



HAL
open science

Rôles de la méthyltransférase EZH2 et de la déméthylase JMJD3 sur la régulation de la marque H3K27me3 dans le cancer de la prostate

Anna Sanchez

► **To cite this version:**

Anna Sanchez. Rôles de la méthyltransférase EZH2 et de la déméthylase JMJD3 sur la régulation de la marque H3K27me3 dans le cancer de la prostate. Cancer. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC042 . tel-04000608

HAL Id: tel-04000608

<https://theses.hal.science/tel-04000608v1>

Submitted on 22 Feb 2023

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ –
AGRONOMIE – ENVIRONNEMENT

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Épigénétique et Cancer

Par :

Anna SANCHEZ

**RÔLES DE LA MÉTHYLTRANSFÉRASE EZH2 ET DE LA
DÉMÉTHYLASE JMJD3 SUR LA RÉGULATION DE LA
MARQUE H3K27ME3 DANS LE CANCER DE LA PROSTATE**

Soutenue publiquement le 28 avril 2022, devant la commission d'examen :

Président : Pr Luc GAUDREAU, Département de Biologie de l'Université de
Sherbrooke, Québec

Directeur de thèse : Pr Laurent GUY, CHU Gabriel-Montpied, INSERM U1240,
Clermont-Ferrand

Rapporteurs : Dr Catherine BAUGÉ, Université de Caen, Normandie
Pr Luc GAUDREAU, Département de Biologie de l'Université de
Sherbrooke, Québec

Membre : Dr Dominique BERNARD-GALLON, Centre Jean-Perrin, INSERM
U1240, C

Résumé

Le cancer de la prostate est le deuxième cancer le plus fréquent chez l'homme dans le monde. Les changements épigénétiques en réponse à des événements externes (alimentation, activités sportives, etc.) et internes sont de plus en plus impliqués dans l'initiation et la progression des tumeurs. La dérégulation des mécanismes épigénétiques conduit à une modification de la compaction de la chromatine et par conséquent, de l'expression de gènes ayant potentiellement un pouvoir oncogène ou suppresseur de tumeur. Cette thèse s'intéresse aux modifications post-traductionnelles des histones et, plus particulièrement, à la tri méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) dans le cancer de la prostate. H3K27me3 est une marque épigénétique répressive souvent sous- ou surexprimée dans un large éventail de cancers. Trois acteurs régulent la méthylation de H3K27: La méthyltransférase EZH2 et les déméthylases JMJD3 et UTX. Premièrement, grâce à l'utilisation d'épidrogues et de siARNs dirigés spécifiquement contre ces trois acteurs, nous avons montré *in vitro* qu'EZH2, JMJD3 et UTX étaient impliquées dans la régulation des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2*, précédemment établis comme étant une signature génique du cancer de la prostate. Cette étude *in vitro* a également permis de mettre en évidence un possible lien entre EZH2, JMJD3 et le récepteur aux androgènes. Ensuite, H3K27me3 et EZH2 étant largement étudiées, notre étude s'est focalisée sur JMJD3. Après inhibition de JMJD3 *in vivo* par son inhibiteur chimique, GSK-J4, nous avons obtenu une augmentation de la croissance tumorale dans les xénogreffes RA- et à une diminution dans les xénogreffes RA+, ajoutant une preuve d'un possible lien entre le récepteur aux androgènes et JMJD3. La caractérisation des altérations épigénétiques comme l'expression aberrante de H3K27me3 dans le cancer de la prostate est indispensable pour identifier de nouveaux marqueurs de diagnostic. La compréhension du rôle de H3K27me3, EZH2, JMJD3 et UTX dans la progression tumorale prostatique reste importante en vue de l'utilisation d'épidrogues qui pourrait prochainement devenir une nouvelle stratégie thérapeutique.

Mots clés: Epigénétique, Cancer de la prostate, JMJD3, EZH2, H3K27me3, Épidrogues

Abstract

Prostate cancer is the second most common cancer among men in the world. Epigenetic changes in response to external (diet, sports activities, etc.) and internal events are increasingly implicated in tumor initiation and progression. The deregulation of epigenetic mechanisms leads to a modification of chromatin compaction and, consequently, of gene expression with oncogenic or tumor suppressor potential. In this thesis, we focused on post-translational changes in histones and, more particularly, the tri methylation of lysine from histone 3 (H3K27me3) mark, a repressive epigenetic mark often under- or overexpressed in a wide range of cancers. Three actors regulate H3K27 methylation: EZH2 methyltransferase and JMJD3 and UTX demethylases. First, using epidrugs and siRNAs specifically directed against these three actors, we showed *in vitro* that EZH2, JMJD3 and UTX were involved in the regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* and *RPS6KA2* genes, previously established as a gene signature in prostate cancer. This *in vitro* study also revealed a possible link between EZH2, JMJD3 and the androgen receptor. Then, H3K27me3 and EZH2 being widely studied, our study focused on JMJD3. JMJD3 inhibition *in vivo* contributed to an increase in tumor growth in AR- xenografts and a decrease in AR+, providing further evidence of a possible link between the androgen receptor and JMJD3. Characterization of epigenetic alterations such as aberrant H3K27me3 expression in prostate cancer is essential to identify new diagnostic markers. Understanding the role of H3K27me3, EZH2, JMJD3 and UTX on prostate tumor progression is important because the use of epidrugs may soon become a new therapeutic strategy.

Keywords: Epigenetics, Prostate cancer JMJD3, EZH2, H3K27me3, Epidrugs

« Il ne saurait exister pour la science de vérité acquise. Le savant n'est pas l'homme qui fournit les vraies réponses; c'est celui qui fournit les vraies questions. »

Claude Lévy Strauss

Financements

Cette thèse, intitulée « RÔLES DE LA MÉTHYLTRANSFÉRASE EZH2 ET DE LA DÉMÉTHYLASE JMJD3 SUR LA RÉGULATION DE LA MARQUE H3K27ME3 DANS LE CANCER DE LA PROSTATE » a été financée par :

L'Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate



et

La ligue contre le cancer



Avant-propos

Les travaux de cette thèse ont été réalisés sous la direction de Pr. GUY Laurent, également encadrés par la Dr. BERNARD-GALLON Dominique. Ces travaux ont été réalisés dans le département d'Oncogénétique du Centre Jean-Perrin dirigé par le Pr. BIGNON Yves-Jean, au sein de l'unité de recherche INSERM IMoST U1240 - UCA.

Ces travaux de thèse et les autres projets du laboratoire auxquels j'ai participé ont donné lieu aux publications et communications suivantes :

Articles Publiés

1. **Sanchez**, A.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. Effects of GSK-J4 on JMJD3 Histone Demethylase in Mouse Prostate Cancer Xenografts. *Cancer Genomics Proteomics* **2022**, 19, 339–349, doi:10.21873/cgp.20324.
2. **Sanchez**, A.; Houfah Khoufah, F.Z.; Idrissou, M.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. The Functions of the Demethylase JMJD3 in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 968, doi:10.3390/ijms22020968.
3. Idrissou, M.; Boisnier, T.; **Sanchez**, A.; Houfah Khoufah, F.Z.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Bernard-Gallon, D. Implementation of the TIP60/P400/H4K12ac Structure in Breast Cancer Cell Lines. *OMICS* **2020**, doi:10.1089/omi.2020.0196.
4. Houfah Khoufah, F.Z.; **Sanchez**, A.; Idrissou, M.; Boisnier, T.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. Role of UTX Histone Demethylase in Regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2* Genes in Prostate Cancer Cell Lines. *OMICS* **2021**, 25, 129–131, doi:10.1089/omi.2020.0183.
5. Idrissou, M.; Boisnier, T.; **Sanchez**, A.; Khoufah, F.Z.H.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Bernard-Gallon, D. TIP60/P400/H4K12ac Plays a Role as a Heterochromatin Back-up Skeleton in Breast Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* **2020**, 17, 687–694, doi:10.21873/cgp.20223.
6. Idrissou, M.; Lebert, A.; Boisnier, T.; **Sanchez**, A.; Houfah Khoufah, F.Z.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Bernard-Gallon, D. Digging Deeper into Breast Cancer Epigenetics: Insights from Chemical Inhibition of Histone Acetyltransferase TIP60 In Vitro. *OMICS* **2020**, 24, 581–591, doi:10.1089/omi.2020.0104.

7. **Sanchez**, A.; El Ouardi, D.; Houfak Khoufak, F.Z.; Idrissou, M.; Boisnier, T.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. Role of JMJD3 Demethylase and Its Inhibitor GSK-J4 in Regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* Genes in Prostate Cancer Cell Lines. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **2020**, *24*, 505–507, doi:10.1089/omi.2020.0054.
8. Idrissou, M.; **Sanchez**, A.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Bernard-Gallon, D. Epi-Drugs as Triple-Negative Breast Cancer Treatment. *Epigenomics* **2020**, *12*, 725–742, doi:10.2217/epi-2019-0312.
9. El Ouardi, D.; Idrissou, M.; **Sanchez**, A.; Penault-Llorca, F.; Guy, L.; Bignon, Y.-J.; Bernard-Gallon, D. The Inhibition of the Histone Methyltransferase EZH2 by DZNEP or SiRNA Demonstrates Its Involvement in *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* Gene Regulation in Prostate Cancer. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **2020**, *24*, 116–118.
10. Idrissou, M.; Judes, G.; Daures, M.; **Sanchez**, A.; El Ouardi, D.; Besse, S.; Degoul, F.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Bernard-Gallon, D. TIP60 Inhibitor TH1834 Reduces Breast Cancer Progression in Xenografts in Mice. *OMICS* **2019**, *23*, 457–459, doi:10.1089/omi.2019.0126.

Communications Scientifiques Orales

2020: 9th ARTP annual meeting – Paris – Prostate benign hyperplasia and cancer: From basic research to clinical practice: «Impact of JMJD3 demethylase on prostate tumor growth»

Communications Orales et Affichées par Poster

2021 : Forum de la recherche en cancérologie - CLARA Cancéropôle Lyon Auvergne-Rhône-Alpes : **Sanchez A, Bignon YJ, Penault-Llorca F, Guy L, Bernard-Gallon D, « Impact de la déméthylase JMJD3 sur la croissance tumorale prostatique »**

2021 : 24èmes Journées de l'École Doctorale SVSAE. **Sanchez A, Bignon YJ, Penault-Llorca F, Guy L, Bernard-Gallon D. «Role of JMJD3 demethylase and its inhibitor GSK-J4 in *in vivo* tumor progression».**

ABRÉVIATIONS

5mC: 5-méthylcytosine

5hmC: 5-hydroxyméthylcytosine

5fC: 5-formylcytosine

5caC: 5-carboxylcytosine

A

ADRB2: adrenergic receptor, beta-2

AFU : association française d'urologie

AIP : atrophie inflammatoire proliférative

AEBP2: adipocyte enhancer-binding protein 2

AKT: serine/threonine protein kinase

ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation

AR: androgen receptor

ARV7: androgen receptor variant 7

ASAP: atypical small acinar proliferation

ATAD2: ATPase Family AAA Domain Containing 2

B

BPH1 : l'hyperplasie bénigne de la prostate

BRCA1: breast cancer 1

BRCA2: breast cancer 2

BRIP1: BRCA1 Interacting Helicase 1

C

CDKN2A: cyclin dependent kinase inhibitor 2A

CIRC : centre international de recherche sur le cancer

CREB: AMPc Response Element-binding

D

DAB2IP: disabled homolog 2-interacting protein

DDT: dichlorodiphényltrichloroéthane

DHT: dihydrotestostérone

DLC1: deleted in liver cancer 1

DNMT: ADN méthyltransférase

Dot1: histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific

DZNeP: 3-Deazaneplanocin

E

E2: 17 β -oestradiol

EED: embryonic ectoderm development

EPHB2: Ephrin type-B receptor 2

Era α : récepteur d'œstrogène α

ERG: ETS-related gene

ERK: extracellular signal regulated kinase

ESMO: european society for medical oncology

ETS: erythroblast transformation specific

EZH1: enhancer of zeste homologue 1

EZH2: enhancer of zeste homologue 2

F

FAD: flavin-adenine dinucleotide

FBL: fibrillarlin

FBXL11: F-box and leucine-rich repeat 11

FOXO1: forkhead box transcription factor-1

FT : facteur de transcription

G

GATA4: GATA binding protein 4

GNAT: Gcn5-related N-acetyltransferases

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone

GSTP1: glutathione S-Transferase Pi 1

H

H2A: histone 2A

H2B: histone 2B

H3: histone 3

H4: histone 4

H3K9ac : lysine 29 de l'histone 3 acétylée

H3K27me3 : lysine 27 de l'histone 3 triméthylée

HAT : histone acétyltransférase

HBP : hypertrophie bénigne de la prostate

HDAC: histone désacétylase

HIF1: hypoxia-inducible factor-1

HMT: histone méthyltransférase

HNF1B: Hepatocyte Nuclear Factor 1β

HOXB13: Homeobox B13

HPC1: hereditary prostate cancer-1

HPCX: hereditary prostate cancer, X-linked

HPC20: hereditary prostate cancer-3

I

IFNGR1: interferon-γ receptor 1

INCA: institut national du cancer

IRES1: internal ribosome entry site 1

ISUP: international society of urological pathology

J

Jmjc: jumonji C

JMJD1A: jumonji domain containing 1A

JMJD3: jumonji domain-containing protein-3

JARID2: jumonji/ARID domain-containing protein2

K

K : lysine

KDM : déméthylase de lysine d'histones

KLF: kruppel-like factor

L

LH: hormone lutéinisante

LHRH : hormone de libération de la lutéinostimuline

lnARNs: long non coding ARNs

LSD1: Lysine Specific Demethylase 1

M

MALAT1: metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MDM2: murine double minute 2

MGMT: O—methylguanine-DNA méthyltransférase

miARNs: les micro ARNs

MLL2: mixed-lineage leukemia 2

MSMB: microseminoprotein beta

MSR1: macrophage scavenger receptor 1

MST1: macrophage-stimulating protein

MYST: comporte les enzymes MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, TIP60

N

NBS1: nijmegen breakage syndrome 1

ncARNs : ARN non codants

NER : nucleotide excision repair

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

NOP56: nucleolar protein of 56.8 kDa

NOV: nephroblastoma overexpressed

Nt: nucléotides

P

PcG: polycomb-group proteins

PK1: phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1

PHD: plant homeodomain

PI3-K: phosphoinositide 3-kinase

PIN : néoplasie prostatique intra-épithéliale

piARNs: PIWI-interacting ARNs

PLC: polycomb like protein

PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome ten

PSA : antigène prostatique spécifique

PSMA : prostate-Specific membrane antigen

PKC: protein kinase C

PCaP: predisposing for prostate cancer

PG1: prostate cancer susceptibility gene 1

PRC1: polycomb repressive complexe 1

PRC2 : polycomb repressive complexe 2

PGR: progesterone receptor

PSP94: prostatic secretory protein of 94 amino acids

PTMs: modifications post-traductionnelles

R

R : arginine

RA : récepteur aux androgènes

RAF1: v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1

RAR β : nuclear retinoic acid receptor β

RB1: retinoblastoma transcriptional corepressor 1

RbAp46/48: retinoblastoma suppressor associated protein 46/48

Rbl2: retinoblastoma-like protein 2

RGMA: repulsive guidance molecule A

RISC: RNA-induced silencing complex

RPS6KA2: and ribosomal protein S6 kinase A2

RKIP: raf-1 kinase inhibitor protein

RSK: ribosomal S6 kinases

RUNX3: runt-related transcription factor 3

S

SAM: s-adenosyl-L-methionine

SAH: s-adenosyl-L-homocysteine

SET: su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax

SG: score de Gleason

siARNs: short interfering ARNs

SKP2: S-phase kinase-associated protein 2

SLIT2 : slit guidance ligand 2

Src : proto-oncogène codant pour la tyrosine kinase Src

STAT3: signal transducer and activator of transcription 3

SUZ12: suppressor of zeste 12

SWI/SNF: switch / sucrose non fermentable

T

TADs: Topologically Associated Domain

TDG: thymine ADN glycosylase

TET: ten-eleven translocation

TGFBR2: transmembrane serine-threonine kinase, type II TGF- β receptors

TIMP: tissue inhibitors of metalloproteinases

TMPRSS2: transmembrane protease serine

TSM: taux standardisé monde

TSP1 : thrombospondin-1

TR4: récepteur nucléaire testiculaire 4

TRAF6: TNF receptor-associated factor 6

TRA2A: transformer 2 alpha homolog

TSM: taux standardisé monde

U

U2AF1: 2 small nuclear RNA auxiliary factor 1

UHFR1: ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1

USP7: ubiquitin-specific protease 7

USP44: l'ubiquitin-specific protease 44

UTX: ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome

UTY: ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Emplacement de la prostate dans l'appareil reproducteur de l'homme.....	4
Figure 2 : Les zones anatomiques de la prostate.....	5
Figure 3 : Voies de signalisation génomique (A) et non génomique (B) du récepteur des androgènes (RA)	5
Figure 4 : Carcinogénèse du cancer de la prostate.....	6
Figure 5: Classification histologique du score de Gleason.....	9
Figure 6 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate selon la classe d'âge en France en 2015 (courbe transversale de l'âge).....	13
Figure 7 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate en France selon l'année (taux standardisés monde TSM) – Échelle logarithmique.....	13
Figure 8 : Répartition des cas et des décès pour les 10 cancers les plus fréquents en 2020 chez les hommes.....	14
Figure 9 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate par région, normalisés selon l'âge en 2020.....	15
Figure 10 : Les différents types de modifications épigénétiques.....	23
Figure 11 : Les ncARNs courts et leurs mécanismes d'action.....	24
Figure 12 : Les mécanismes de méthylation de l'ADN.....	26
Figure 13 : L'organisation du génome eucaryote.....	27
Figure 14 : Structure des histones et organisation du nucléosome.....	28
Figure 15 : Marques de méthylation des histones H3 et H4, leurs emplacements génomiques et leurs effets habituels sur la transcription.....	31
Figure 16 : Représentation schématique d'un nucléosome montrant les principaux sites de méthylation des lysines sur les histones H3 et H4.....	32
Figure 17 : Modèle du complexe PRC2 humain.....	33
Figure 18 : Régulation du dépôt de la marque H3K27me3 par JARID2-K116me3.....	34
Figure 19: Les différents modes d'action d'EZH2.....	37
Figure 20 : Modèle de régulation de <i>DAB2IP</i> par la méthyltransférase EZH2.....	39
Figure 21 : Modèle de la régulation réciproque d'EZH2 et de Nkx3.1 par des facteurs ETS concurrents.....	41
Figure 22 : Modèle de régulation d'EZH2 par Myc par deux mécanismes distincts dans le cancer de la prostate.....	43

Figure 23 : Les différents niveaux de la régulation positive d'EZH2 dans le cancer de la prostate.	45
Figure 24 : Les différents effets oncogéniques et suppresseurs de tumeurs de JMJD3 sur les grandes voies impliquées dans la cancérogénèse.	65
Figure 25: Composition des sous-unités de PRC2 et les 4 modes d'inhibition.	70
Figure 26: La voie PI3-K/AKT/mTOR.....	114

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification ISUP du cancer de la prostate	9
Tableau 2 : Classification TNM 2016.	10
Tableau 3 : Classification D'Amico.	11
Tableau 4 : Les cibles régulées à la baisse par EZH2.	40
Tableau 5 : Récapitulatif de l'effet des traitements DZNeP et siEZH2 sur l'expression des gènes d'intérêt <i>MGMT</i> , <i>TRA2A</i> , <i>U2AF1</i> et <i>RPS6KA2</i> dans les différentes lignées continues de cellules cancéreuses de la prostate PC-3, DU-145 et LNCaP.	77
Tableau 6 : Récapitulatif de l'effet des traitements GSK-J4 et siJMJD3 sur l'expression des gènes d'intérêt <i>MGMT</i> , <i>TRA2A</i> , <i>U2AF1</i> et <i>RPS6KA2</i> dans les différentes lignées continues de cellules cancéreuses de la prostate PC-3, DU-145 et LNCaP.	82
Tableau 7 : Récapitulatif de l'effet des traitements siEZH2, DZNeP, siUTX, siJMJD3 et GSK-J4 <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur l'expression des gènes d'intérêt <i>MGMT</i> , <i>TRA2A</i> , <i>U2AF1</i> et <i>RPS6KA2</i> , leur enrichissement en H3K27me3 et sur la croissance tumorale dans les différentes lignées continues de cellules cancéreuses de la prostate PC-3, DU-145 et LNCaP	116

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1. LE CANCER DE LA PROSTATE.....	3
<i>a. Anatomie et rôles de la prostate.....</i>	<i>3</i>
<i>b. Physiopathologie du cancer de la prostate.....</i>	<i>6</i>
<i>c. Epidémiologie.....</i>	<i>12</i>
<i>i. En France.....</i>	<i>12</i>
<i>ii. Dans le monde.....</i>	<i>14</i>
<i>d. Les facteurs de risque</i>	<i>16</i>
<i>i. Les facteurs de risque intrinsèques</i>	<i>16</i>
• L'âge	16
• L'histoire familiale.....	17
• L'ethnicité	17
• Le statut hormonal.....	18
<i>ii. Les facteurs de risque extrinsèques.....</i>	<i>19</i>
• Le régime alimentaire.....	19
• Agents environnementaux	20
<i>e. Les facteurs protecteurs</i>	<i>20</i>
2. L'EPIGENETIQUE DANS LE CANCER DE LA PROSTATE	22
<i>a. L'épigénétique.....</i>	<i>22</i>
<i>i. Définition.....</i>	<i>22</i>
<i>ii. Les ARN non codants</i>	<i>24</i>
<i>iii. La méthylation de l'ADN.....</i>	<i>24</i>
<i>iv. Les modifications post-traductionnelles des histones</i>	<i>27</i>
• L'acétylation des histones	29
• La méthylation des histones	30
<i>b. Les trois régulateurs de la marque épigénétique répressive H3K27me3 dans le cancer de la prostate</i>	<i>33</i>
<i>i. La méthyltransférase EZH2</i>	<i>33</i>
• Complexe protéique et mode d'action sur H3K27	33
• La méthylation des protéines non histones.....	34

- Les rôles d'EZH2 indépendants de son activité méthyltransférase..... 35
- Les liens d'EZH2 avec les ADN méthyltransférases 36
- La méthyltransférase EZH2 dans le cancer la prostate 38
- Les liens d'EZH2 avec le récepteur aux androgènes 44
- i. *La déméthylase JMJD3* 46

Publication 1: Sanchez, A.; Houfraf Khoufraf, F.Z.; Idrissou, M.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. The Functions of the Demethylase JMJD3 in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 968, doi:10.3390/ijms22020968.

