2014 congress. Paris, 30 August - 4 September 2014.

Lhuissier E, Girard N, Cauvard O, Bazille C, Bénateau H, Batalla A, Llombart-Bosch A, Baugé C, Boumediene K. Comparative study of chondrosarcomas response to DNA damage. Impact of HIF2 expression. 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR). Munich Germany, 5-8 July 2014.

Girard N, Bazille C, **Lhuissier E**, Bénateau H, Llombart-Bosch A, Boumediene K, Baugé C. 3-deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of histone methyltransferase EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells. 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR). Munich Germany, 5-8 July 2014.

Congrès nationaux

***Lhuissier E**, Aury-Landas J, Girard N, Bazille C, Boittin M, Bouet V, Fréret T, Repesse Y, Boumediene K et Baugé C. L'effet anti-tumoral du 3-Deazaneplanocin A, un inhibiteur de la S-Adénylhomocystéine hydrolase, est indépendant de sa capacité à inhiber l'histone méthyltransférase EZH2 dans les chondrosarcomes. 10^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, 10-12 Mai 2017.

Lhuissier E, Aury-Landas J, Girard N, Bazille C, Boumédiène K, Baugé C. Is the histone methylase EZH2 a good target to treat chondrosarcomas? EPIBREST 2016. Brest, 8-9 décembre 2016.

***Lhuissier E**, Girard N, Aury-Landas J, Bazille C, Repesse Y, Bouet V, Fréret T, Boumediene K et Baugé C. Effet anti-tumoral du DZNep dans les chondrosarcomes humains : Approche mécanistique et effet in vivo. Journée Normande de Recherche Biomédicale. Rouen, 16 septembre 2016.

Aury-Landas J, Girard N, Barreau M, **Lhuissier E**, Rousseau S, Rovelet-Lecrux A, Campion D, Boumediene K, Baugé C. Validation de l'utilisation de lignées cellulaires pour l'étude de la résistance aux traitements dans les chondrosarcomes. Journée Normande de Recherche Biomédicale. Rouen, 16 septembre 2016.

***Lhuissier E**, Aury-Landas J, Coulbault L, Baugé C, Boumediene K. Impact de l'hypoxie sur la réponse des chondrosarcomes aux traitements conventionnels. 9^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, 18-20 mai 2016.

***Lhuissier E**, Allas L, Bazille C, Boumediene K, Baugé C. L'inhibition pharmacologique de la méthylation de H3K27 réduit la croissance des chondrosarcomes. 9^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, 18-20 mai 2016.

Aury-Landas J, Girard N, Barreau M, **Lhuissier E**, Boumediene K, Baugé C. Identification de gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux traitements conventionnels dans les chondrosarcomes par une approche de génomique fonctionnelle comparative. 9^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, 18-20 mai 2016.

Aury-Landas J, Girard N, Barreau M, **Lhuissier E**, Boumediene K, Baugé C. Comparative study of response of chondrosarcomas to X-rays. Correlation with their genetic background. BIOSARC 2015. Paris, 8-9 octobre 2015.

Girard N, **Lhuissier E**, Aury-Landas J, Cauvard O, Bazille C, Baugé C, Boumediene K. Réponse des chondrosarcomes aux irradiations par rayons X et ions carbone. 8^{ème} Journée Scientifique du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, 10-12 juin 2015.

Aury-Landas J, Barreau M, Girard N, **Lhuissier E**, Boumediene K, Bauge C. Caractérisation moléculaire de lignées cellulaires dérivées de chondrosarcomes humains. 8^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, 10-12 juin 2015.

***Lhuissier E**, Girard N, Aury-Landas J, Bazille C, Boumediene K, Baugé C. Régulation d'EZH2 par les radiations ionisantes dans les cellules cartilagineuses normales et tumorales. 8èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, 10-12 juin 2015.

Aury-Landas J, Barreau M, Girard N, **Lhuissier E**, Boumediene K, Bauge C. Identification, par séquençage d'exomes, de mutations potentiellement impliquées dans la résistance aux rayons X dans cinq lignées cellulaires dérivées de chondrosarcomes humains. 7ème Journée de la Recherche du CHU de Caen. Caen, 3 juin 2015.

***Lhuissier E**, Girard N, Aury-Landas J, Bazille C, Bauge C, Boumediene K. Rôle de l'hypoxie sur la résistance des chondrosarcomes à la chimiothérapie et à la radiothérapie. 7ème Journée de la Recherche du CHU de Caen. Caen, 3 juin 2015.

***Lhuissier E**, Girard N, Cauvard O, Bazille C, Baugé C, Boumediene K. Rôle de l'hypoxie sur le métabolisme et la réponse aux traitements des chondrosarcomes. Journée annuelle de l'EdNBISE 2015. Rouen, 26-27 mars 2015.

Girard N, **Lhuissier E**, Cauvard O, Bazille C, Aury-Landas J, Baugé C, Boumediene K. Réponse des chondrosarcomes aux irradiations aux rayons X et aux ions carbone. Radiation in oncology. Nantes, 12 mars 2015.