- ii. *La déméthylase UTX* 66
 - Complexe protéique et mode d'action sur la marque H3K27me3 66
 - Autres mode d'action 66
 - Les rôles de la déméthylase UTX dans le cancer la prostate 67
- c. *Les épidrogues*..... 67

CHAPITRE II. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE ..71

CHAPITRE III. RÉSULTATS.....72

I. IMPLICATION DE LA METHYLTRANSFERASE EZH2 ET DES DEMETHYLASES JMJD3 ET UTX DANS LE CANCER DE LA PROSTATE – APPROCHE *IN VITRO* – LA REGULATION DES GENES *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* ET *RPS6KA2*..... 72

a. *Mise en évidence d'un rôle différentiel d'EZH2 en fonction du statut en récepteur aux androgènes* 72

Publication 2: El Ouardi, D.; Idrissou, M.; Sanchez, A.; Penault-Llorca, F.; Guy, L.; Bignon, Y.-J.; Bernard-Gallon, D. The Inhibition of the Histone Methyltransferase EZH2 by DZNEP or SiRNA Demonstrates Its Involvement in *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* Gene Regulation in Prostate Cancer. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **2020**, 24, 116–118.

b. *L'inhibition chimique avec le GSK-J4 ou des siARNs de JMJD3 entraîne une régulation négative des gènes d'intérêt MGMT, TRA2A, U2AF1, RPS6KA2* 78

Publication 3: Sanchez, A.; El Ouardi, D.; Houfraf Khoufraf, F.Z.; Idrissou, M.; Boisnier, T.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. Role of JMJD3 Demethylase and Its Inhibitor GSK-J4 in Regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* Genes in

Prostate Cancer Cell Lines. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **2020**, 24, 505–507, doi:10.1089/omi.2020.0054.

c. *Étude d'une autre déméthylase, UTX, impliquée dans la régulation de H3K27me3*
83

Publication 4: Houfaf Khouf, F.Z.; **Sanchez**, A.; Idrissou, M.; Boisnier, T.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. Role of UTX Histone Demethylase in Regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2* Genes in Prostate Cancer Cell Lines. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **2021**, 25, 129–131, doi:10.1089/omi.2020.0183.

2. MISE EN EVIDENCE D'UN POSSIBLE LIEN ENTRE **JMJD3** ET LE RECEPTEUR AUX ANDROGENES – APPROCHE *IN VIVO* 88

Publication 5: **Sanchez**, A.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. Effects of GSK-J4 on JMJD3 Histone Demethylase in Mouse Prostate Cancer Xenografts. *Cancer Genomics Proteomics* **2022**, 19, 339–349, doi:10.21873/cgp.20324.

CHAPITRE IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES 101

LA REGULATION DES GENES *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* ET *RPS6KA2* DANS LE CANCER DE LA PROSTATE - APPROCHE *IN VITRO* 102

MISE EN EVIDENCE D'UN POSSIBLE LIEN ENTRE **EZH2**, **JMJD3** ET LE RA *IN VITRO* 106

UTX ET **JMJD3** : LES DIFFERENCES 109

L'EFFET DU **GSK-J4** SUR LA PROGRESSION TUMORALE PROSTATIQUE *IN VIVO* 111

MISE EN EVIDENCE D'UN POSSIBLE LIEN ENTRE **JMJD3** ET LE RA *IN VIVO* 112

LE STATUT **PTEN** ET SON INFLUENCE SUR L'EFFET DU TRAITEMENT **GSK-J4** 113

UN EFFET DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL ? 115

CONCLUSIONS 117

RÉFÉRENCES 118

WEBOGRAPHIE 140

INTRODUCTION

Le cancer de la prostate est le deuxième cancer le plus fréquent dans le monde chez l'homme avec 1 414 259 nouveaux cas et 375 304 décès déclarés en 2020 [1]. La survenue d'environ 40% des cancers serait attribuée à des facteurs de risque modifiables comme le tabagisme, la consommation d'alcool, la sédentarité etc. (Institut National du Cancer, Inca 2018). L'environnement et le style de vie ont un impact sur les cellules de notre organisme en modulant notamment les mécanismes épigénétiques. Étymologiquement, « épi » signifie « au-dessus » et le mot épigénétique a été utilisé en 1942 par le généticien Conrad Hal Waddington pour décrire ce qui est « au-dessus de la génétique ». Les marques épigénétiques correspondent ainsi à la couche d'information située au-dessus ou autour de l'ADN et permettent de moduler la flexibilité et l'accessibilité de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle. Aujourd'hui, il est admis que la dérégulation de ces mécanismes, notamment celle qui entraîne une dérégulation de l'expression des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs, est impliquée dans l'initiation et la progression tumorale [2]. Par conséquent, l'étude de ces modifications est indispensable pour une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacent au développement du cancer.

Il existe plusieurs mécanismes épigénétiques et notre laboratoire s'intéresse aux modifications post-traductionnelles des histones (PTMs) et plus particulièrement à l'implication de la marque H3K27me3 dans le cancer de la prostate, marque épigénétique correspondant à la tri méthylation de l'histone 3 au niveau de la lysine 27. Cette marque est retrouvée de façon aberrante dans le cancer de la prostate, ce qui conduit à une dérégulation de l'expression génique [3,4]. Le niveau de méthylation de H3K27 est régulé par l'activité de trois enzymes : la méthyltransférase enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) et les déméthylases jumonji domain-containing protein-3 (JMJD3) et l'ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome (UTX). Ces acteurs sont tous les trois dérégulés dans le cancer de la prostate [5–7] et c'est pourquoi l'axe de recherche du laboratoire est centré sur cette marque épigénétique et les acteurs qui la régulent.

Il a déjà été démontré qu'il existait un enrichissement des gènes en H3K27me3 dans des biopsies de prostate avec une corrélation positive selon l'agressivité. Une signature génique a été identifiée sur des biopsies de prostate et comporte les gènes *O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)*, *transformer 2 alpha homolog (TRA2A)*, *2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 (U2AF1)* et *ribosomal protein S6 kinase A2 (RPS6KA2)*. EZH2 et JMJD3

étaient co-localisées avec la marque H3K27me3 sur le promoteur de ces gènes [8]. Le panel de gènes est impliqué dans divers processus cellulaires tels que la réparation de l'ADN, l'épissage alternatif ou encore dans la voie de signalisation des MAPK/Ras.

Toutefois, la dérégulation de la marque H3K27me3 et de ces acteurs ainsi que leurs rôles dans la tumorigénèse sont controversés dans plusieurs études, ce qui confirme la complexité de l'étude des mécanismes épigénétiques. Ce travail de thèse vise à approfondir les connaissances sur l'implication de la marque H3K27me3 et des acteurs impliqués dans le dépôt et la suppression de sa tri méthylation dans le cancer de la prostate et plus particulièrement sur la régulation du panel de gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2*. Une autre partie se focalise sur le rôle de la déméthylase JMJD3 dans la progression tumorale.

CHAPITRE I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le cancer de la prostate

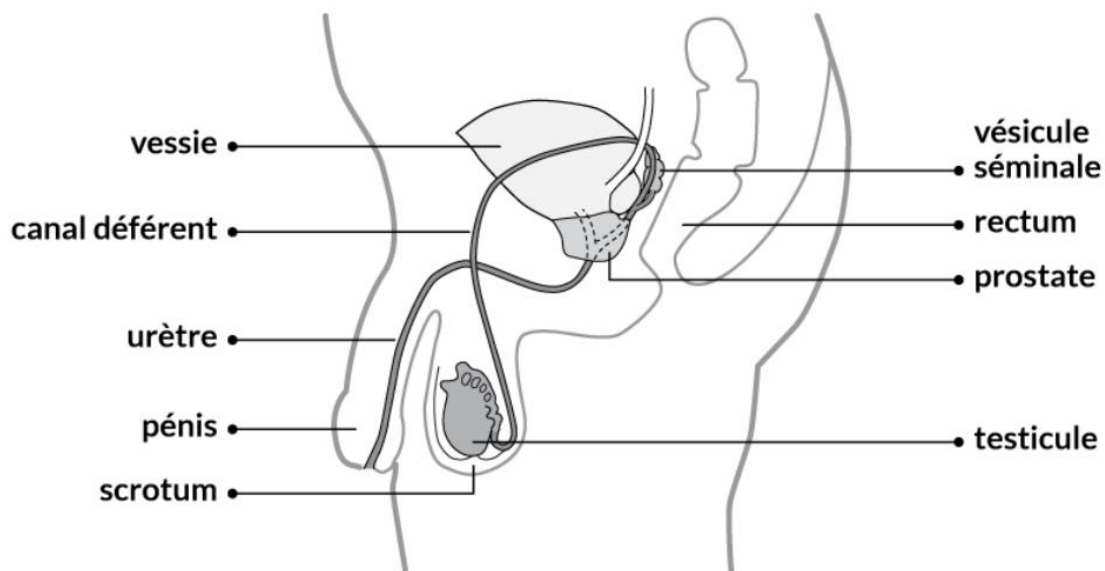
a. Anatomie et rôles de la prostate

La prostate est une glande génitale musculo-fibro-glandulaire au carrefour des appareils reproducteur et urinaire masculin. Elle est située anatomiquement en arrière de la symphyse pubienne, sous la vessie et en avant de l'ampoule rectale (**Figure 1**). Elle est formée d'un lobe droit et gauche. Sa partie supérieure est plus large et accolée au col de la vessie. Sa partie inférieure, plus fine, est appelée apex. La prostate entoure l'urètre prostatique (3cm) qui la traverse de haut en bas et permet une partie de l'acheminement de l'urine. L'urètre prostatique est bordée par deux sphincters : le sphincter supérieur et lisse du col vésical et le sphincter inférieur, strié. La prostate est entourée d'une capsule fibro-élastique. Selon Mc Neal [9], cette glande est composée de plusieurs zones anatomiques (**Figure 2**) :

- **La zone de transition**, glandulaire et divisée en deux lobes, elle entoure l'urètre prostatique. Elle est le siège du développement de l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP), ce qui explique les complications urinaires liés à cette pathologie.
- **La zone centrale**, glandulaire et en arrière de la zone de transition, elle entoure les canaux éjaculateurs.
- **La zone périphérique**, postérieure et palpable lors du toucher rectal, elle forme 70% du volume glandulaire prostatique et est le lieu principal du développement du cancer de la prostate.
- **Le stroma fibro-musculaire** antérieur, non glandulaire et composé de fibres musculaires lisses et striées.

Cette glande hormono-dépendante est en lien étroit avec deux glandes annexes, les vésicules séminales. Prostate et vésicules séminales, permettent grâce aux sécrétions prostatiques et sécrétions séminales, la production d'une partie du sperme, riche en éléments nutritifs et protecteurs pour les spermatozoïdes qui proviennent des canaux déférents. Ces sécrétions ont un rôle dans le transport des spermatozoïdes. Le sperme est acheminé des vésicules séminales jusqu'aux canaux éjaculateurs pour terminer dans l'urètre prostatique.

Le développement et le fonctionnement de la prostate sont sous le contrôle des androgènes et notamment de la testostérone. Les cellules de la prostate contiennent des récepteurs aux androgènes (RA) qui fixent la testostérone mais il se trouve que l'action la plus importante est médiée par un dérivé de la testostérone : la dihydrotestostérone (DHT), transformée par une enzyme appelée la 5 α -réductase. L'affinité de la DHT pour le RA est 5 fois plus importante que celle de la testostérone et l'action androgène dans la prostate en est donc potentialisée. En l'absence de ligand androgène, le RA est inactif, lié à des protéines chaperonnes de choc thermique dans le cytoplasme de la cellule. Lorsque qu'un ligand se fixe au RA, ce dernier change de conformation pour transloquer dans le noyau et se fixer à des régions éléments de réponse aux androgènes. Le recrutement de cofacteur active la machinerie transcriptionnelle des gènes cibles impliqués dans la différenciation cellulaire et la production de l'antigène prostatique spécifique (PSA) produit par les cellules épithéliales de la prostate. Ce mécanisme correspond à la voie génomique du RA. Le RA est également capable d'agir par une voie non génomique, directement dans le cytoplasme, en activant d'autres voies de signalisation après stimulation androgénique. Ces voies sont impliquées dans la prolifération, la survie cellulaire, l'invasion et la formation de métastases, notamment par le biais de l'activation de la voie mitogen-activated protein kinases/ extracellular signal-regulated kinases (MAPK/ERK) (**Figure 3**) [10,11].



© Société canadienne du cancer

Figure 1 : Emplacement de la prostate dans l'appareil reproducteur de l'homme

www.cancer.ca

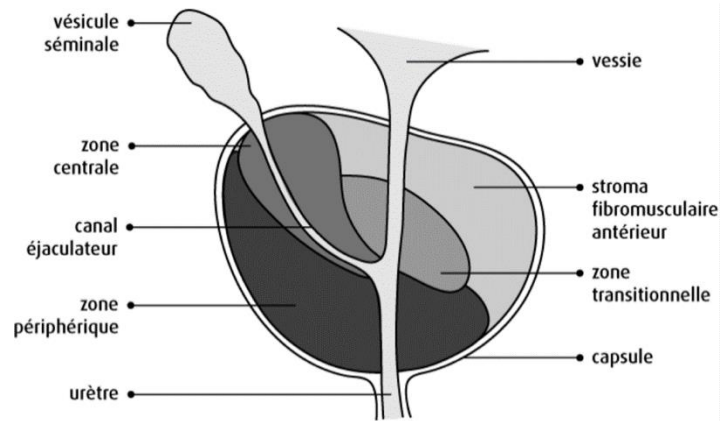


Figure 2 : Les zones anatomiques de la prostate

www.cancer.ca

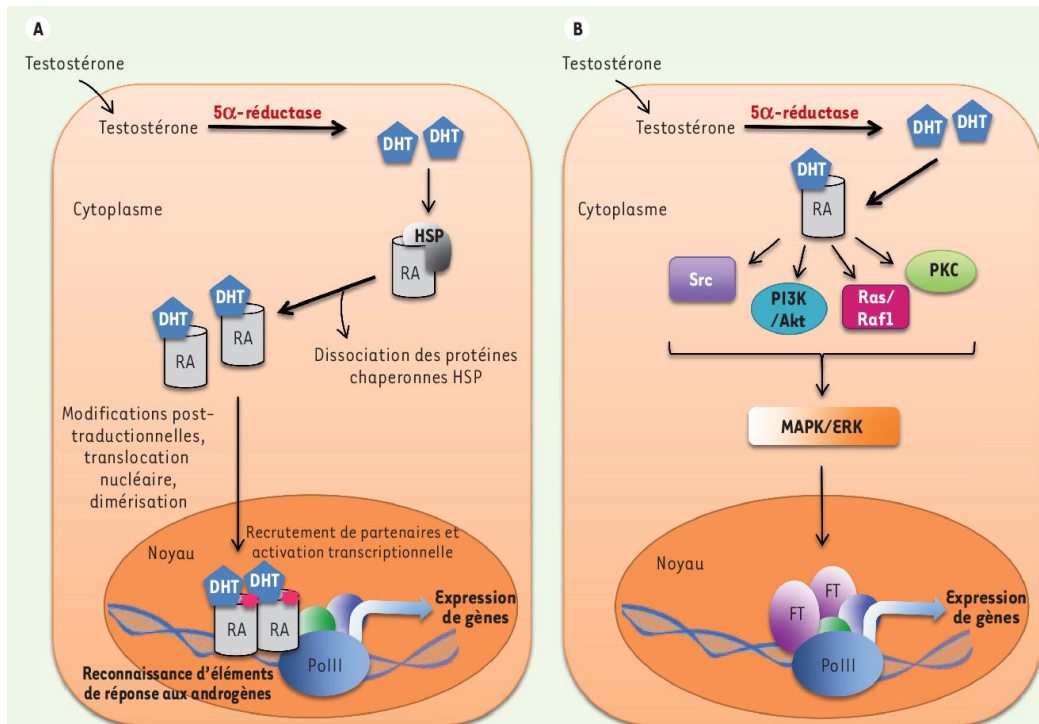


Figure 3 : Voies de signalisation génomique (A) et non génomique (B) du récepteur des androgènes (RA)

DHT : dihydrotestostérone ; ERK : extracellular signal-regulated kinases ; FT : facteur de transcription ; MAPK : mitogen-activated protein kinase ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PKC : protéine kinase C ; RAF1 : v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 ; Src : proto-oncogène codant pour la tyrosine kinase Src [11].

b. Physiopathologie du cancer de la prostate

L'adénocarcinome de la prostate est le cancer de la prostate le plus fréquent à hauteur de 90%. Il se développe à partir des cellules épithéliales de la prostate. La complexité de ce cancer est dû à ses origines multifocales dans la glande prostatique qui représentent 60 à 90% des cancers de la prostate. Les foyers cancéreux peuvent être indépendants et progresser à des rythmes différents en fonction de la nature des mutations génétiques des cellules. Il existe fréquemment une agressivité différentielle entre les foyers tumoraux (**Figure 4**) [12].

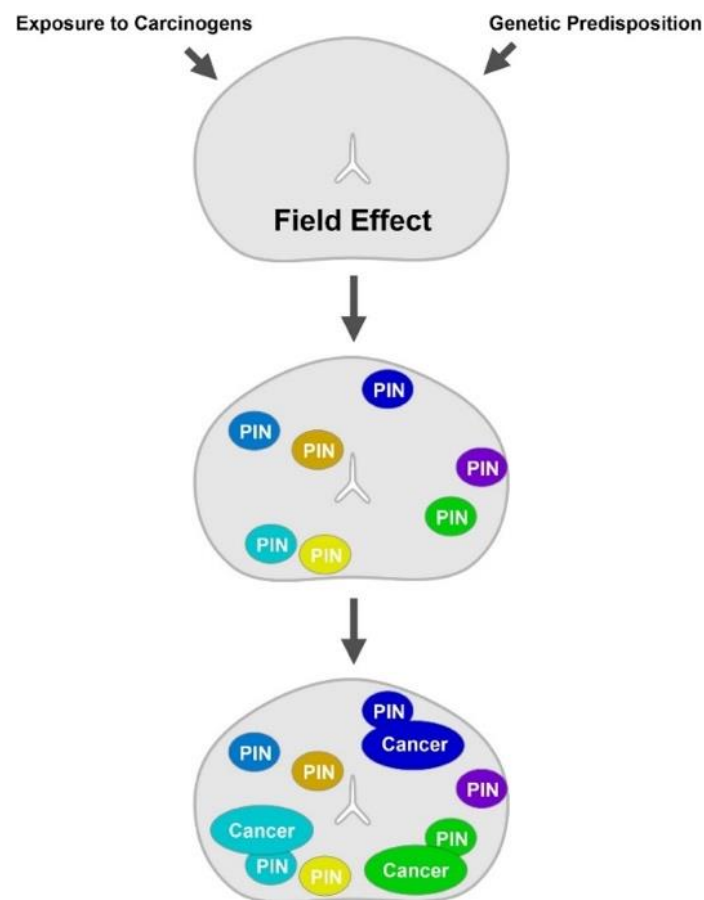


Figure 4 : Carcinogénèse du cancer de la prostate.

Représentation d'une étiologie multifactorielle conduisant à la progression de la néoplasie prostatique intra-épithéliale (PIN) vers un carcinome multifocal de la prostate [12]. Dans la carcinogénèse, le « field effect » correspond à un épithélium morphologiquement normal qui se développe en une tumeur, et qui est le résultat de l'expansion d'un clone génétiquement anormal [13].

Le cancer de la prostate est un cancer hormono-dépendant. Il existe plusieurs stratégies d'hormonothérapies anti-cancéreuses visant à bloquer l'action des hormones lorsque la tumeur répond aux signaux hormonaux:

Indirectement par inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadien. Cette inhibition se fait par l'utilisation d'agonistes de l'hormone de libération de la lutéinostimuline (LHRH) (aussi appelée Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)) qui viennent saturer les récepteurs hypophysaires. Cette hormone agit sur la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) qui induit la prolifération et la maturation des cellules de Leydig interstitielles impliquées dans la sécrétion de la testostérone. Dans un premier temps, l'action des agonistes va entraîner une augmentation de la testostérone circulante avant qu'un rétrocontrôle négatif soit mis en place. C'est pour cette raison que ce traitement s'accompagne de la prise d'un anti-androgène. Il existe aussi des antagonistes de la LHRH qui vont directement bloquer les récepteurs hypophysaires et induire rapidement une chute de la concentration de LH sans entraîner une augmentation du taux de testostérone en début de traitement.

En empêchant l'hormone d'activer son récepteur par l'utilisation de molécules anti-androgènes. Ces molécules sont des inhibiteurs compétitifs des RA qui empêchent la translocation du RA vers le noyau. Un de leurs avantages est qu'ils sont capables de bloquer la testostérone testiculaire et surrénalienne.

Malheureusement, ces traitements ne font qu'améliorer la survie car presque tous les patients voient leurs RA mutés au bout d'un certain temps. A ce stade-là, le cancer de la prostate est dit résistant à la castration (CRPC). De nouvelles molécules ont été élaborées visant à bloquer plusieurs étapes clés de la voie de signalisation du RA, y compris la liaison des androgènes au RA, la translocation nucléaire du RA activé et la liaison du RA activé avec l'ADN [14]. La castration chirurgicale ou l'orchidectomie par exérèse des deux testicules ou de la pulpe testiculaire peut aussi être envisagée. Cette technique supprime immédiatement la production de testostérone par les testicules. Cependant elle n'est pas réversible et est moins bien tolérée psychologiquement pour le patient que la castration médicamenteuse.

Autre que l'adénocarcinome, il existe des tumeurs de la prostate plus rares comme :

- **Le sarcome de la prostate** qui naît du stroma spécialisé du parenchyme prostatique (selon l'association française d'urologie, (AFU)).
- **Le carcinome à petites cellules de la prostate.** Il est très rare et de diagnostic tardif, souvent au stade de métastases avec un mauvais pronostic (AFU).
- **La tumeur carcinoïde** qui correspond à une tumeur neuroendocrine bien différenciée et retrouvée dans la glande prostatique. Elle est très rare et est peu décrite mais semble être de bon pronostic (AFU).
- **Le carcinome épidermoïde de la prostate,** également très rare mais agressif et métastasants principalement au niveau osseux [15].

Il existe des états dits précancéreux de la prostate qui entraînent des changements dans les cellules prostatiques et qui sont à surveiller comme le PIN [16], l'atrophie inflammatoire proliférative (AIP) ainsi que la prolifération acinaire atypique : Atypical small acinar proliferation (ASAP). Ces états ne sont pas traités mais nécessitent un suivi de la progression, particulièrement pour l'ASAP.

L'**agressivité** du cancer est évaluée grâce à une analyse anatomopathologique de la tumeur après prélèvements de 10 à 12 biopsies permettant de cartographier la prostate puisque comme précisé précédemment, le cancer de la prostate se développe souvent en multiples foyers. Cette analyse permet de déterminer un score : le Score de Gleason (SG), décrit en 1966 par Donald Gleason [17]. Ce score repose sur 3 règles selon lesquelles il existe plusieurs populations tumorales au sein d'une même prostate, ces populations peuvent être de différents grades et plus l'architecture de la glande est détruite, plus le pronostic est mauvais. Le SG est la somme des grades des deux populations tumorales les plus fréquentes. Ce score comporte 5 modèles de croissance numérotés du grade 1 (bien différencié) au grade 5 (indifférencié). Un développement tumoral ne sera considéré qu'à partir du grade 3 (**Figure 5**). Ce score a été redéfini par l'International Society of Urological Pathology (ISUP) en 5 groupes pronostiques (**Tableau 1**) car plusieurs défauts ont été soulevés sur l'ancienne classification. Par exemple, presque tous les cancers de la prostate qui étaient diagnostiqués atteignaient un score minimal de 6 ce qui correspond à des cancers bien différenciés alors qu'en réalité le cancer était indolent. Ce score était difficile à expliquer aux patients. Il y a désormais une différence entre les scores 7 (scores 3 majoritaires) et 7 (scores 4 majoritaires) et également entre les scores 8 et 9-10 dont le pronostic n'est pas le même.

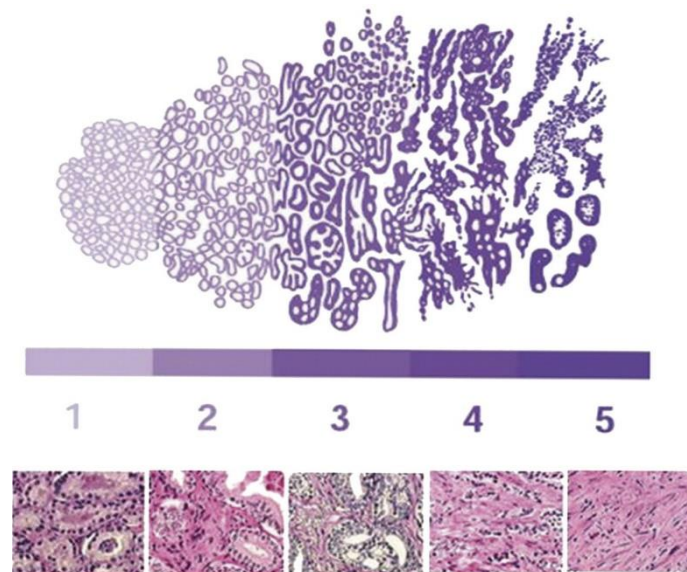


Figure 5: Classification histologique du score de Gleason.

Les chiffres font référence aux grades de Gleason. En haut, les dessins originaux de Gleason pour chaque grade et en bas, les coupes histologiques colorées correspondantes pour chaque grade [18].

Groupe de grade	Score de Gleason	Description
1	Anciennement SG de 6 (3+3)	Le cancer se développera et se propagera probablement très lentement (bien différencié, ou de bas grade).
2	SG de 7 (3 majoritaire)	Le cancer se développera et se propagera probablement lentement (modérément différencié, ou de grade intermédiaire).
3	SG de 7 (4 majoritaire)	Le cancer se développera et se propagera probablement lentement (modérément différencié, ou de grade intermédiaire). Le cancer de groupe de grade 3 est plus susceptible de se développer et de se propager que le cancer de grade 2.
4	SG de 8 (4+4, 3+5, ou 5+3)	Le cancer se développera et se propagera probablement rapidement (peu différencié, ou de haut grade).
5	SG de 9 ou 10	Le cancer se développera et se propagera probablement rapidement (peu différencié, ou de haut grade). Le cancer de grade 5 est susceptible de se développer et de se propager plus rapidement que le cancer de grade 4.

Tableau 1 : Classification ISUP du cancer de la prostate

(International Society of Urological Pathology, 2016)

Le **stade de dissémination** est évalué par la classification TNM qui prend en compte les critères de la taille de la tumeur (T), de l'invasion des ganglions (N) et de la présence de métastases (M) (**Tableau 2**).

Pour évaluer la stratégie thérapeutique qui sera mise en place, le SG est associé à la classification TNM et au dosage du taux de PSA. Ensembles, ces critères forment la classification d'Amico (**Tableau 3**) qui stratifie le cancer de la prostate en fonction de sa **progression**.

T	<p>T0 : tumeur primitive non retrouvée</p> <hr/> <p>T1 : tumeur non palpable au toucher rectal et non visible en imagerie T1a : tumeur occupant moins de 5 % du tissu réséqué avec un SG<7 ou absence de grade 4 ou 5 ; T1b : tumeur occupant plus de 5 % du tissu réséqué ou un SG>7 ou présence de grade 4 ou 5 ; T1c : tumeur découverte sur une biopsie prostatique en raison d'une élévation de la valeur du PSA</p> <hr/> <p>T2 : tumeur limitée à la prostate : Tumeur primitive T2a : tumeur atteignant la moitié d'au moins un lobe ; T2b : tumeur atteignant plus de la moitié d'un lobe mais sans atteindre les deux lobes ; T2c : tumeur atteignant les deux lobes</p> <hr/> <p>T3 : extension au-delà de la prostate : T3a : extension en dehors de la capsule prostatique; T3b : extension aux vésicules séminales uni- ou bilatérale</p> <hr/> <p>T4 : tumeur fixée ou atteignant d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscle élévateur de l'anus ou la paroi pelvienne)</p>
N Ganglions régionaux	<p>Nx : ganglions régionaux non évalués N0 : absence de métastase ganglionnaire régionale N1 : atteinte ganglionnaire régionale N1 mi : métastase ganglionnaire</p> <hr/> <p>Mx : métastases à distance non évaluées M0 : absence de métastase à distance</p>
M Métastases à distance	<p>M1 : métastases à distance : M1a : atteinte des ganglions non régionaux ; M1b : atteinte osseuse, M1c : autres sites avec ou sans atteinte osseuse</p>

Tableau 2 : Classification TNM 2016.

	PSA (ng/mL)	SG	Stade clinique
Faible risque	<10	$SG \leq 6$	T1c ou T2a
Risque intermédiaire	10-20	Ou $SG = 7$	Ou T2b
Risque élevé	>20	ou $SG > 7$ (8, 9 ou 10)	Ou T2c

Tableau 3 : Classification D'Amico.

AFU

*c. Épidémiologie**i. En France*

Contrairement aux autres types de cancer, les estimations nationales de l'incidence et de la mortalité du cancer de la prostate en France métropolitaine ne sont pas fournies pour la projection 2018. Ceci s'explique par des fluctuations importantes sur la période récente et sont donc uniquement détaillées pour la période 1990-2015 selon l'Inca. En 2015, le cancer de la prostate est la tumeur solide la plus fréquente chez l'homme avec 50 430 nouveaux cas. Il se place devant le cancer des poumons (31 231 cas) et le cancer colorectal (23 216 cas) en 2018. Le taux d'incidence standardisé monde (TSM) est de 81,5 cas pour 100 000 personnes-années. En terme de mortalité, le cancer de la prostate se place au troisième rang (8 115 décès en 2015 avec un TSM de 8,9 cas pour 100 000 personnes-années) derrière les cancers du poumon et colorectal avec respectivement 22 761 et 9 209 décès en 2018.

Selon la courbe transversale de l'âge (**Figure 6**), le cancer de la prostate est un cancer rare chez les moins de 50 ans qui atteint en revanche une incidence maximum chez les 70-74 ans. L'âge médian de diagnostic est de 68 ans. Il y a très peu de décès chez les moins de 60 ans avec une courbe de mortalité qui augmente ensuite jusqu'à 90 ans. L'âge médian de décès d'un cancer de la prostate est de 83 ans.

L'évolution du cancer de la prostate est favorable avec une incidence et une mortalité qui baissent conjointement. Jusqu'en 2005, une forte augmentation de l'incidence était relevée due aux nouvelles pratiques de dosage du PSA dès 1985 avec un dépistage et diagnostic précoces du cancer de la prostate. L'incidence sur la période 2010-2015 est en baisse de -3,5% (**Figure 7**) due à une prise de conscience et une baisse de ces pratiques qui conduisaient à un sur-traitement de la population affectée. De plus, les effets secondaires étaient importants alors que l'agressivité du cancer était faible ou que les hommes étaient asymptomatiques. La mortalité, quant à elle, est en baisse de -2,8% dans toutes les tranches d'âge entre 1990-2018 (**Figure 7**). Cette baisse est associée en grande partie à l'amélioration des traitements, notamment les hormonothérapies qui mènent à une amélioration de la survie sans pour autant que le cancer soit guéri.

Au niveau régional et départemental, il n'existe pas de grande différence d'incidence, en revanche, la distribution spatiale de la mortalité est disparate. On note une mortalité plus importante pour le cancer de la prostate dans les parties nord et centrale de la France

métropolitaine. Dans les Antilles françaises (Guadeloupe et Martinique), on observe une forte incidence et mortalité pour les cancers de la prostate.

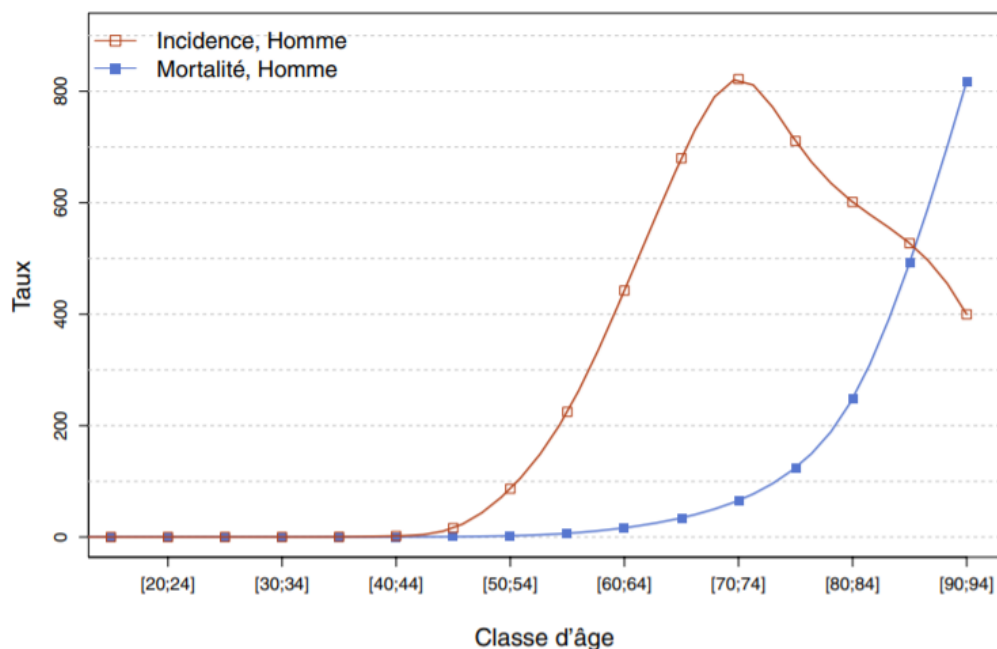


Figure 6 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate selon la classe d'âge en France en 2015 (courbe transversale de l'âge).

(Inca)

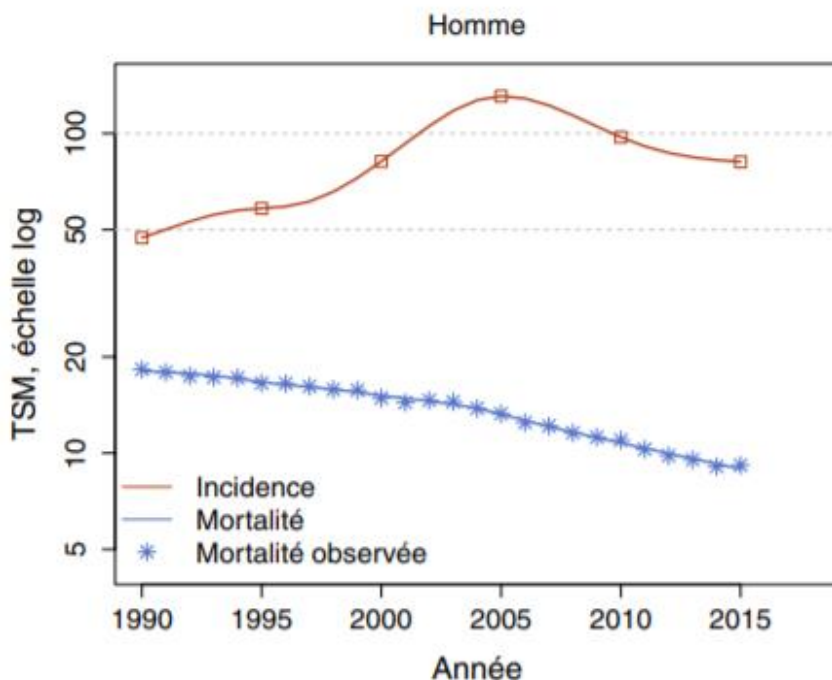


Figure 7 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate en France selon l'année (taux standardisés monde TSM) – Échelle logarithmique.

(Inca)

ii. Dans le monde

Au niveau mondial et parmi les hommes, le cancer de la prostate représente 1 414 259 cas en 2020, faisant de cette maladie le deuxième cancer le plus fréquent (14,1%) après le cancer du poumon (14,3%). 375 304 décès ont été recensés en 2020 suite au développement du cancer de la prostate. Chez les hommes, c'est le 5^{ème} cancer le plus mortel (6,8%) après les cancers du poumon (21,5%), du foie (10,5%), colorectal (9,3%) et de l'estomac (9,1%) (**Figure 8**) [1].

C'est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes dans 112 pays sur 185 pays du monde. Les taux d'incidence varient entre 6,3 en Asie à 83,4 en Europe du Nord (Irlande) pour 100 000 hommes. On note également un taux d'incidence très élevé dans les Caraïbes, en Australie, Nouvelle-Zélande, Amérique du Nord et en Afrique Australe. De faibles taux d'incidence sont retrouvés en Asie et en Afrique du Nord (**Figure 9**). Bien sûr, les taux d'incidence sont étroitement liés aux pratiques de diagnostic des pays. Comme la France, l'Amérique du Nord et l'Australie ont connu une généralisation de l'utilisation des tests de dosage PSA qui a conduit à une augmentation du taux d'incidence, puis un déclin lié à une diminution des cancers de la population générale. Toutefois, le cancer de la prostate est la principale cause de décès par cancer chez les hommes dans 48 pays, dont de nombreux pays d'Afrique subsaharienne, des Caraïbes, Micronésie/Polynésie et d'Amérique centrale et du Sud, ainsi que la Suède.

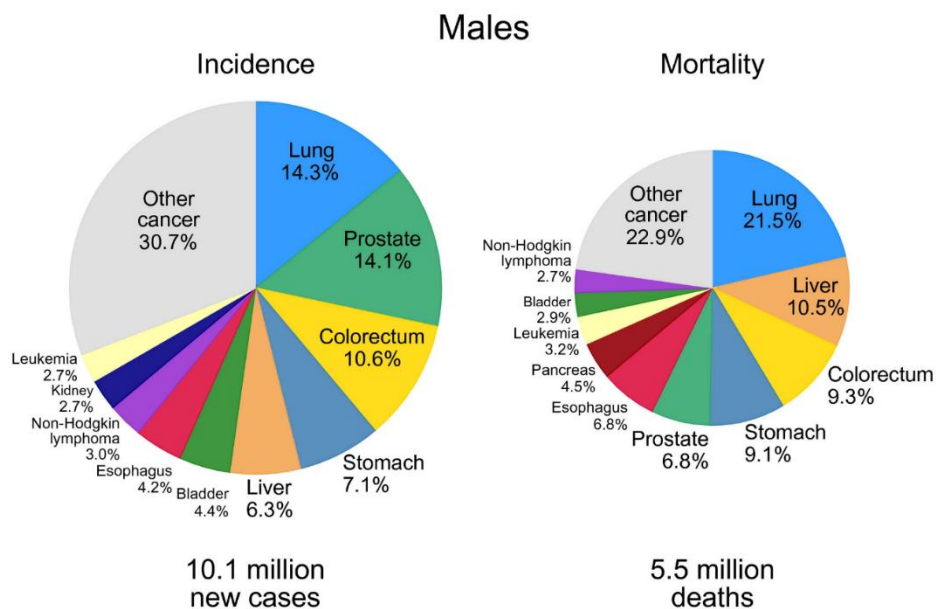


Figure 8 : Répartition des cas et des décès pour les 10 cancers les plus fréquents en 2020 chez les hommes.

<https://gco.iarc.fr/>

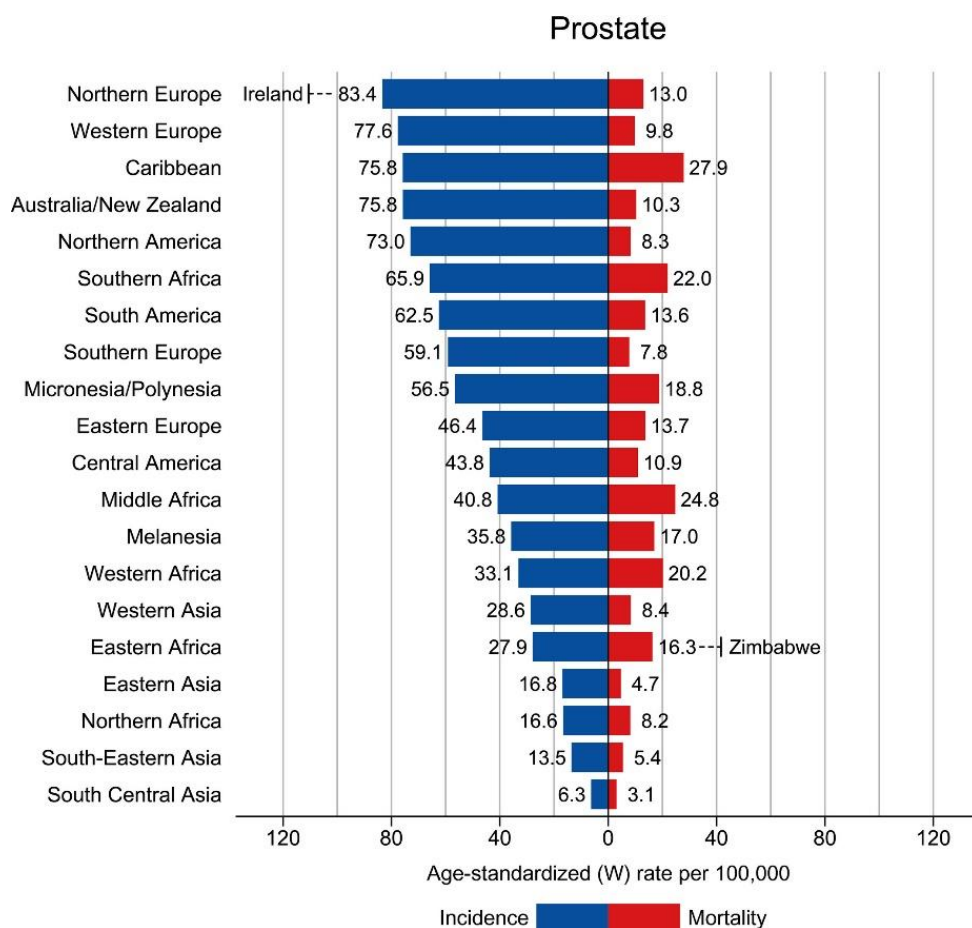


Figure 9 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate par région, normalisés selon l'âge en 2020.