***Lhuissier E**, Girard N, Cauvard O, Bazille C, Baugé C, Boumediene K. Rôle de l'hypoxie sur la réponse aux traitements des chondrosarcomes par irradiation aux rayons X. Radiation in oncology. Nantes, 12 mars 2015.

***Lhuissier E**, Girard N, Bazille C, Baugé C, Boumediene K. Rôle de HIF2 dans les mécanismes de résistance des chondrosarcomes à la chimiothérapie. 7ème journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, 14-16 mai 2014.

Girard N, **Lhuissier E**, Cauvard O, Batalla A, Bazille C, Boumédiene K, Baugé C. Etude comparative de la sensibilité des chondrosarcomes aux agents endommageant l'ADN. 7èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, 14-16 mai 2014.

Bazille C, Girard N, **Lhuissier E**, Llombart-Bosch A, Rochcongar G, Bénateau H, Boumediene K, Baugé C. La thérapie épigénétique avec le 3-Deazaneplanocin A (DZNep), inhibiteur de l'histone méthyl-transférase EZH2, induit l'apoptose et réduit la migration cellulaire des chondrosarcomes. 7èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, 14-16 mai 2014.

Girard N, Cauvard O, **Lhuissier E**, Batalla A, Bazille C, Boumédiene K, Baugé C. Etude comparative de la sensibilité des chondrosarcomes aux agents endommageant l'ADN. 6ème journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, 15-17 mai 2013.

CHONDROSARCOME : MECANISMES DE RESISTANCE AUX TRAITEMENTS CONVENTIONNELS ET THERAPIES INNOVANTES

Les chondrosarcomes sont des tumeurs malignes osseuses, considérés comme radio- et chimio-résistants, du fait de leur environnement hypoxique. Dans ce contexte, cette étude vise à mieux comprendre le rôle de l'hypoxie dans la résistance de ces tumeurs à la chimiothérapie (cisplatine) et à la radiothérapie (rayons X) et à identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de sensibiliser les chondrosarcomes aux traitements, par un ciblage épigénétique de la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27).

Dans un premier temps, nous avons montré que, contrairement à ce qui est communément admis, l'hypoxie n'a pas d'effet sur la sensibilité au cisplatine ou aux rayons X dans certains chondrosarcomes alors qu'il augmente la résistance au cisplatine et la sensibilité aux rayons X uniquement dans une lignée de chondrosarcome. Dans un second temps, nous avons montré que le 3-deazaneplanocine A (DZNep) induit l'apoptose dans ces tumeurs, par un mécanisme indépendant de la méthylation de H3K27 et de sa méthylase EZH2 et semblerait agir par la voie Rho β /EGFR. Cependant, il provoque des effets secondaires sur la fertilité masculine. Par ailleurs, son association avec le cisplatine potentialise ses effets toxiques sur les chondrosarcomes. Le GSK-J4, quant à lui ralentit la croissance cellulaire des chondrosarcomes et son association avec le cisplatine augmente cet effet.

Cette étude souligne que les chondrosarcomes possèdent des mécanismes de régulation cellulaires différents, d'où l'importance de mener des études sur plusieurs lignées cellulaires afin de mieux prédire la réponse aux traitements. De plus, ces travaux démontrent les propriétés anti-tumorales du DZNep et du GSK-J4 dans le traitement de ces tumeurs.

Mots clés : Chondrosarcome, Chimiothérapie, Radiothérapie, Hypoxie, Résistance, Epigénétique, Histone déméthylase, Histone méthyltransférase

CHONDROSARCOMA: RESISTANCE MECHANISMS TO CONVENTIONAL TREATMENTS AND INNOVATIVE THERAPIES

Chondrosarcomas are bone malignant tumors, considered as radio- and chemo-resistant, due to their hypoxic environment. In this context, this study aimed to better understand the role of hypoxia in the resistance of these tumors to chemotherapy (cisplatin) and radiotherapy (X-rays) and to identify new therapeutic strategies to re-sensitize chondrosarcomas by epigenetic targeting of H3K27 methylation.

First, we showed that, contrary to what is commonly accepted, hypoxia has differential effect on cisplatin or X-ray sensitivity in chondrosarcomas, while it increases cisplatin resistance and X-ray sensitivity only in one cell line. Secondly, 3-deazaneplanocin A (DZNep) induces apoptosis in these tumors by a mechanism independent of H3K27 methylation and its methylase EZH2 and seems to act through the Rho β / EGFR pathway. However, it causes side effects on male fertility. In addition, its association with cisplatin potentiates its toxic effects on chondrosarcomas. The GSK-J4, on the other hand, decreases cell growth and its association with cisplatin increases this effect.

This study highlights that chondrosarcomas use different cellular regulation mechanisms, showing the importance of conducting studies on several cell lines in order to better predict the response to treatments. In addition, these studies demonstrate the anti-tumoral properties of DZNep and GSK-J4 in the treatment of these tumors.

Keywords: Chondrosarcoma, Chemotherapy, Radiotherapy, Hypoxia, Resistance, Epigenetics, Histone demethylase, Histone methyltransferase