Les taux sont présentés par ordre décroissant du taux d'incidence mondial (W) normalisé selon l'âge, et les taux nationaux les plus élevés normalisés selon l'âge pour l'incidence et la mortalité.

<https://gco.iarc.fr/>

d. Les facteurs de risque

Le cancer de la prostate peut être sporadique, c'est-à-dire qu'une cellule ayant subi une mutation spontanée dans sa séquence ADN peut échapper au système immunitaire, se diviser pour finalement donner naissance à des cellules filles. Les cellules filles posséderont cette même mutation génétique, entraînant *in fine* la formation d'un foyer de cellules cancéreuses. L'origine de ce type de cancer est incertaine. En revanche, il est connu que le cancer de la prostate est une maladie multifactorielle dont certains facteurs de risque peuvent contribuer à son initiation. Ils peuvent être classés en deux groupes :

- **Les facteurs de risque intrinsèques** : Ce sont des facteurs de risque pour lesquels l'homme n'a pas de contrôle. On compte parmi eux l'âge, le statut hormonal, l'histoire familiale, l'origine ethnique.
- **Les facteurs de risque extrinsèques** : Ce sont des facteurs de risque que l'homme peut contrôler ou réguler. Ils proviennent de l'environnement de l'individu et de ces habitudes, comme le régime alimentaire, la fréquence des activités physiques, le fait de fumer ou bien de boire de l'alcool par exemple.

En ce qui concerne le cancer de la prostate, les principaux facteurs de risque identifiés avec certitude sont l'âge, l'origine ethnique et l'existence d'antécédent familial du cancer de la prostate ou du sein. Les études sur les facteurs de risque environnementaux restent très controversées selon l'AFU. On note toutefois un lien avec des expositions professionnelles particulières à des pesticides (notamment le chlordécone dans les Antilles (classé « cancérigène possible » selon le centre international de recherche sur le cancer (CIRC)).

i. Les facteurs de risque intrinsèques

- L'âge

En effet, l'âge est un des facteurs de risque les plus importants dans l'initiation du cancer en général mais surtout dans le cas du cancer de la prostate. Plus l'individu avance dans l'âge, plus il a de risque de développer un cancer de la prostate. Comme mentionné dans la partie épidémiologie, il est très rare de développer un cancer de la prostate avant l'âge de 50 ans. L'âge médian de développement d'un cancer de la prostate est de 68 ans avec un pic de l'incidence entre 70 et 74 ans en France (**Figure 6**).

- L'histoire familiale

Les formes familiales représentent 20% des cas de cancer de la prostate et parmi eux, 5 % sont des formes héréditaires. L'évaluation de la forme héréditaire s'établit sur des critères stricts. Il doit y avoir :

- 3 cancers de la prostate chez des apparentés du 1^{er} ou 2^{ème} degré.
- Ou 2 cancers de la prostate diagnostiqués avant l'âge de 55 ans chez des apparentés du 1^{er} ou 2^{ème} degré.

La recherche d'antécédents de cancers du sein ou de l'ovaire est systématique dans la famille des sujets atteints par le cancer de la prostate. Elle concerne les familles avec plus de deux cancers du sein ou de l'ovaire et plus de deux cancers de la prostate chez les apparentés du 1^{er} degré ; ou avec au moins un cancer du sein chez l'homme et au moins 1 cancer de la prostate avant l'âge de 55 ans. Dans ce dernier cas, la recherche de mutation du gène *breast cancer 2 (BRCA2)* est à effectuer en priorité. En effet, il existe un risque plus élevé de développer un cancer de la prostate chez les personnes porteuses de mutations des gènes *breast cancer 1 et 2 (BRCA1/BRCA2)* [19–21].

Des analyses génétiques peuvent permettre de rechercher des mutations, pour des locus ou gènes de prédisposition comme *hereditary prostate cancer-1 (HPC1)*, *predisposing for prostate cancer (PCaP)*, *hereditary prostate cancer, X-linked (HPCX)*, *hereditary prostate cancer-3 (HPC20)*, *prostate cancer susceptibility gene 1/macrophage scavenger receptor 1 (PG1-MSR)*, *HPC2-ELAC*, *Homeobox B13 (HOXB13)*). Plus récemment, de nouveaux gènes candidats ont été mis en évidence : *BRCA1 Interacting Helicase 1 (BRIP1)*, *Nijmegen breakage syndrome 1 (NBS1)*, *RAD51D* [22].

- L'ethnicité

Le risque de développer un cancer de la prostate est majoré dans les ethnies d'Afrique subsaharienne. Une très récente étude génomique comparative réalisée sur 406 échantillons montre que les tumeurs de la prostate chez les hommes natifs d'Afrique sont génomiquement distinctes et se caractérisent par la dérégulation de plusieurs biomarqueurs comme *Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)*, *RB Transcriptional Corepressor 1 (RBI)*, et *MYC* ainsi qu'une expression plus élevée d'*EZH2* par rapport aux hommes Euro-Américains. Il y a une

proportion plus élevée d'individus natifs d'Afrique ayant une perte du gène *Phosphatase and Tensin homolog deleted from chromosome ten (PTEN)* et la signalisation du RA est dérégulée avec une activité du récepteur significativement plus faible que chez les hommes Euro-Américains. Ces tumeurs sont également fortement enrichies pour les principales voies pro-inflammatoires [23].

De plus, au vu des différences des taux d'incidence en fonction de la géographie (**Figure 9**), il est de plus en plus évident qu'il existe un lien entre l'ethnicité et la survenue d'un cancer de la prostate même si ces écarts peuvent provenir de différences d'exposition alimentaire et environnementale ; de détection de la maladie en fonction de la région géographique ; ou de différences génétiques. Toutefois, les populations Afro-Américaine, Caribéenne et du sud de l'Amérique sont plus touchées par le cancer de la prostate alors que les populations Asiatiques ont la plus faible incidence (Globocan). Cinquante pourcent des hommes d'origine Asiatique développent des tumeurs prostatiques latentes à 90 ans. Cette prévalence est atteinte à 80 ans chez les Caucasiens et à 60 ans chez les hommes d'origine Africaine. De plus, 4 % des hommes Asiatiques, 9 % des hommes Caucasiens et 37 % des hommes d'origine Africaine ont un cancer de la prostate latent avant l'âge de 40 ans [24].

Il existe également des différences dans les fréquences alléliques du RA. Les hommes Afro-Américains ont des allèles microsatellites CAG du gène *RA* plus courts que les Blancs et les Asiatiques [25]. Ceci pourrait favoriser la croissance des cellules prostatiques entraînant un risque plus élevé de développer un cancer de la prostate.

- Le statut hormonal

Les androgènes sont indispensables pour le développement, le maintien et le fonctionnement de la glande prostatique. Une dérégulation du métabolisme hormonal pourrait conduire à l'initiation et à la progression du cancer de la prostate. On sait que le taux sérique de testostérone est diminuée à un âge où l'incidence est au maximum, mais certains chercheurs ont mis en évidence que des niveaux élevés de testostérone permettaient d'augmenter le risque de développer un cancer de la prostate [26]. En revanche, une autre étude n'a montré aucune association, positive ou négative, entre la concentration d'androgènes mesurée dans le sérum et le risque de développer un cancer de la prostate [27].

ii. Les facteurs de risque extrinsèques

- Le régime alimentaire

Il existe une grande variété de facteurs alimentaires mis en cause dans l'initiation du cancer de la prostate. La **consommation de graisses** serait en cause selon un certain nombre d'études [28]. Une étude sur 13 000 hommes âgés de 50 ans a été menée et a mis en évidence une corrélation positive entre la consommation de graisses et une augmentation du taux de PSA [29]. Un essai d'intervention diététique a mis en place un régime pauvre en graisses chez des hommes atteints d'un cancer de la prostate. Le sérum des sujets a été prélevé et mis en culture avec des cellules cancéreuses de prostate LNCaP. Le sérum des hommes du groupe à faible teneur en graisses a diminué de significativement la croissance des cellules LNCaP par rapport au groupe contrôle. En revanche, aucun changement significatif n'a été relevé entre les groupes en ce qui concerne le taux de PSA [30]. A partir de 229 biopsies de prostate, il a été mis en évidence qu'un risque accru de développer un cancer de la prostate était associé à la consommation d'acides gras saturés, trans, mono-insaturés et de cholestérol [31]. Toutefois, une autre étude montre qu'il existe un lien entre acide gras mono-insaturés et amidon avec le risque de développer un cancer de la prostate mais met en évidence une corrélation négative avec la consommation d'acides gras polyinsaturés [32]. Et finalement, d'autres études ne montrent aucune corrélation entre le risque de développer un cancer de la prostate et la consommation de graisses alimentaires [33–35].

Les produits laitiers sont des composants recommandés et essentiels de notre alimentation car ils sont abondants en éléments nutritifs, mais la consommation excessive de ces produits pourrait avoir un lien avec le développement de cancers. Une faible consommation de produits laitiers totaux pourrait réduire le risque relatif de mortalité du cancer [36]. Une étude de cohorte japonaise a analysé environ 110 000 résidents et a montré qu'une consommation élevée de produits laitiers augmente le risque de développer un cancer de la prostate chez les hommes japonais [37] et notamment la consommation de lait entier [36,38]. D'autres études ne montrent aucun lien entre la consommation de produits laitiers sur le risque global de développer un cancer de la prostate chez les hommes aux États-Unis [39].

- Agents environnementaux

Les **perturbateurs endocriniens**, dont certains pesticides font partis, interagissent de façon néfaste avec le système hormonal ce qui conduit à une dérégulation de l'activité des récepteurs hormonaux. La dérégulation de ces récepteurs dans un cancer hormono-dépendant comme celui de la prostate peut être lié à la carcinogénèse prostatique.

Entre 1972 et 1993 dans les bananeraies Antillaises, le **chlordécone** aux propriétés œstrogéniques a largement été utilisé comme insecticide, sauf que ce composé ne se dégrade pas bien et a contribué à polluer les sols et les eaux d'où proviennent les aliments consommés par la population (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation (ANSES)). L'exposition de la population à cette molécule a considérablement augmenté le risque de développer un cancer de la prostate [40]. Aussi, l'exposition au **bisphénol A**, une substance chimique de synthèse utilisée pour la fabrication industrielle de plastique entraîne un risque plus élevé de développer un cancer de la prostate [41]. *In vitro*, ce composé peut altérer l'expression d'une enzyme clé, la 5 α -réductase, qui permet de transformer la testostérone en DHT, métabolite qui stimule 2 à 10 fois plus les cellules prostatiques [42].

Les agriculteurs sont particulièrement exposés aux **pesticides** durant leurs activités. Il a été démontré que le risque de développer un cancer de la prostate est accru dans plusieurs activités agricoles en France (élevage bovin et porcin, prairies et cultures fruitières) [43]. Au Royaume-Unis, la même observation a été faite, notamment après une exposition forte aux composés de dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), simazine et lindane [44].

e. Les facteurs protecteurs

Le cancer peut être prévenu dans 40% des cas, ce qui représente 142 000 cas en France, grâce à des changements dans les comportements de vie (Inca 2018).

L'alimentation joue un rôle primordial pour prévenir les maladies et le cancer. La consommation de **légumes** réduit le risque de développer un cancer [45]. La consommation de tomates et d'aliments riches en **caroténoïdes**, et plus particulièrement en lycopène permet de réduire le risque de développer un cancer de la prostate [46]. Le lycopène, dans des concentrations alimentaires et circulantes, est inversement associé au risque de développer cancer de la prostate et ceci de façon significative et dose-dépendante [47]. Cette activité anti-cancéreuse proviendrait du pouvoir anti-oxydant des carotènes [48].

La consommation de **thé vert** semble avoir un effet bénéfique sur le cancer car il contient des **polyphénols**, molécules également anti-oxydantes. Les polyphénols seraient capables de diminuer la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses par inhibition du cycle cellulaire et de réguler négativement une histone désacétylase. La régulation à la baisse de l'histone désacétylase contribuerait à l'augmentation de l'expression de p21 dans les cellules du cancer de la prostate [49]. Le thé vert est aussi riche en **catéchines**. Chez des hommes atteints de PIN hauts gradés, l'incidence de développer un cancer de la prostate dans le groupe ayant consommé quotidiennement des catéchines était de 3% alors qu'elle était de 30% dans le groupe « placebo » [50].

Les **phyto-œstrogènes** sont des isoflavones contenus dans le soja et ont une structure similaire à celle du 17β -œstradiol (E2). Ils sont ainsi capables de mimer l'effet des œstrogènes chez l'Homme en modulant la voie métabolique des œstrogènes. Les deux principales molécules sont la **génistéine** et la **daïdzéine** et elles sont capables d'agir sur la méthylation de l'ADN de gènes impliqués dans le cancer de la prostate [51]. Des études antérieures dans le laboratoire ont montré une diminution de la méthylation de l'ADN sur le promoteur des gènes *BRCA1*, *Glutathione S-Transferase Pi 1 (GSTP)* et *Ephrin type-B receptor 2 (EPHB2)* par les phyto-œstrogènes dans le cancer de la prostate [52]. La génistéine et la daïdzéine auraient également des effets sur les marques d'histones avec une augmentation des marques activatrices comme la lysine 29 de l'histone 3 acétylée (H3K9ac) et une diminution des marques répressives comme H3K27me3. Ces composés ont sur les cellules cancéreuses de la prostate un effet sur le contrôle du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et l'inhibition de l'angiogenèse [53].

2. L'épigénétique dans le cancer de la prostate

a. L'épigénétique

i. Définition

Toutes nos cellules contiennent le même patrimoine génétique porté par 46 chromosomes supportant eux-mêmes environ 25 000 gènes. Et pourtant, nos cellules sont différentes d'un tissu à un autre et n'utilisent donc pas toutes ces informations génétiques de la même façon. Un génotype peut conduire à plusieurs phénotypes. Ceci peut s'expliquer par les mécanismes épigénétiques.

L'épigénétique est définie comme l'étude des changements de l'expression ou de l'activité des gènes sans modification de la séquence ADN. Il existe différents mécanismes épigénétiques qui conduisent à la modification de l'expression des gènes. Ces modifications sont réversibles au cours du temps, en fonction des besoins, et transmissibles à la descendance. Ces changements affectent la compaction de la chromatine des cellules qui lisent l'information génétique supportée par les gènes différemment. Par conséquent, une dérégulation de ces mécanismes épigénétiques peut conduire à l'initiation et à la progression de maladies variées comme le cancer de la prostate. Les cellules de l'organisme reçoivent une multitude d'informations, que ce soit au cours du développement ou bien suite à une exposition prolongée à une substance chimique, comme le tabac ou l'alcool. Ce sont ces informations venant de l'environnement, interne ou externe, qui conduisent à modifier l'état actif ou inactif de certains gènes par le biais de modifications épigénétiques et *in fine*, à modifier l'état et l'identité de la cellule. Il existe différents types de modifications épigénétiques (**Figure 10**) : Nous définirons brièvement celles concernant les ARN non codants et la méthylation de l'ADN, puis, nous décrirons la structure de la chromatine pour mieux définir dans une autre partie les PTMs.

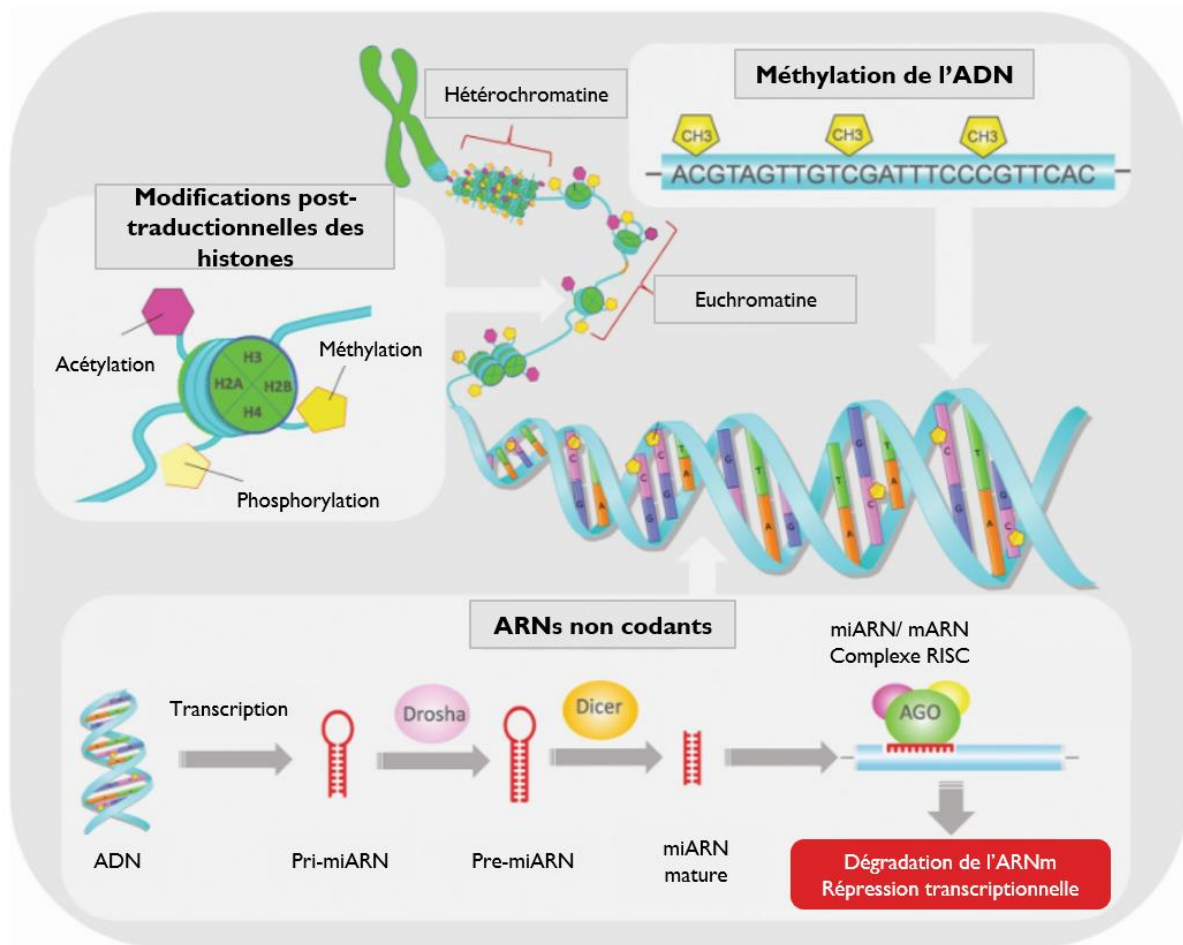


Figure 10 : Les différents types de modifications épigénétiques.

A. La méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG. B. Les modifications post-traductionnelles de l'ADN, comme l'acétylation, la méthylation ou la phosphorylation de la queue des histones dans les nucléosomes et qui contribuent à modifier la compaction de la chromatine. C. Les petits ARN non codants, tels que les microARNs, qui régulent négativement l'activation du gène correspondant *via* l'inhibition de la transcription et de la traduction de l'ARNm [54].

ii. Les ARN non codants

Les ARN non codants (ncARNs) sont classés selon leur longueur : courts si < 200 nt et longs si > 200 nt. Il existe les micro ARNs (miARNs), les short interfering (siARNs), les piwi-interacting ARNs (piARNs) et les long non coding ARNs (lnARNs). Ils diffèrent entre eux par leur biogénèse et leurs modes d'action [55,56]. Un tableau récapitule la taille et le mode d'action de certains ncARNs (**Figure 11**).

<i>ncARNs</i>	<i>Longueur</i>	<i>Description du mécanisme d'action</i>
<i>miARNs</i>	21-23 nt	ARN simple brin se repliant sur lui-même pour former un ARN double brin tige –boucle. Liaison au complexe RISC et ciblage des ARNm pour réguler la traduction (clivage, une dégradation, blocage de la traduction)
<i>siARNs</i>	20-25 nt	ARN double brin qui peuvent emprunter la voie de silencing post-transcriptionnelle des gènes, qui conduit à la dégradation de l'ARNm dans le cytoplasme, ou la voie de silencing transcriptionnelle des gènes impliquée dans la modification de la chromatine.
<i>piARNs</i>	27-30 nt	ARN simple brin qui se lie aux protéines PIWI pour induire une régulation épigénétique et un contrôle des transposons.

Figure 11 : Les ncARNs courts et leurs mécanismes d'action.

Nt: nucléotides; RISC: RNA-induced silencing complex. Modifiée à partir de [55].

iii. La méthylation de l'ADN

Elle est particulièrement étudiée et consiste à l'ajout d'un groupement méthyle provenant d'un fournisseur S-adenosyl-L-méthionine (SAM) sur la cytosine d'un dinucléotide CpG afin de la transformer en 5-méthylcytosine. Cette réaction est catalysée par une ADN méthyltransférase (DNMT). La DNMT3A et DNMT3B méthylient de *novo* l'ADN. La DNMT1 a une activité de maintenance de la méthylation de l'ADN au cours de la réplication. La DNMT1 agit en collaboration avec une autre protéine à multi-domaine, la E3 ubiquitin-protein ligase nommée Ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1 (UHRF1). Lors de la mitose, les brins d'ADN méthylés sont séparés pour être distribués dans les deux cellules filles. Lors de la réplication, un héli brin non méthylé est nouvellement synthétisé. En association avec UHRF1 qui ubiquityle les queues d'histone H3, DNMT1 peut méthyler le brin d'ADN nouvellement

synthétisé afin de maintenir le niveau de méthylation dans les cellules filles [57]. L'hypo méthylation permet aux gènes de s'exprimer tandis que l'hyperméthylation est associée à une diminution de l'expression génique. Les groupements méthyles ont tendance à encombrer l'ADN, le rendant inaccessible à la machinerie transcriptionnelle (**Figure 12**) [58]. La méthylation de l'ADN peut également contribuer à la formation de l'hétérochromatine par le recrutement de remodeleurs de la chromatine par les DNMTs *de novo*. Elles fonctionnent en complexe avec la lymphocyte-specific helicase (LSH), des HMTs de H3K9 et des HDACs. Le recrutement des remodeleurs peut également se faire par le biais de la 5mC et de protéines « liseuses » methyl-CpG-binding domain (MBD) [57].

Toutefois la méthylation de l'ADN peut jouer un rôle contre-intuitif dans l'activation des gènes. Par exemple, le déplacement de la marque répressive H3K27me3 par l'ajout d'un groupement méthyle au niveau de l'ADN contribue à une activation des gènes par perte de H3K27me3 dans des conditions physiologiques, notamment sur les gènes de développement [59]. La régulation de la méthylation de l'ADN est particulièrement importante dans l'inactivation du chromosome X, l'empreinte génomique et les gènes spécifiques aux lignées germinales [58].

La méthylation de l'ADN est réversible par la déméthylation. Elle fait intervenir des enzymes méthylcytosinedioxygénases Ten-eleven translocation 1,2,3 (TET). Elles oxydent progressivement la 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), 5-formylcytosine (5fC) et 5-carboxylcytosine (5caC). Dans le cas de la 5fC et de la 5caC, la déméthylation peut également se produire par l'élimination de bases par la thymine ADN glycosylase (TDG), suivie par une activation du système nucléotide excision repair (NER) [57]. La déméthylation passive de l'ADN peut être réalisée au cours de la division cellulaire en l'absence d'activité de maintenance de la DNMT1 [60].

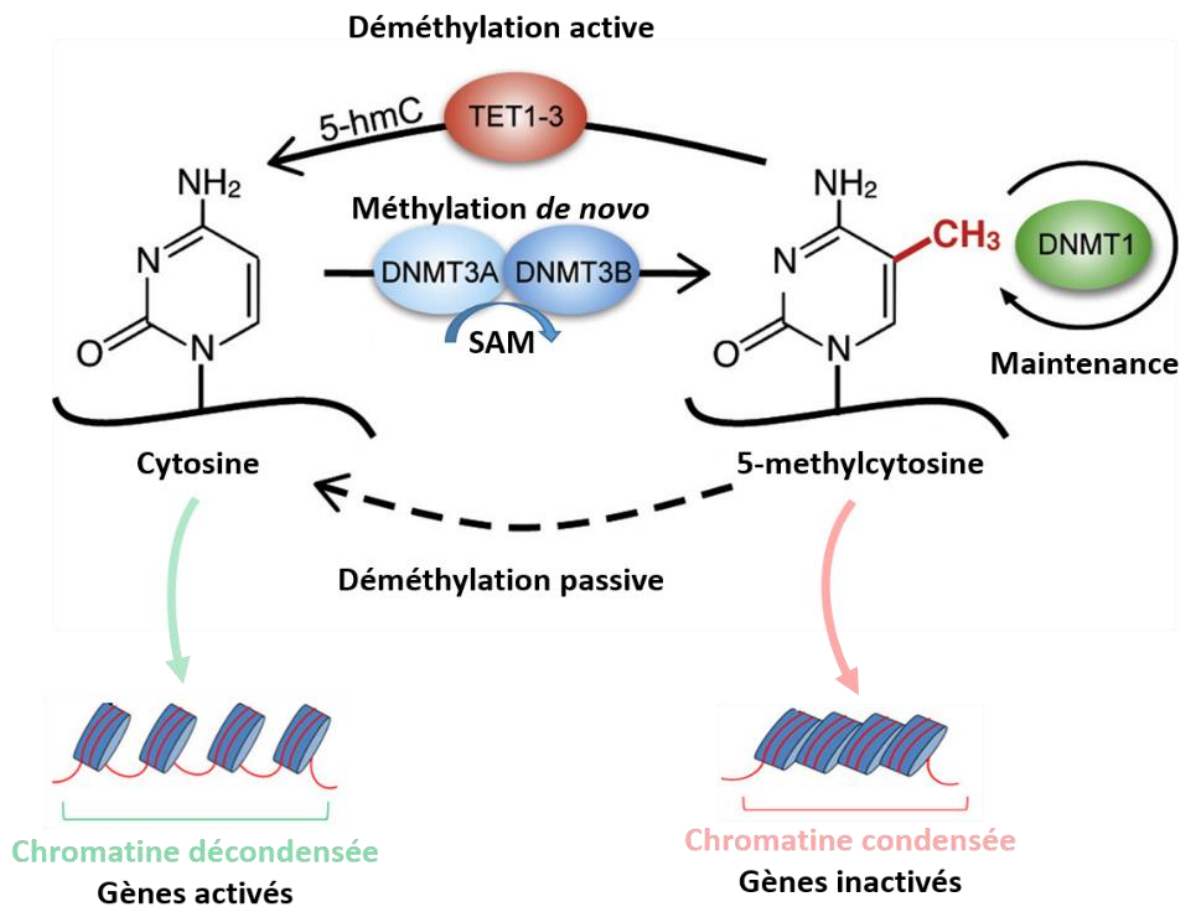


Figure 12 : Les mécanismes de méthylation de l'ADN.

Les mécanismes de méthylation *de novo* et de déméthylation active de l'ADN sont réalisés respectivement par les enzymes DNMT3A/DNMT3B et les déméthylases TET1-3. Les méthylations introduites sont préservées par la DNMT1 de maintenance pendant la réplication. La déméthylation passive de l'ADN est réalisée au cours de la division cellulaire en l'absence d'activité de DNMT1. L'état de méthylation de l'ADN peut influencer sur l'accessibilité des facteurs de transcription au niveau de l'ADN ainsi que sur la compaction de la chromatine. Modifiée à partir de [60].

iv. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les PTMs contribuent également à réguler l'épigénétique. C'est directement sur l'état de compaction de la chromatine que ces modifications ont une conséquence [61]. En effet, la chromatine est composée d'une répétition de nucléosomes qui contiennent chacun environ 147 pb d'ADN enroulés autour d'un octamère d'histones (2H2A, 2H2B, 2H3, 2H4) et H1 qui a pour rôle de verrouiller la structure nucléosomale. La chromatine est donc composée d'ADN, de petites protéines basiques (les histones) et de protéines non histones impliquées dans la réplication et la transcription. Le nucléosome est le premier niveau de condensation de l'ADN et est décrit comme l'unité fondamentale de la structure chromatinienne [62,63]. Le repliement des nucléosomes les uns sur les autres forme la fibre chromatinienne de 30 nm qui en auto-interagissant avec elle-même forme des boucles chromatinienne. Ces boucles possèdent en amont des éléments régulateurs qui permettent de contrôler la transcription des gènes. Elles s'associent pour former des compartiments de chromatine. Les chromosomes occupent finalement dans le noyau un espace bien distinct générant des territoires de gènes définis (**Figure 13**) [64].

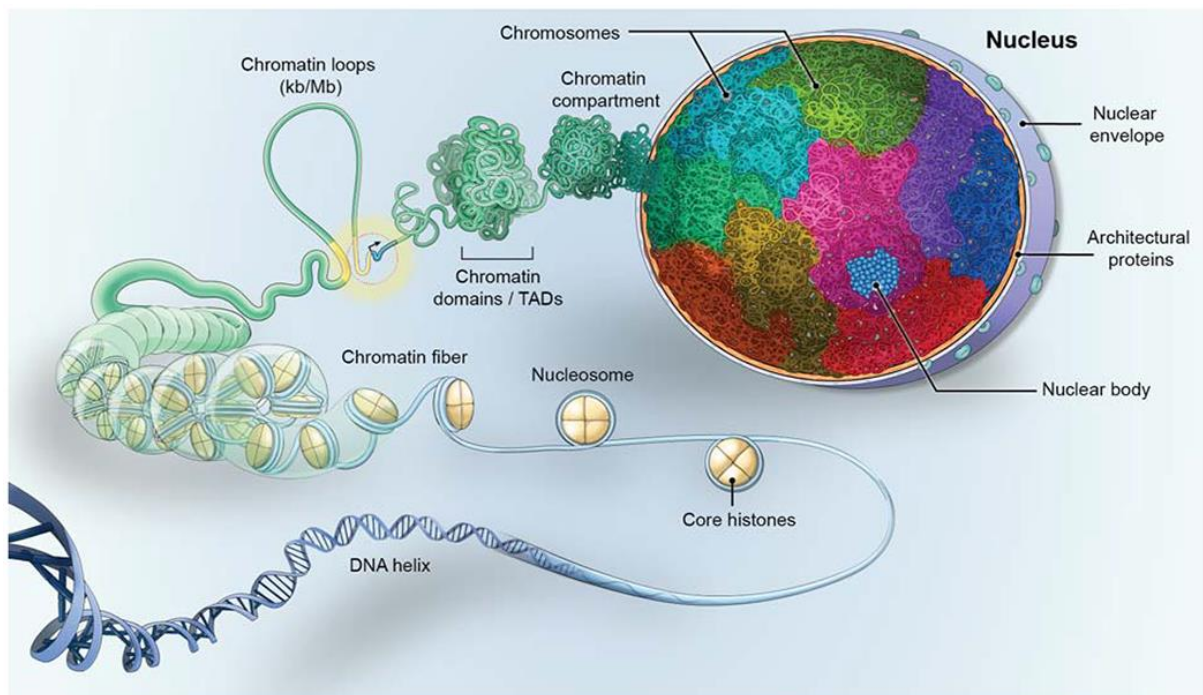


Figure 13 : L'organisation du génome eucaryote.

Les éléments organisationnels de base du génome sont les fibres, les boucles, les domaines et les compartiments que forme la chromatine, ainsi que les chromosomes. Ces caractéristiques organisent le génome et permettent la compaction de 2 mètres d'ADN dans un noyau cellulaire d'environ 10 μm . TADs: Topologically Associated Domain [64].

La chromatine peut être très dense, on parle d'hétérochromatine. Les gènes ne s'expriment pas dans ces régions-là. L'hétérochromatine peut être facultative, c'est-à-dire qu'elle peut passer de manière réversible dans un état décondensé. Ou bien, elle peut être constitutive lorsque les gènes sont silencieux en permanence comme par exemple les centromères et les télomères. Toutefois, il existe des régions moins denses appelées euchromatine qui sont accessibles à la machinerie transcriptionnelle. Par conséquent, ce sont des régions où les gènes peuvent s'exprimer. Ces différents états de condensation de la chromatine peuvent être régulés par les modifications épigénétiques des histones, les PTMs.

Les histones sont des protéines basiques très conservées au cours de l'évolution qui comportent trois hélices α et forment une structure appelée « histone fold ». Les hélices α sont reliées entre elles par des boucles (L1 et L2). Les histones forment des dimères par interactions entre leurs longues hélices $\alpha 2$. Elles possèdent une queue C-terminale située au centre de l'octamère d'histone et une queue N-terminale, à l'extérieur, pouvant être modifiée par des PTMs et souvent enrichie en lysine (K) et en arginine (R) (**Figure 14**) [65].

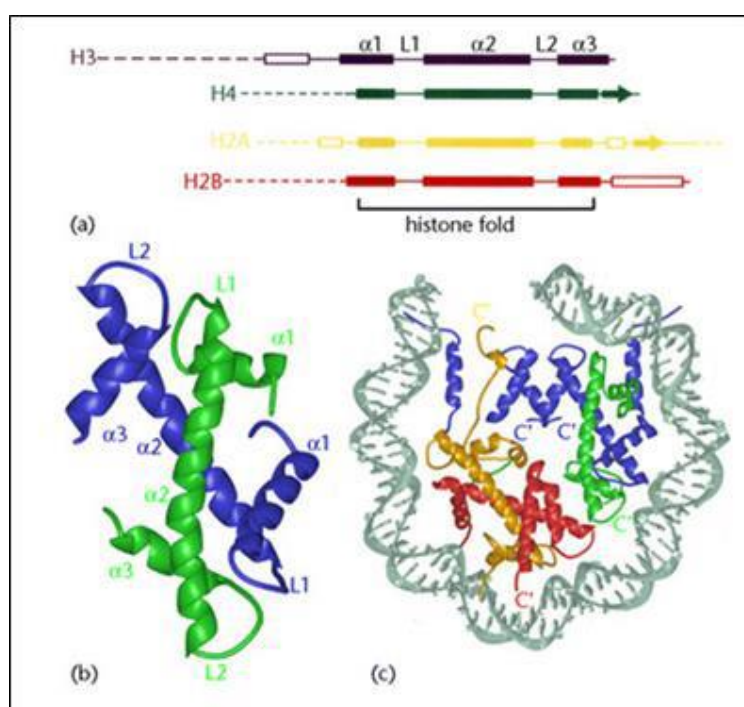


Figure 14 : Structure des histones et organisation du nucléosome.

(a) Structure schématique des 4 protéines histones H3, H4, H2A H2B et représentation de « l'histone fold » (b) Dimère d'histones : H3 en bleu et H4 en vert. (c) Représentation de l'octamère d'histone avec les queues C terminales notées C' [65].

Les PTMs sont variées et sont représentées par l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitinylation, la phosphorylation, la sumoylation, l'ADP ribosylation et bien d'autres modifications des histones. Du fait de la configuration du nucléosome, les histones 3 (H3) et histone 4 (H4) sont les plus affectées par les PTMs [61]. Tout comme on parle de code génétique, on parle dans le domaine de l'épigénétique de « code histone ». Ce code met en lien les modifications épigénétiques de la queue N-terminale des histones et la modification de la structure de la chromatine et donc de l'état transcriptionnel [2,66]. Par exemple, un état hypo acétylé associé à une hyper méthylation des histones est souvent traduit par une activité transcriptionnelle faible alors qu'hyper acétylation et hypo méthylation sont associées à une activité transcriptionnelle élevée [63]. Néanmoins, il existe un « cross-talk » permanent entre toutes les marques épigénétiques en fonction de leur localisation dans le génome à un moment donné. Ceci apporte une complexité en plus car ce « cross-talk » entre les marques a un impact sur l'expression des gènes, l'intégrité et la stabilité du génome [67,68].

Le recrutement de protéines et de complexes enzymatiques est indispensable pour le dépôt, la lecture et la suppression des PTMs [62,69]. Nous décrivons ces mécanismes pour l'acétylation des histones et la méthylation des histones.

- L'acétylation des histones

Cette modification consiste à l'ajout d'un acétyle au niveau de la queue N-terminale d'une histone. L'acétyle neutralise la charge positive de l'histone. Ceci rend l'interaction avec la charge négative du phosphate de l'ADN plus faible, c'est pourquoi l'acétylation est souvent associée à une ouverture de la chromatine. Un acétyle est déposé par une histone acétyltransférase (HAT). Il en existe deux grandes familles, les HAT de type A, sous classées en Gcn5-related N-acetyltransferases (GNAT), MYST et CBP/p300, qui acétylent les histones des nucléosomes dans le noyau et les HAT de type B, le plus souvent cytoplasmiques qui acétylent des histones non liées à la chromatine [61]. Le motif est ensuite lu par une protéine avec un motif bromodomaine. Souvent, les protéines modificatrices d'histones acétylées comportent ce type de domaine. De façon générale, les protéines à bromodomaine lient la chromatine au niveau des résidus lysines acétylées. Les protéines à chromodomaine sont capables de reconnaître plus particulièrement les lysines méthylées des histones mais certaines protéines à chormodomaine sont des HATs et permettraient également de reconnaître des histones acétylées [70]. L'acétylation est réversible grâce à l'action des histones désacétylases

(HDACs). Il en existe quatre classes : I, II, III (Sirtuins), IV. Elles font souvent partie de complexes multiprotéiques et par conséquent ont une faible spécificité de substrat.

Une dérégulation des acteurs enzymatiques impliqués dans la modulation de l'épigénome entraîne des altérations de l'expression des gènes et peut notamment entraîner une surexpression des oncogènes et à l'inverse une sous-expression des suppresseurs de tumeurs. Par exemple, dans des adénocarcinomes de prostate, il a été mis en évidence une déficience dans l'acétylation des queues N-terminale des histones 3 en comparaison à des tissus sains ainsi qu'une activité significativement plus élevée des HDACs dans des lignées cellulaires cancéreuses [71].

- La méthylation des histones

La méthylation des histones est médiée par des histones méthyltransférases (HMTs) au niveau de résidus lysine ou arginine. La lysine peut être mono- di- ou triméthylée alors que l'arginine est diméthylée de façon symétrique ou asymétrique [61,72]. A l'inverse de l'acétylation ou de la phosphorylation, la méthylation n'affecte pas les interactions entre l'ADN et les histones. Cette PTMs peut être reconnue par des protéines qui contiennent des motifs variés : chromo, plant homeodomain (PHD), tudor etc. [69].

Nous nous intéresserons principalement à la méthylation des lysines des histones. La HMT impliquée transfère à partir d'un donneur de méthyle SAM, un groupement –CH₃ sur un groupe ε-amino de la lysine. Toutes les HMTs qui visent les lysines (sauf l'histone-lysine N-méthyltransferase, H3 lysine-79 specific (Dot1)) possèdent un domaine Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax (SET) qui exerce l'activité catalytique des enzymes [69]. En fonction de l'homologie de séquence du domaine SET et de part et d'autre du domaine catalytique, les HMTs sont classés en 6 catégories : la famille des SUV39, EZH, SET2, PRDM, SMYD et la famille sans domaine SET (Dot1) [73]. De plus, en fonction de l'histone, du résidu ciblé et du statut de la méthylation (mono-di-tri-), l'effet sur la transcription n'est pas le même. La monométhylation est plutôt associée à une activation de la transcription tandis qu'une méthylation multiple se retrouvera majoritairement dans des régions génomiques à faible activité transcriptionnelle. De la même façon, la marque H3K4 méthylée est généralement retrouvée dans l'euchromatine tandis que H3K9 et H3K27 méthylées sont essentiellement retrouvées dans l'hétérochromatine (**Figure 15**) [73,74].

Histone marks	Transcription	Genomic regions
H3K4me1 H3K4me2 H3K4me3 H3K9me1 H3K27me1 H3K36me1 H3K36me3 H4K20me1	Active	<ul style="list-style-type: none"> • Promoters • Enhancers • Gene bodies
H3K4me3 H3K27me3 H3K9me3	Poised	<ul style="list-style-type: none"> • Promoters (for example, of developmental genes)
H3K27me3	Repressed	<ul style="list-style-type: none"> • Promoters • Enhancers • CpG-rich regions
H3K9me3	Repressed	<ul style="list-style-type: none"> • Promoters • Enhancers
H3K9me2 H3K27me3	Repressed	<ul style="list-style-type: none"> • Promoters (for example, of neuronal genes) • X-inactivation centre
H3K9me2 H3K9me3 H3K20me3	Repressed	<ul style="list-style-type: none"> • Repeats (for example, pericentromeric and LTR)




Figure 15 : Marques de méthylation des histones H3 et H4, leurs emplacements génomiques et leurs effets habituels sur la transcription.

[73]

Avant la découverte de la déméthylase Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1/KDM1A) en 2004, la méthylation des lysines était considérée comme irréversible. Or les déméthylases d'histones (KDMs) permettent de moduler la méthylation des histones de façon dynamique (**Figure 16**). LSD1 est capable de déméthyliser la mono- et la diméthylation des lysines 4 et 9 de l'histone 3 [75]. Aujourd'hui plus d'une vingtaine de déméthylases ont été identifiées et caractérisées. Elles sont classées selon leurs mécanismes catalytiques.

La famille des LSD requiert un Flavin-Adénine dinucléotide (FAD) comme co-facteur afin de libérer l'histone déméthylée. C'est la formation d'un intermédiaire imine qui permet aux déméthylases de cette famille de ne déméthyliser que les lysines mono- et diméthylées [76].

La deuxième famille est la Jumonji C (Jmjc) dioxygénation-dépendante qui utilise un ion Fe^{2+} et de l' α -cétoglutarate. Elle cible les méthylation des lysines et des arginines. Contrairement à la famille des LSD, les protéines Jmjc sont capables de retirer les trois états de méthylation des lysines [77]. La première protéine Jmjc à avoir été décrite en 2006 par Tsukada *et al.* est KDM2A qui agit sur H3K36. Il a mis en évidence que le domaine Jmjc est un motif caractéristique des histones déméthylases et déterminé que 30 protéines possédaient ce type de

domaine [78]. De plus, les protéines Jmjc sont aussi retrouvées chez les bactéries alors que ces dernières ne possèdent pas d'histones. Ceci sous-entend que ces acteurs pourraient avoir un autre rôle que celui de déméthylase [79]. Il se pourrait qu'une dernière classe soit identifiée un jour. Cette hypothèse repose largement sur le fait qu'aucune déméthylase n'est connue pour être spécifique de la déméthylation de la marque H3K79, marque qui est aussi l'unique résidu à être méthylée par Dot1 (seule méthyltransférase sans domaine SET).

Comme tout acteur intervenant dans les modifications épigénétiques, une dérégulation de l'activité des déméthylases peut conduire à une expression aberrante de gènes normalement mis sous silence. D'ailleurs, LSD1 a été retrouvée surexprimée dans le cancer de la prostate et de la vessie et il se trouve être un co-régulateur du RA [80].

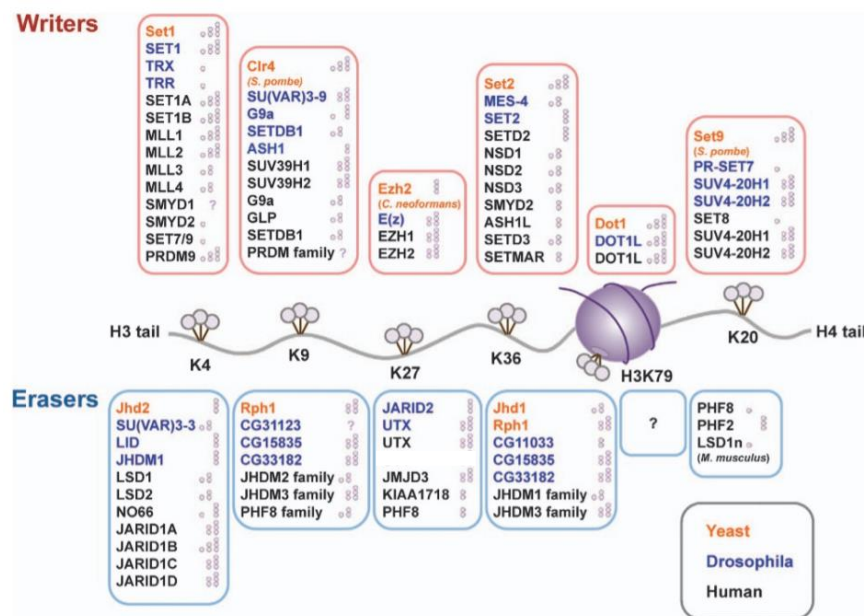


Figure 16 : Représentation schématique d'un nucléosome montrant les principaux sites de méthylation des lysines sur les histones H3 et H4.

Les auteurs (méthyltransférases) et les effaceurs (déméthylases) indiqués pour chaque méthylation de la lysine sont également représentés avec leurs spécificités d'état de méthylation [69].

b. Les trois régulateurs de la marque épigénétique répressive H3K27me3 dans le cancer de la prostate

i. La méthyltransférase EZH2

- Complexe protéique et mode d'action sur H3K27

La méthyltransférase EZH2 est une sous unité catalytique du groupe Polycomb repressive complexe 2 (PRC2), membre de la famille des polycomb-group proteins (PcG). Ce sont d'importants régulateurs répressifs de l'expression des gènes et ils sont très conservés au cours de l'évolution. Au total, le complexe PRC2 est composé de 4 sous unités principales : EZH2, suppressor of zeste 12 (SUZ12), embryonic ectoderm development (EED) et retinoblastoma suppressor associated protein 46/48 (RbAp46/48). EZH2, SUZ12 et EED ont été décrits comme étant indispensables pour le dépôt de la méthylation sur H3K27 [81–83], en revanche, le rôle de RbAp46/48 dans ce complexe n'est pas encore bien identifié. Certains pensent que RbAp46/48 n'est pas nécessaire pour induire l'activité enzymatique médiée par EZH2. La perturbation de RbAp46/48 a peu ou pas d'effet sur l'affinité globale de PRC2 au niveau du nucléosome [84]. Le complexe PRC2 contient aussi des sous unités auxiliaires comme : l'adipocyte enhancer-binding protein 2 (AEBP2), jumonji/ARID domain-containing protein2 (JARID2) et polycomb like (PLC) proteins 1, 2, 3 [85,86] (**Figure 17**).

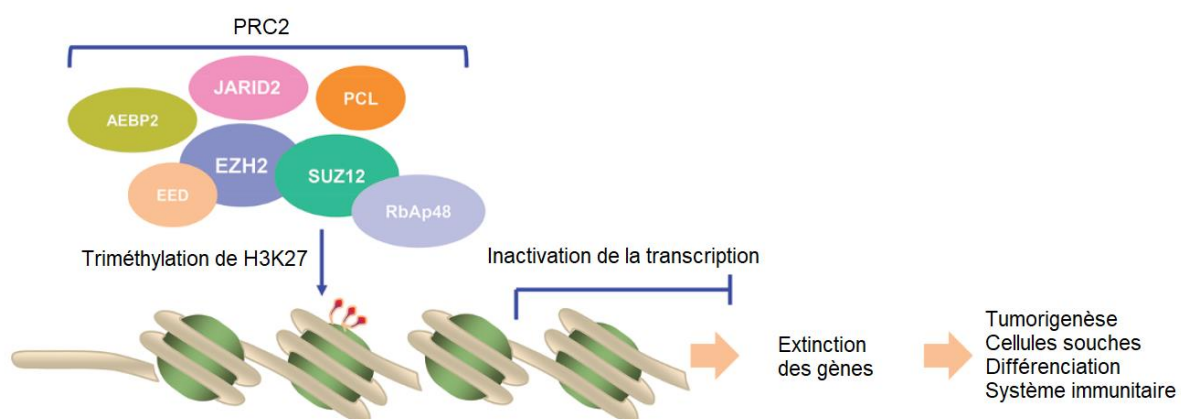


Figure 17 : Modèle du complexe PRC2 humain.

EZH2, EED, SUZ12, et RbA48 sont des sous-unités centrales, tandis que JARID2, PCLs, AEBP2 sont des sous-unités auxiliaires. Le complexe PRC2 catalyse la tri-méthylation de H3K27, ce qui conduit au compactage du nucléosome et l'extinction de la transcription. Ceci impact l'expression de gènes impliqués dans divers processus cellulaires. Modifiée à partir de [87].

EZH2 est codée par un gène situé sur le chromosome 7q35. Il est composé de plusieurs domaines dont le domaine SET qui supporte l'activité méthyltransférase d'EZH2. Le Polycomb repressive complexe 1 (PRC1) contribue à la médiation de la répression transcriptionnelle *via* la monoubiquitylation de H2AK119 par des protéines de type RING [88]. Cette monoubiquitylation est reconnue par JARID2 et permet le recrutement de PRC2 au niveau de la chromatine. PRC1 se fixe par son chromodomaine CBX au produit de catalyse d'EZH2, H3K27me3, ce qui permet d'amplifier la répression de l'expression sur des régions génomiques plus larges. Il existe donc une synergie de PRC1 et PRC2 dans la mise sous silence des gènes ciblés [86,89].

- La méthylation des protéines non histones

Néanmoins, la méthyltransférase EZH2 est aussi capable de méthyler des protéines non-histones en relation avec le complexe PRC2. La sous-unité auxiliaire JARID2 est méthyliée par EZH2. Cette modification est reconnue par l'unité EED et déclenche une activation d'EZH2. Il existe donc une boucle de régulation où la méthylation de JARID2 ajuste l'activité de PRC2 en fonction du contexte chromatinien (**Figure 18**)[90].

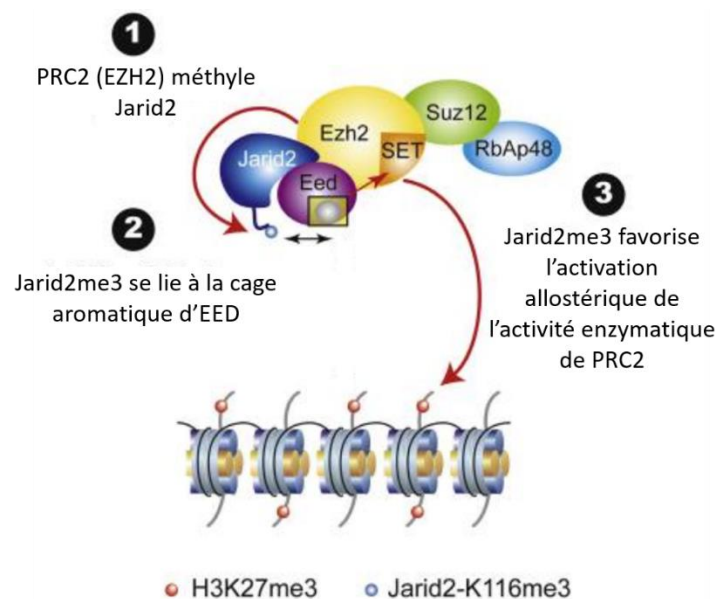


Figure 18 : Régulation du dépôt de la marque H3K27me3 par JARID2-K116me3.

La méthylation de JARID2 au niveau de sa lysine 116 est reconnue par la cage aromatique de EED et permet d'ajuster l'activité enzymatique d'EZH2. Modifiée à partir de [90].

EZH2 peut réguler la méthylation de facteur de transcription comme la GATA binding protein 4 (GATA4). Ceci contre balance l'acétylation de GATA4 médiée par P300 et permet la répression de l'expression de GATA4 [91].

Outre sa capacité à réprimer l'expression des gènes, il semblerait qu'EZH2 ait **un rôle dans l'activation** directe ou indirecte des gènes : Dans un modèle de CRPC, EZH2 est une co-activatrice du RA indépendamment de PRC2. Ce changement fonctionnel dépend de la phosphorylation sur la sérine 21 d'EZH2 mais nécessite toutefois un domaine méthyltransférase intact. L'étude suggère qu'EZH2 exerce sa fonction d'activation en modifiant la méthylation du RA ou des protéines associées au RA ce qui permet la transcription des gènes cibles du RA [92]. Tout comme le RA, E2F1 pourrait aussi être une cible non histone d'EZH2. Ils peuvent former un complexe transcriptionnel EZH2/E2F1 et se colocaliser sur des sites chromatiniens spécifiques pauvres en H3K27me3 pour activer des gènes cibles en aval, essentiels à la progression du cancer de la prostate [93]. De la même façon que pour le RA, mais d'une manière PRC2-dépendante, la phosphorylation d'EZH2 peut conduire à la méthylation activatrice du signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) qui favorise la tumorigénicité des cellules souches de glioblastome [94]. Aussi, la très fréquente fusion entre la *Transmembrane Serine Protease 2* et *ETS-related gene (TMPRSS2-ERG)* fournit un mécanisme de surexpression d'*ERG* induit par les androgènes dans les tumeurs de la prostate. Cette fusion est fréquemment concomitante avec la perte de PTEN. Dans ce contexte, une perte de PTEN entraîne une phosphorylation activatrice d'EZH2 médiée par la surexpression de AKT qui n'est plus régulée par PTEN et une méthylation accrue d'*ERG* sur sa lysine K362, catalysée par EZH2. Ceci contribue à activer un réseau de gènes impliqués dans la progression tumorale par l'interaction fonctionnelle d'*ERG* et EZH2 [95].

- Les rôles d'EZH2 indépendants de son activité méthyltransférase

L'interaction d'EZH2 avec d'autres acteurs permet aussi d'expliquer son rôle en tant qu'activatrice de l'expression. En effet, indépendamment de sa fonction de méthyltransférase, EZH2 peut agir sur la transcription des gènes. Dans le cancer de la prostate, EZH2 est un cofacteur du récepteur aux œstrogènes α (*Er α*) qui permet de réguler l'expression *NOTCH1* pour favoriser la formation de tumeurs et de métastases. Cette étude n'a toutefois pas regardé si l'activité méthyltransférase d'EZH2 pouvait être impliquée [96]. Dans un modèle de cancer du sein, EZH2 transactive les gènes *c-Myc* et *cyclin D1* qui sont ciblés par les voies de

signalisation des œstrogènes et de Wnt en interagissant avec ER α et la β -caténine. Ceci favorise phénotypiquement la progression du cycle cellulaire et la tumorigénèse. Dans ce contexte, le rôle d'EZH2 est indépendant de son domaine SET et du complexe PRC2 [97]. De façon très surprenante, il a également été récemment mis en évidence qu'EZH2, indépendamment de son activité enzymatique et du complexe PRC2, était capable d'induire la transcription du gène RA, par simple occupation du promoteur [98].

La fixation d'EZH2 à la région internal ribosome entry site 1 (IRES1) dans la région 5'UTR de l'ARNm de p53 muté entraîne une augmentation de la stabilité et de l'expression de l'ARNm de p53 muté dans un modèle de cancer de la prostate. Ceci donne à EZH2 un rôle dans **le contrôle de la traduction** de protéines mutantes favorisant la progression tumorale [95]. Une autre étude très récente révèle un rôle d'EZH2 dans la régulation de la traduction, inconnu jusqu'ici. EZH2 augmente la méthylation médiée par la fibrillarin (FBL) de l'ARNr par interaction directe avec la FBL. La méthyltransférase renforce l'interaction FBL-NOP56 (Nucleolar Protein of 56.8 kDa) ce qui facilite la biogénèse de la sous-unité ribosomal 60S et contribue à l'initiation de la traduction [99].

- Les liens d'EZH2 avec les ADN méthyltransférases

EZH2 peut interagir avec d'autres acteurs épigénétiques. En effet, la méthyltransférase peut être nécessaire pour la fixation des DNMTs au niveau des îlots CpG des promoteurs ciblés par EZH2 [100]. Le ciblage de la méthylation *de novo* spécifique aux tumeurs est préprogrammé par le dépôt de la marque H3K27me3 aux même locus. En revanche, dans les cellules normales, il n'y a pas de recrutement des DNMTs sur les pré-marques H3K27me3. La double modification existe donc spécifiquement dans les cellules cancéreuses [101–103]. Ceci a d'ailleurs été mis en évidence pour le gène suppresseur de tumeur *nuclear retinoic acid receptor β* (*RAR β*) dans le cancer de la prostate, qui est réduit au silence grâce à la coexistence des deux systèmes répressifs [104]. Les différents modes d'action d'EZH2 sont schématisés sur la **Figure 19** avec ses actions :

- Sur les histones
- Sur les protéines non histones
 - De façon PRC2-dépendant
 - De façons PRC2-indepépendant
- Sur la méthylation d'ADN *de novo*

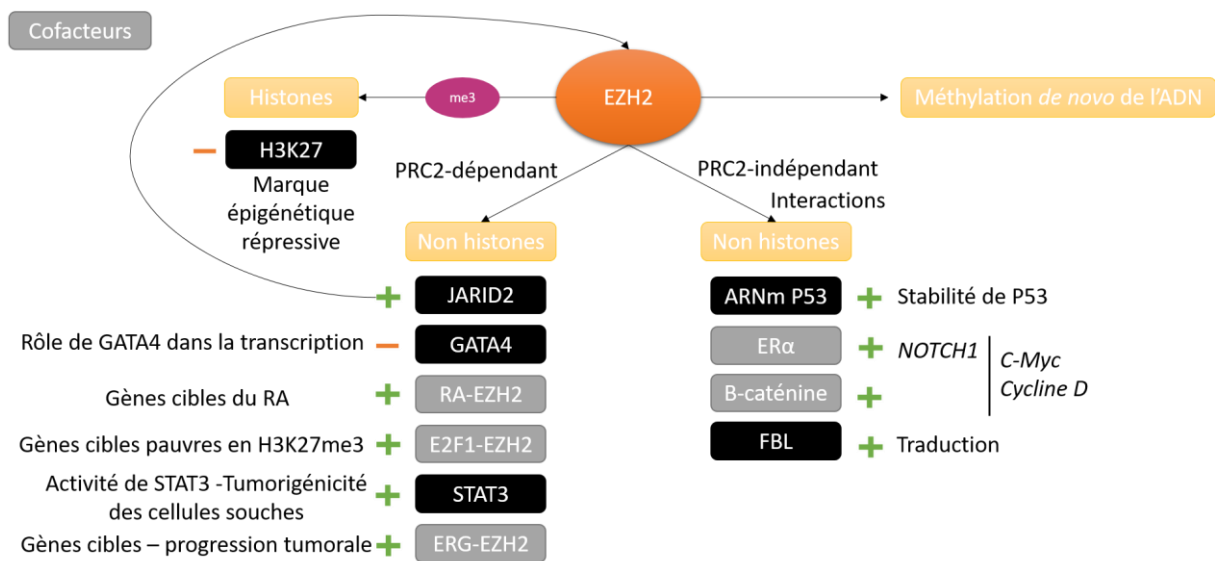


Figure 19: Les différents modes d'action d'EZH2.

EZH2 peut exercer son activité en tant que méthyltransférase de H3K27 par tri-méthylation afin d'inhiber l'expression de gènes cibles. EZH2, de façon PRC2-dépendante, peut agir directement sur des protéines non histones en les méthylant (GATA4, STAT3 et JARID2) ou en tant que cofacteur de protéines non histones (RA, E2F1 et ERG). De façon PRC2-indépendante, l'interaction d'EZH2 avec l'ARNm de P53 et la FBL permet une action d'EZH2 dans la régulation de la traduction. ERα et la β-caténine sont des cofacteurs d'EZH2 ne nécessitant pas le complexe PRC2 et contribuent à l'activation de la transcription de gènes cibles (*NOTCH1*, *C-myc*, *Cycline D*). Ces différents modes d'action aboutissent à une régulation positive ou négative.

- La méthyltransférase EZH2 dans le cancer la prostate

EZH2 est hautement surexprimée dans une large variété de cancers [105,106]. Les premiers travaux de recherche sur l'implication d'EZH2 dans le cancer de la prostate ont été réalisés en 2002, par Varambally *et al.*. Ils ont montré que la surexpression de la méthyltransférase dans le cancer de la prostate était associée à un pronostic peu favorable [5]. La dérégulation d'EZH2 dans le cancer de la prostate s'est ensuite confirmée dans plusieurs études qui mettaient également en avant un lien entre EZH2 et l'agressivité du cancer. EZH2 était d'autant plus retrouvée surexprimée que le cancer était avancé et de mauvais pronostic. Ceci démontre son importance dans la progression du cancer de la prostate [4,107–118]. Aussi, il n'est pas surprenant de retrouver des acteurs des groupes PcG également amplifiés dans le cancer de la prostate: Les acteurs BIM1, RING et EZH2 ont été retrouvés surexprimés simultanément. EZH2, BIM1 et RING1 sont associées à des caractéristiques pathologiques défavorables dans le cancer de la prostate [108,119]. La corrélation entre surexpression d'EZH2 et augmentation de l'incidence des cancers la prostate signifie qu'EZH2 pourrait être un biomarqueur avantageux pour la clinique. Toutefois, la question de savoir si EZH2 est bien responsable de l'initiation des tumeurs de la prostate demeurerait toujours. Ainsi, une étude a mis en évidence que la transformation néoplasique des cellules de la prostate médiée par EZH2 était plus forte que celle médiée par AKT. Ceci a été réalisé à partir de la transformation néoplasique de la lignée cellulaire épithéliale normale de l'hyperplasie bénigne de la prostate 1 (BPH1) et confirmé par une croissance tumorale *in vivo* et une formation de colonies *in vitro* [120].

EZH2 régule négativement un certain nombre d'acteurs dont le rôle est souvent de limiter la progression tumorale prostatique. Une expression accrue d'EZH2 dans les cellules épithéliales prostatiques normales peut supprimer l'expression du suppresseur de tumeur *disabled homolog 2-interacting protein (DAB2IP)* par un excès de dépôt d'H3K27me3. La protéine issue de la transcription de ce gène est une GTPase activatrice qui maintient le nuclear factor-kappa B (NF-κB)/Ras inactif. *DAB2IP* est donc un puissant inhibiteur de croissance mais est régulée négativement par EZH2 dans le cancer de la prostate (**Figure 20**) [121–123].

Le gène *microseminoprotein beta (MSMB)* code pour la prostatic secretory protein of 94 amino acids (PSP94) sécrétée par la prostate et fonctionne comme un suppresseur de la croissance tumorale et des métastases. L'expression de la PSP94 est perdue dans le cancer de la prostate avancé et hormono-réfractaire, ce qui est corrélé avec une expression accrue d'EZH2

qui réprime la transcription de *MSMB* via la tri-méthylation de H3K27 [124]. EZH2 est aussi recrutée sur le promoteur de l'*Adrenergic Receptor, Beta-2 (ADRB2)* et réprime son expression ce qui confère une invasion cellulaire et transforme les cellules épithéliales bénignes de la prostate [125]. Le faible taux de ADRB2 est d'ailleurs aussi associé à une différenciation neuroendocrine et une survie plus courte [126]. Les cibles d'EZH2 dans le cancer de la prostate sont donc nombreuses, variées et la quasi-totalité possèdent une fonction dans la suppression des tumeurs. Le **tableau 4** recense les gènes cibles d'EZH2 dont il diminue l'expression.

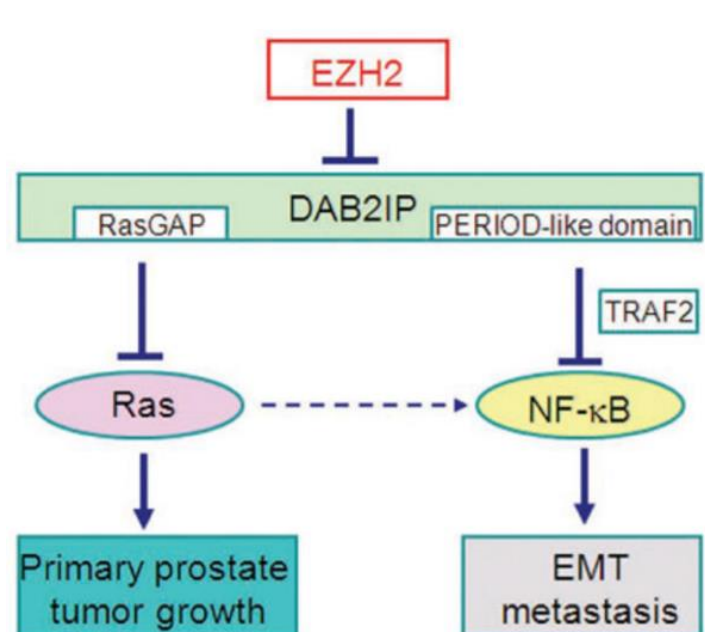


Figure 20 : Modèle de régulation de *DAB2IP* par la méthyltransférase EZH2.

Ras et NF- κ B favorisent le développement tumoral et les métastases dans le cancer de la prostate en l'absence d'expression de *DAB2IP* [123].

Gènes cibles d'EZH2	Références
<i>Runt-related transcription factor 1 et 3</i> (<i>RUNX1</i>) (<i>RUNX3</i>)	[127,128]
<i>Slit Guidance Ligand 2</i> (<i>SLIT2</i>)	[129]
<i>Kruppel-like factor</i> (<i>KLF</i>)	[130,131]
<i>Raf-1 kinase inhibitor protein</i> (<i>RKIP</i>)	[132]
<i>Nephroblastoma overexpressed</i> (<i>NOV</i>)	[133]
<i>Deleted in liver cancer 1</i> (<i>DLC1</i>)	[134]
<i>NKX3.1</i>	[124,135]
<i>RARβ2</i>	[104,114,136,137]
<i>ERα</i> , <i>repulsive guidance molecule A</i> (<i>RGMA</i>), <i>progesterone receptor</i> (<i>PGR</i>)	[114,136,137]
<i>miR-124</i> (indirectement <i>P4HA1</i> qui est régulé par <i>miR-124</i>)	[138]
<i>miR-31</i>	[139]
<i>Macrophage-stimulating protein</i> (<i>MST1</i>) (par coopération de Myc et EZH2)	[140]
<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> (<i>CDKN2A</i>)	[141]
<i>interferon-γ receptor 1</i> (<i>IFNGR1</i>)	[142]
<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i> (<i>TIMP2/3</i>)	[143,144]
<i>Thrombospondin-1</i> (<i>TSP1</i>) (<i>thrombospondin-1</i> , <i>THBS1</i>)	[145]
<i>transmembrane serine-threonine kinase, type II</i> <i>TGF-β receptors</i> (<i>TGFBR2</i>)	[146]
<i>MGMT</i> <i>TRA2A</i> <i>U2AF1</i> <i>RPS6KA2</i>	[8,147]
<i>Hepatocyte Nuclear Factor 1β</i> (<i>HNF1B</i>)	[148]
<i>miR-708</i>	[149]
<i>Forkhead box transcription factor-1</i> (<i>FOXO1</i>)	[150]
<i>RA</i>	[92,98,114,151]
<i>Murine double minute 2</i> (<i>MDM2</i>) (par coopération de BLM et EZH2)	[152]
Cluster <i>miR-99a/let7c/125b-2</i>	[153]

Tableau 4 : Les cibles régulées à la baisse par EZH2.

La régulation à la hausse d'EZH2 dans le cancer de la prostate peut venir de plusieurs mécanismes. Un lien direct entre la voie de contrôle de la croissance cellulaire pRB-E2F et les modifications chromatiniennees régulées par le complexe PRC2 a été identifié. En effet, le facteur de transcription E2F est activé par pRB qui une fois fonctionnel, agit sur le promoteur d'*EZH2* [106,154]. Les facteurs de régulations Erythroblast Transformation Specific (ETS) régulent aussi la transcription d'*EZH2*. Un déséquilibre entre les différents ETS (oncogènes ou suppresseurs de tumeurs) conduit à une expression exacerbée d'*EZH2*. L'expression du suppresseur de tumeur *NKX3.1* se retrouve diminuée par l'action des ETS et d'*EZH2* surexprimée dont il est aussi la cible (**Figure 21**) [135]. Ce déséquilibre peut notamment venir des réarrangements chromosomiques fusionnant le gène *TMPRSS2* à l'oncogène *ERG*. Ceci se produit dans environ 50 % des cancers de la prostate [155]. De plus, le récepteur nucléaire testiculaire 4 (TR4) est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires qui assure la médiation de diverses fonctions biologiques. Il a été démontré que TR4 peut jouer un rôle positif dans l'invasion des cellules pro-génitrices CD133+ du cancer de la prostate car il régule transcriptionnellement *EZH2* en se liant à sa région promotrice 5' [156].

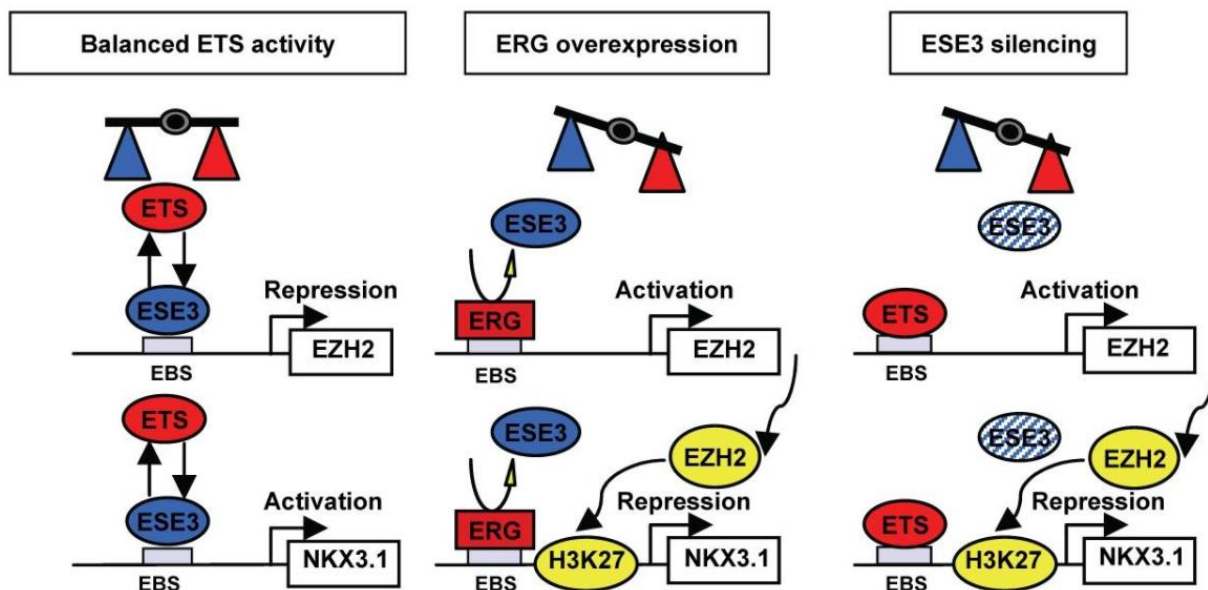


Figure 21 : Modèle de la régulation réciproque d'EZH2 et de Nkx3.1 par des facteurs ETS concurrents.

ESE3 (un facteur ETS suppresseur de tumeur) contrôle l'expression d'*EZH2* et de *Nkx3.1* dans les cellules épithéliales normales de la prostate. La surexpression d'*ERG* ou la perte d'*ESE3* entraîne une expression anormale de ces gènes clés et favorise la transformation cellulaire [135].

Aussi, la dérégulation des modifications post-traductionnelles d'EZH2 peut conduire à la hausse de son expression. En effet, dans des cancers de la prostate *Pten/Trp53* mutant, la protéine S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) est augmentée et protège EZH2 de la dégradation en séquestrant l'ubiquitination médiée par le TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) [157]. La stabilité de la protéine EZH2 peut aussi être régulée par la déubiquitination médiée par l'Ubiquitin-specific protease 44 (USP44) [158] ou l'Ubiquitin-specific protease 7 (USP7) [159]. Ceci contribue à l'augmentation de l'activité d'EZH2 dans le cancer de la prostate. Dans des cellules *PTEN*-null du cancer de la prostate, la perte de *PTEN* entraîne une surexpression d'EZH2 [160]. Ceci n'est pas surprenant puisque PTEN contrôle négativement l'activité d'AKT. En l'absence de PTEN, AKT assure son rôle de kinase par une phosphorylation activatrice (ser21) d'EZH2 [95].

L'intervention des ncARNs peuvent jouer un rôle sur l'augmentation de l'activité d'EZH2 dans le cancer de la prostate. L'ARN non codant metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) est surexprimé dans le CRPC et interagit avec EZH2 pour faciliter son occupation sur le promoteur des gènes cibles et son activité de méthyltransférase dans les cellules du cancer de la prostate [161]. Aussi, dans un contexte cancéreux, la perte génomique de miR-101 [162,163], miR-205 [164], let-7 [165], miR-141 [166] miR-1253 [167], qui régulent négativement EZH2, entraîne une surexpression de ce dernier et une dérégulation concomitante des voies épigénétiques, ce qui entraîne la progression du cancer. De plus, c-Myc est un acteur très important dans la régulation de la transcription d'*EZH2*. Il peut activer son expression dans le cancer de la prostate par deux mécanismes distincts : par l'activation transcriptionnelle directe du promoteur d'*EZH2*, ainsi que par la répression de miR-26a et miR-26b, qui régulent eux-mêmes EZH2 (**Figure 22**) [168,169].

D'ailleurs, il a aussi été mis en évidence un lien fort entre N-myc et EZH2 dans l'évolution d'un adénocarcinome en un cancer de la prostate neuroendocrine car ceci contribue à réduire la signalisation du RA. En revanche, on ne sait pas si EZH2 est une cible directe de N-myc [170]. De plus, l'incidence des cancers de la prostate neuroendocrine est en augmentation. Une équipe a mis en évidence que la déprivation en androgène permet d'activer l'AMPC Response Element-binding (CREB), qui à son tour renforce l'activité d'EZH2. EZH2 favorise l'angiogenèse en réprimant épigénétiquement *TSP1* [145] et la différenciation endocrine en ciblant miR-708 [149].

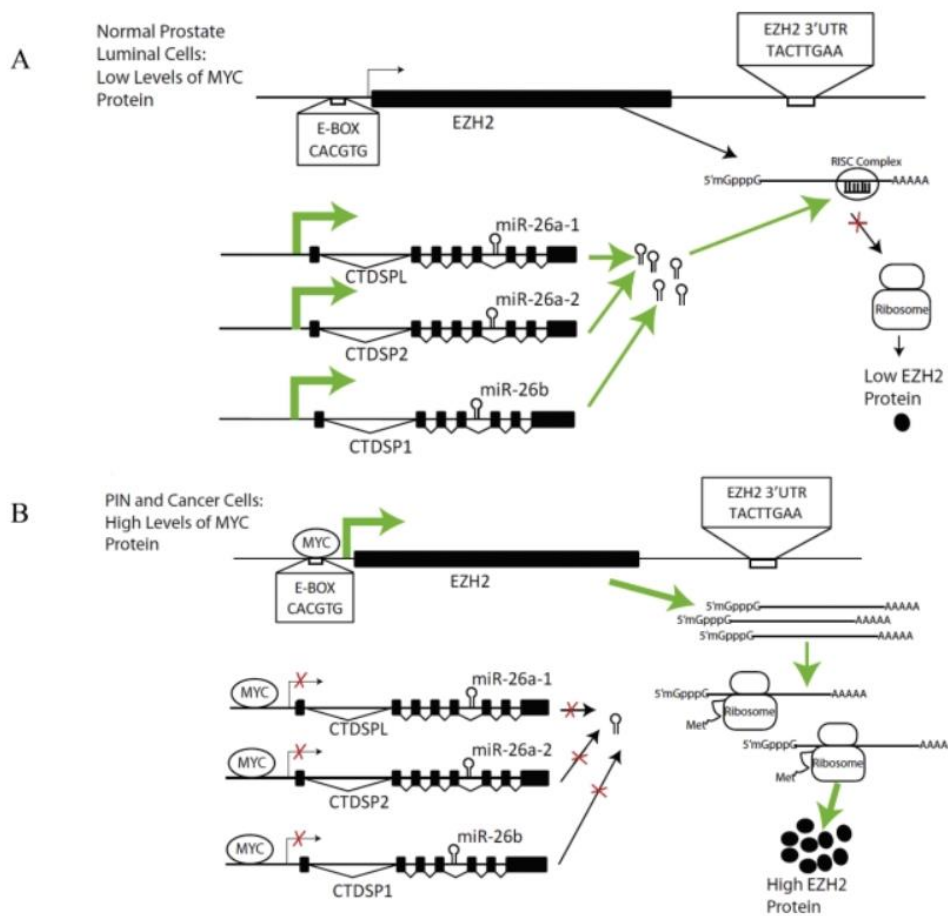


Figure 22 : Modèle de régulation d'EZH2 par Myc par deux mécanismes distincts dans le cancer de la prostate.

(A) Dans les cellules luminales normales de la prostate, l'expression de la protéine Myc est faible. La transcription d'*EZH2* induite par Myc se produit à un faible niveau, ce qui entraîne des niveaux d'expression basaux d'*EZH2*. Comme MYC réprime la transcription de *CTDSPL*, *CTDSP2* et *CTDSP1*, lorsque les niveaux de MYC sont faibles, ces gènes, qui hébergent *miR-26a* et *miR-26b*, sont activement transcrits. MiR-26a et miR-26b sont incorporés dans le complexe RNA-induced silencing complex (RISC) et se lient spécifiquement à leur site complémentaire sur le 3' UTR d'*EZH2*, déstabilisant l'ARNm d'*EZH2* et réprimant sa traduction. Ainsi, *EZH2* est maintenu à un faible niveau par des mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. (B) Dans le cancer de la prostate, des niveaux élevés de Myc entraînent la surexpression d'*EZH2*. MYC se lie à la région promotrice d'*EZH2* et active sa transcription. Simultanément, MYC réprime *CTDSPL*, *CTDSP2* et *CTDSP1*, dans lesquels sont intégrés *miR-26a* et *miR-26b*. Ainsi, le silencing post-transcriptionnel de l'ARNm d'*EZH2* médié par les miRNA est réduit. Il en résulte une expression élevée de la protéine *EZH2* [169].

- Les liens d'EZH2 avec le récepteur aux androgènes

Les androgènes et le RA jouent un rôle important dans le développement normal de la prostate et dans la progression du cancer de la prostate mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore bien connus. Pour l'instant, il a déjà été démontré que les androgènes régulent négativement EZH2 dans des cellules résistantes à la castration [171]. Il a également été mis en évidence qu'EZH2 coopère avec le RA dans la répression des gènes et peut réguler négativement les gènes cibles du RA dans un environnement faible en androgènes [172]. Cette coopération a d'ailleurs été dévoilée pour le gène *NOV* qui lorsqu'il est réprimé contribue à la progression du cancer de la prostate [133], ainsi que le cluster *miR-99a/let7c/125b-2*. L'inhibition du cluster contribue à l'augmentation de l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, toujours dans un modèle de cancer de la prostate [153]. EZH2 est aussi capable d'induire la transcription du gène RA par occupation de son promoteur [98] ou peut se positionner en tant que co-activateur du RA [92].

Pour conclure sur cette méthyltransférase, EZH2 est régulée au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-translationnel. La dérégulation de ces mécanismes conduit à une expression et une fonction aberrante d'EZH2 (**Figure 23**). Cette méthyltransférase hautement dérégulée dans le cancer de la prostate module l'activité de nombreux acteurs dans des voies de signalisation impliquées dans la tumorigénèse, faisant d'EZH2 une enzyme très intéressante à étudier.

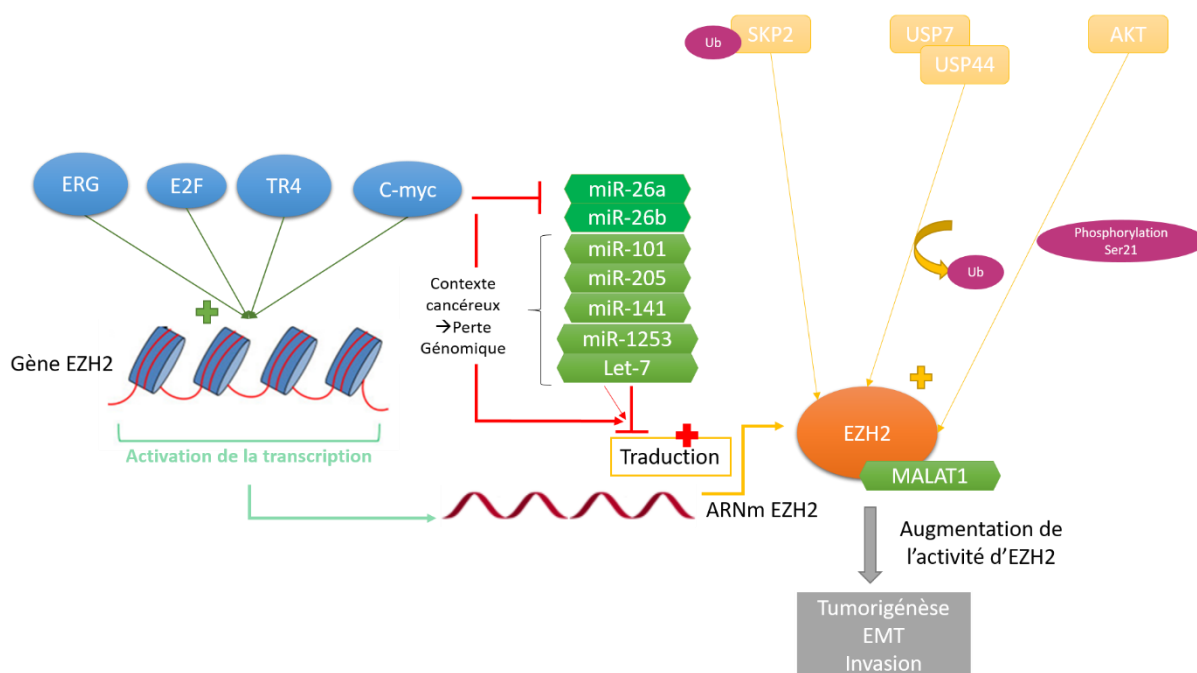


Figure 23 : Les différents niveaux de la régulation positive d’EZH2 dans le cancer de la prostate.

EZH2 est régulée au niveau transcriptionnel par l’action de facteurs de transcription tels qu’ERG, E2F, TR4 et c-myc. Ils agissent sur le promoteur d’*EZH2* afin d’induire sa transcription. Au niveau post-transcriptionnel, le contexte cancéreux entraîne la perte génomique des ncARNs (miR-101, miR-205, miR-141, miR-1253 et Let7) qui contribuent normalement à réguler négativement EZH2. Cette perte génomique conduit à une augmentation de la traduction de l’ARNm d’EZH2. C-myc, en plus d’activer génomiquement *EZH2*, est capable d’inhiber l’activité de miR-26a et miR-26b. Au niveau post-traductionnel, EZH2 est protégée de l’ubiquitination par SKP2, déubiquitinée par USP7 et USP44 et une phosphorylation activatrice sur sa sérine 21 peut être exercée par AKT. Le ncARN MALAT1 interagit avec EZH2 pour faciliter son occupation et son activité méthyltransférase sur le promoteur des gènes cibles.

i. La déméthylase JMJD3

Présentation de la publication 1



International Journal of
Molecular Sciences

Review

The Functions of the Demethylase JMJD3 in Cancer


Sanchez, A.; Houfaf Khoufah, F.Z.; Idrissou, M.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D, *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 968.

Cette revue aborde les différents rôles de JMJD3 dans la cancérogénèse. Une première partie reprend les rôles de la déméthylase JMJD3 qui ont été décrits pour le développement embryonnaire, l'ostéogénèse, l'hématopoïèse, l'immunité, l'inflammation, la neurogenèse ainsi que ses rôles indépendants de son activité de déméthylase. Puis une seconde partie reprend les données collectées sur l'implication de JMJD3 dans l'initiation et la progression du cancer. Les résultats ont été classés par types de cancer : Système nerveux, prostate, sanguin, colorectal, sein, poumon, foie et cancers gastriques. Finalement, un paragraphe décrit les différentes épidrogues de JMJD3 connues à ce jour, qui pourraient éventuellement être utilisées en thérapie.



Review

The Functions of the Demethylase JMJD3 in Cancer

Anna Sanchez ^{1,2} , Fatma Zohra Houfah Khoufah ^{1,2}, Mouhamed Idrissou ^{1,2}, Frédérique Penault-Llorca ^{2,3}, Yves-Jean Bignon ^{1,2}, Laurent Guy ^{2,4} and Dominique Bernard-Gallon ^{1,2,*}

- ¹ Department of Oncogenetics, Centre Jean Perrin, CBRV, 63001 Clermont-Ferrand, France; anna.sanchez@etu.uca.fr (A.S.); houfah.fz@gmail.com (F.Z.H.K.); mouhamed.idrissou@etu.uca.fr (M.I.); Yves-Jean.BIGNON@clermont.unicancer.fr (Y.-J.B.)
- ² INSERM U 1240 Molecular Imagery and Theranostic Strategies (IMoST), 63005 Clermont-Ferrand, France; Frederique.PENAULT-LLORCA@clermont.unicancer.fr (F.P.-L.); lguy@chu-clermontferrand.fr (L.G.)
- ³ Department of Biopathology, Centre Jean Perrin, 63011 Clermont-Ferrand, France
- ⁴ Department of Urology, Gabriel Montpied Hospital, 63000 Clermont-Ferrand, France
- * Correspondence: dominique.gallon-bernard@clermont.unicancer.fr

Abstract: Cancer is a major cause of death worldwide. Epigenetic changes in response to external (diet, sports activities, etc.) and internal events are increasingly implicated in tumor initiation and progression. In this review, we focused on post-translational changes in histones and, more particularly, the tri methylation of lysine from histone 3 (H3K27me3) mark, a repressive epigenetic mark often under- or overexpressed in a wide range of cancers. Two actors regulate H3K27 methylation: Jumonji Domain-Containing Protein 3 demethylase (JMJD3) and Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) methyltransferase. A number of studies have highlighted the deregulation of these actors, which is why this scientific review will focus on the role of JMJD3 and, consequently, H3K27me3 in cancer development. Data on JMJD3's involvement in cancer are classified by cancer type: nervous system, prostate, blood, colorectal, breast, lung, liver, ovarian, and gastric cancers.



Citation: Sanchez, A.; Houfah Khoufah, F.Z.; Idrissou, M.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. The Functions of the Demethylase JMJD3 in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 968. <https://doi.org/10.3390/ijms22020968>

Academic Editor: Maria M. Sasiadek
Received: 19 November 2020
Accepted: 15 January 2021
Published: 19 January 2021

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



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: JMJD3; cancers; H3K27me3; epi-drugs

1. Introduction

At present, cancer is a major cause of death worldwide. There were 18.1 million new cases and 9.6 million deaths caused by cancer in 2018. About one in five men and one in six women will develop the disease during their lifetime [1].

The reasons behind the development of cancer are many and varied. Cancer can be sporadically caused by a spontaneous mutation in the DNA sequence, and the risk factors cannot be determined with certainty. There are a number of other risk factors that can lead to the formation of cancer. We classify these factors into two groups: intrinsic factors, including age, hormonal status, and family history and extrinsic factors affecting the individual's environment and lifestyle, such as diet, physical activity frequency, and hormonal contraceptive use (National Cancer Institute, Bethesda in Maryland (MD), United States). Epigenetics are influenced by external or internal environmental factors, such as the specific characteristics of the cell, and play a major role in oncogenesis by modulating chromatin compaction and, consequently, the expression of some genes involved in tumor development [2].

Epigenetics can be defined as the modification of gene expression without modification of the DNA sequence. These epigenetic variations are reversible and transmissible to one's descendants. The epigenetic mechanisms involved are the action of non-coding RNAs (ncRNAs), such as small RNAs, micro RNAs (miRNAs), PIWI-interacting RNAs (piRNAs), endogenous short RNAs (endo-siRNAs), and long non-coding RNAs (lncRNAs) [3]. DNA methylation and the covalent post-translational modifications (PTMs) of histones, among which acetylation and methylation are the most studied. Epigenetic

modifications contribute to changes in chromatin compaction and are widely studied in cancerology [4–6].

Epigenetic mechanisms are controlled by the action of actors capable of reading, erasing, or writing epigenetic modifications [7,8]. This review focuses on the involvement of the jumonji domain-containing protein 3 demethylase (JMJD3)—whose role is to demethylate the di- and tri-methylation of lysine 27 from histone 3 (H3K27me3), a repressive epigenetic mark—in various cancers [9,10].

2. Results

2.1. Post-Translational Modification of Histones

PTMs of histones are known to lead to changes in the structure of chromatin [11]. Chromatin is composed of a repetition of nucleosomes, which contain ~147 pb of DNA wrapped around an octamer of histones (2H2A, 2H2B, 2H3, and 2H4), wherein H1 has the role of locking the nucleosomal structure. Chromatin is composed of DNA, small histone basic proteins, and non-histone proteins involved in replication and transcription. The nucleosome is the primary level of DNA condensation and the fundamental unit of chromatin's structure [7,12].

Histones are basic proteins that are highly conserved during evolution and have three α helices—a structure called a “histone fold”. These α helices are connected to each other by loops called L1 and L2 [13]. These basic proteins have a C-terminal tail, located in the center of the histone octamer, and an N-terminal tail that is often enriched with lysine (K) and arginine (R), which can undergo PTMs. PTMs of the N-terminal histone tails allow for the regulation of gene expression by modifying chromatin compaction and access to DNA by transcription factors [11].

PTMs are varied and include acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, ADP ribosylation, and many others. These PTMs are controlled by different actors, such as histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), which, respectively, place or remove an acetyl from the tails of histones. Histone methyltransferases (HMTs) and histone demethylases (HDMs) add or remove one or more methyl groups [11].

The hypoacetylation and hypermethylation of histone tails are often associated with chromatin closure and low transcriptional activity, while histone tail hyperacetylation and hypomethylation are usually associated with chromatin opening and the high transcription of genes [12]. The acetyl group neutralizes the positive charge of lysine and causes a lower interaction with the negative charge of DNA phosphates. This results in relaxation of the chromatin [13].

The constant “cross-talk” between the different epigenetic marks positioned in the genome at a given time leads to real complexity in the understanding of epigenetic modifications. This, in turn, has a different impact on the gene expression, integrity, and stability of the genome [7,14].

2.2. JMJD3 Demethylase

Demethylase JMJD3, also known as lysine-specific demethylase 6B (KDM6B) belongs to the JmjC-containing protein family, members of which are highly conserved during evolution [15], with activity dependent on α -ketoglutarate and oxygen and requiring Fe(II) as a cofactor [9,16]. The JMJD3 gene is located on chromosome 17p13.1 [17] and has 88% homology with the gene encoding the ubiquitously repeat transcribed tetratricopeptide repeat on the X chromosome (UTX) [18]. UTX is also capable of removing the di-trimethylation of H3K27 [9,16,18,19].

H3K27me3 is known to be a repressive epigenetic mark deposited thanks to the SET catalytic domain of Zeste Homolog 1 methyltransferase activator (EZH1) and Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) when combined with the Polycomb repressive complex 2 (PCR2). It is notably found in facultative heterochromatin [10] and is read by the Polycomb repressive complex 1 (PCR1) which ubiquitinates a histone H2A lysine that allows the

recruitment of factors leading to chromatin compaction and consequently a repression of gene expression [20]. The demethylating activity of JMJD3 at H3K27me_{2/3} makes it a transcription activating protein [21].

JMJD3 demethylase has been widely reported in embryonic development processes. JMJD3 allows the activation of WNT3 via the demethylation of H3K27me₃ at the beginning of endoderm differentiation and activation of Dickkopf-related protein 1 (DKK1) at the end of endoderm differentiation [22]. The inactivation of JMJD3 in mice causes respiratory failure, leading to perinatal lethality. JMJD3's activity is essential for maintenance of the pre-Böttinger complex because the demethylase controls some key regulatory genes of the complex (Reln, March4, Kirrel3, and Esrrg) [23].

Several studies linked the involvement of JMJD3 in osteogenesis, which indirectly activates the HOX and BMP genes, thereby promoting osteogenic differentiation [24]. In addition, JMJD3 plays a regulatory role in HOX expression during axial structuring in mice [25]. The transcription factor promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) is essential for the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs). During the pre-osteoblast differentiation stage, the recruitment of JMJD3 during gene coding for PLZF, coupled to H3K27ac's enrichment of the locus, contributes to PLZF overexpression [26]. JMJD3 is also a key regulator of the cartilage maturation process during enchondral ossification by promoting the expression of Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), an essential transcription factor for chondrocyte maturation and by enhancing osteoblast differentiation and, therefore, skeletal ossification [27,28].

JMJD3 appears to have a significant role in hematopoiesis, in association with vitamin C, and demethylase appears to be essential in hematopoietic stem cell production in zebrafish and humans. [29]. Also in a zebrafish model, JMJD3 was shown to be important in early myelopoiesis regulation by promoting the expression of Spi1, an essential transcription factor for myelopoiesis in vertebrates [30].

A few studies shed light on the correlation between JMJD3 and immunity: H3K27me₃ demethylation by JMJD3 or UTX allows the expression of specific genes responsible for the terminal differentiation of immune T cells. For example, one of these genes, Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 (*S1PR1*) codes for a sphingosine receptor, which is essential to the release of differentiated cells from the thymus and Kruppel Like Factor 2 (*KLF22*) coding for a transcription factor involved in the late maturation of T cells [31].

In 2007, de Santa et al. demonstrated a link between inflammation and epigenome reprogramming. A strong induction of JMJD3 was observed in mouse macrophages after stimulation by lipopolysaccharides (LPSs), acting during inflammation [32]. In 2012, the same observation was made after the catalytic activity of JMJD3 was inhibited by GSK-J1. JMJD3 induction was directly regulated by the NF-κB transcription factor, an essential factor in gene inflammation induction [33]. More recently, JMJD3 activity inhibition by its chemical inhibitor ethyl 3-((6-(4,5-dihydro-1H-benzo[d]azepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate (GSK-J4) showed a decline in Natural Killer (NK) activities, immune cells that have a pro-inflammatory effect. H3K27 demethylation induced by JMJD3 is important for NK cell function [34].

Neuronally, JMJD3 is involved in the survival of differentiated neurons from the hippocampus and is also important in regulating the maturation of granular cerebellar neurons in mice. This makes the transcription of genes such as *Tiam1* and *Grin2c* able to regulate the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), an important regulator of brain development [35].

JMJD3 demethylase also has a role independent of demethylation. Data show that JMJD3 acts in chromatin remodeling independently of its demethylase activity through interaction with transcription factors such as T-bet, T-box, and the SWI/SNF remodeling complex [36,37]. In addition, JMJD3 has been shown to have a role in cellular reprogramming. JMJD3 inhibits the cell reprogramming mediated by transcription factor Oct4 by targeting PHF20 independently of its demethylase activity. PHF20 is then ubiquitinated via an E3 ligase and is directed to the proteasome to be degraded [38].

2.3. JMJD3 and Cancer

A number of studies have highlighted the link between JMJD3 and tumor progression. However, its role in oncology is still unclear—is there a balance between oncogenic or tumor suppressor activity in JMJD3?

2.3.1. Nervous System Cancer

Glioblastoma

The brain is the organ for which JMJD3 has been the most studied. Among different cancers that affect the brain, glioma or glioblastoma are those for which we have collected the most data.

Glioblastoma is the most common and aggressive carcinoma of the central nervous system. In children with pediatric brainstem glioma, a common mutation in the *H3F3A* gene that codes for a variant of the histone H3.3 has been observed. This mutation leads to PCR2 sequestration and a decrease in H3K27me₃, as well as more significant disease progression. Methylation maintenance by inhibiting JMJD3 has been shown to be a therapeutic strategy for glioma treatment [39,40]. JMJD3 is overexpressed in glioma tissue relative to healthy tissue. The inhibition of demethylase activity, and hence the maintenance of transcriptional gene repression, resulted in decreased cell proliferation and migration, as well as increased apoptosis [41]. These results were later confirmed after JMJD3 inhibition by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Interference (CRISPRi), which still resulted in a decrease in glioma cell proliferation, migration, and invasion, making JMJD3 an oncogene involved in the epithelial–mesenchymal transition (EMT). JMJD3 is also able to increase EMT marker expression, such as the expression of snail homolog 1 (*SNAIL1*) [42], whose overexpression leads to an increase of *N*-cadherins and fibronectin proteins by regulating the C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) at the transcriptional and translational levels [43].

By contrast, some studies highlighted JMJD3 as a tumor suppressor gene in glioblastoma. Most of these genes, including the p53 transcription factor, are known to have a role in senescence and DNA repair, inhibit angiogenesis, and thus, act as a tumor suppressor actor [44]. JMJD3's methylation state has been demonstrated to be essential for its function [45]. A study showed that JMJD3 is able to regulate p53 independently of chromatin modification but directly via interaction with p53. This leads to glioblastoma stem cell (GSC) differentiation, which suppresses GSC proliferation [46]. Interestingly, JMJD3 is a direct target of Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). STAT3 binds to the JMJD3 promoter, resulting in the promoter's repression. The overexpression of JMJD3, after STAT3 inhibition, indicates a decrease in neurosphere formation, cell proliferation, and, therefore, tumorigenicity. JMJD3 regulation by STAT3 was found in tumor samples from different patients [47]. These results together with those of Ene et al. show the importance of JMJD3's role in GSCs differentiation and GSC proliferation [46,47]. Receptor tyrosine kinase (RTK) overexpression, such as that due to platelet-derived growth factor receptor A (PDGFR α), plays an important role in the regulation of cell growth and survival. PDGFR α is amplified to 5–10% in glioblastoma [48]. By targeting PDGFR α with an aptamer of its ligand, the PDR3 has been shown to decrease STAT3 expression and increase JMJD3 expression. Aptamer treatment also resulted in an increase in P53 in response to increased JMJD3 expression [49]. This result places JMJD3 in a central position between STAT3 and p53 in limiting tumor progression.

Medulloblastoma

Among brain cancers, medulloblastoma (MB) is a cancer that mostly develops in children (9.2% of brain tumors) between 0 and 14 years of age, with a peak of incidence during the first decade [50]. JMJD3's role is controversial in this type of pathology. It was first demonstrated in 2014 in vitro and in vivo on mice that JMJD3 acts in favor of carcinogenesis by modulating bivalent chromatin domain expression. These domains contain the repressive mark H3K27me₃ and the active mark H3K4me₃. Gene expression in these regions remains inactive but awaits activation. In association with Shh signaling,

JMJD3 demethylates H3, activating Shh target genes, such as *GliA*. These genes play a predominant role in the proliferation of cerebellum granule neuron precursors (CGNPs) in the early postnatal period. Moreover, the Shh MB subtype features low H3K27me3 accumulation, suggesting that JMJD3 is more active in tumors compared to normal cerebellar tissues and that JMJD3 demethylase activity inhibition by shRNA in Shh MB subtypes leads to a decrease in CGNP proliferation and thus a decrease in growth MB [51].

Conversely, analyses were performed on tumor and healthy human samples in 2017. It was demonstrated via immunohistochemistry that the expression of topoisomerase II β (topoII β), a protein essential for DNA repair, was inversely correlated with the repressive mark H3K27me3 in MB tumors with low topoII β expression. JMJD3 expression was higher in normal tissues than in MB tissues, making JMJD3 a protein involved in topoII β expression maintenance and helping to limit tumor progression [52].

Neuroblastoma

Neuroblastoma are cancers that develop from the neural crests responsible for the sympathetic nervous system and adrenal gland formation and account for 8–10% of all tumors in children. *MYCN* gene amplification is highly relevant to the loss of differentiation potential and the poor prognosis associated with this disease [53]. JMJD3 inhibition in neuroblastoma has been shown to be favorable to carcinogenesis reduction by modulating the expression of key genes involved in the formation of neuroblastoma and notably by reducing *MYCN* proto-oncogene expression and overexpressing the p53 and the p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) factors involved in apoptosis. GSK-J4 inhibitor treatment has been shown to be effective in combination with retinoic acids, leading to a more effective reduction in cell viability, as well as the induction of cell differentiation and reticulo-endoplasmic stress, which leads to cell death [54].

2.3.2. Prostate Cancer

Presently, 1,276,106 men worldwide have been diagnosed with prostate cancer (PC), and 358,989 deaths are estimated. After lung and colorectal cancer, prostate cancer is the third most common cancer among men [1].

Increasingly more studies are highlighting the implications of epigenetic alterations in prostate tumor progression. Several studies highlighted EZH2 overexpression in PC [55,56]. EZH2 methyltransferase inhibition results in decreased proliferation, suggesting that decreased H3 methylation has a protective effect on the cancer development. Therefore, JMJD3's involvement as an H3 demethylase appears to be essential to limit tumor progression [55]. On the other hand, it seems surprising that EZH2 and JMJD3 are concomitantly overexpressed during PC development [55,57]. A study by Xiang and colleagues discussed this phenomenon: PC is a heterogeneous cancer [9] with different degrees of aggressiveness (Gleason score (GS)). The two proteins EZH2 and JMJD3 may act differently depending on the type of PC. Moreover, several studies have revealed this phenomenon, according to which there is a differential overexpression of EZH2 and JMJD3 depending on the aggressiveness of the disease [56,58,59]. A global genome-wide analysis of H3K27me3 was performed on prostate biopsies representing three clinical groups (healthy, $GS \leq 7$, and $GS > 7$), and a strong representation of H3K27me3 was found in tumor tissue compared to healthy tissue, with a positive correlation according to the GS [60]. Another study showed the impact of H3K27me3 on the regulation of the Retinoic acid receptor $\beta 2$ (*RAR $\beta 2$*), estrogen receptor (*Era*), progesterone receptor (*PGR*), and Repulsive Guidance Molecule A (*RGMA*) genes and also correlated H3K27me3 with the level of tumor aggressivity [57]. These genes are involved in PC development. The coverage of these previous genes by JMJD3 and EZH2 is greater in PC cell lines than in healthy cells with larger JMJD3 coverage at the these gene promoters [56].

PC is a hormone-dependent cancer and is particularly androgen-dependent. Thus, understanding the link between androgen receptor (AR) and PC development is essential to better treat this disease. Like many genes, AR expression is modulated by epigenetic

mechanisms. AR is overexpressed in PC, as well as in 30% of castration-resistant PC (CRPC) compared to untreated PC [61]. A number of studies have suggested a possible link between JMJD3, H3K27me₃, and the AR metabolic pathway [56,57,61–64]. JMJD3's transcriptional level is increased in LNCaP AR+ tumor cell lines compared to PC-3 AR– tumor cell lines [56]. This comment also applies to JMJD3's enrichment on four candidate genes (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*), transformer 2 alpha homolog (*TRA2A*), 2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 (*U2AF1*), and ribosomal protein S6 kinase A2 (*RPS6KA2*)), identified as signature genes in PC [59]. After GSK-J4 inhibitory treatment of JMJD3, AR– tumor cells did not show an increase in JMJD3 on the promotor of candidate genes, while AR+ tumor cells did show an increase [62]. This observation was echoed at the transcriptional level on the same genes after inhibitor treatment [56]. The relevance of androgens in PC and epigenetics was reported by Sun et al.: The repressive cluster miR99a/let7c/125-b that contributes to a decrease in cell growth is regulated by androgens and by the couple, EZH2/JMJD3. JMJD3 expression induces an increase in miRNA cluster expression giving it a tumor suppressor role [65].

While Varambally et al.'s work showed that EZH2 inhibition resulted in reduced cell proliferation [55], a study conducted on AR-WT and AR-ΔLBD tumor cells (CRPC cell lines) showed that JMJD3 inhibition by GSK-J4 also resulted in reducing PC cell proliferation [61]. This confirms the complexity of the epigenetic mechanisms and the need to balance understanding of JMJD3/EZH2 in PC.

One study proposed a model in which JMJD3 would have an oncogenic effect. JMJD3's inhibition by Triptolide, extracted from a medicinal herb, would have an anti-tumor effect on PC tumor cells. This compound would induce an increase in H3K27me₃ after JMJD3 inhibition and an increase in H3K9me₃ by positively regulating the SUV39H1-HP1α complex, which is involved in heterochromatin formation. The increase in these two repressive marks would result in gene transcription suppression, as well as an increase in senescence [66].

2.3.3. Blood Cancer

There are a wide variety of blood disorders, including T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), acute myeloid leukemia (AML), Hodgkin's lymphoma (HL), and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), also known as Non-Hodgkin's lymphoma. These various disorders are caused by the deregulation of a number of signaling pathways in which JMJD3, in some cases, also appears to be involved.

T-ALL

This pathology affects both children and adults and is due to a deregulation of thymocyte T growth and maturation, wherein Notch receptor 1 (NOTCH1) is overexpressed in 60% of cases. NOTCH1 is implicated in the oncogenic pathways. In 2014, JMJD3 was identified as a central player in oncogene activation mediated by NOTCH1. JMJD3 was found to be overexpressed and colocalized with NOTCH1 in T-ALL cells. Ubiquitin-specific peptidase 7 (USP7) stabilizes the complex NOTCH1/JMJD3 through deubiquitination. The NOTCH1 oncogenic targets are controlled by this mechanism in controlling the demethylation of target genes through JMJD3 activity. It was demonstrated that concomitant USP7 and JMJD3 inhibition lead to a reduction of tumor growth in vivo. [67]. JMJD3 was found at the promotor site of NOTCH1 targets that have oncogenic functions: *HES1*, *HEY1*, *NRARP* [68], *c-myc*, and Notch receptor 3 (*NOTCH3*) [69]. This allows T-ALL cell initiation and maintenance by controlling the methylation of oncogenic targets [68]. These studies suggest that JMJD3 is an interesting therapeutic target to reduce T-ALL progression. Other researchers have examined JMJD3's functions in hematopoietic stem cells (HSCs) that are not related to chromatin modification. As in T-ALL cells, JMJD3 is overexpressed in HSCs, and JMJD3 loss upregulates the transcription factor AP-1 and increases the downstream expression of *Jun* and *Fos*, resulting in the inability of HSCs to self-renew after stress. In a T-ALL model transduced with a retrovirus expressing the NOTCH1 intra-cellular domain,

the authors showed that JMJD3 loss did not produce greater survival, unlike the AML model. The initiation and maintenance of T-ALL and AML by JMJD3 would depend on the cell subtype and developmental context. JMJD3 could be an interesting target if its inhibition does not affect normal HSCs but only those implicated in leukemia [70].

AML

On the other hand, JMJD3, when induced by all-trans retinoid acid (ATRA) signaling, is also known to have an oncorepressive role as it acts on targets such as C/EBP β and RIPK3 (a key suppressor of AML malignancy) that allow the myeloid differentiation, cell cycle arrest, and cell death of AML cells [71]. In the context of differentiation therapy, JMJD3 has also been shown to allow malignant cells to differentiate into treatable differentiated cells. In AML, Aurora kinase (AURK) A represses JMJD3 expression, thus favoring leukemogenesis and justifying the predominant role of JMJD3 in the repression of AML progression [72].

In contrast, other studies demonstrated the oncogenic role of JMJD3 in AML development [73–75]. JMJD3 overexpression in AML cells is associated with a poor prognosis, and JMJD3 inhibition facilitates an increase in H3K27 methylation associated with a decrease in proliferation and *HOX* expression in vitro, as well as a decrease in disease progression in vivo. [75]. Illiano et al. demonstrated a link between the cAMP response element-binding protein (CREB), which plays a critical role in leukemogenesis, and JMJD3 by using GSK-J4 treatment on AML cell lines. The use of GSK-J4 permits the downregulation of CREB. The latter protein is phosphorylated on Ser-133 by a protein kinase A (PKA) before being directed to the proteasome [73]. Moreover, it seems that the association of GSK-J4 with a natural cAMP raising compound (forskolin) potentiates the anti-proliferative effects of GSK-J4 via PKA in some AML cells (U937 cells), leading to B-cell lymphoma 2 protein (BCL2) downregulation and caspase 3 activation [74].

Lymphoma

Whether in HL [76] or DLBCL [77,78], JMJD3 is over-expressed in germinal center B (GC-B) cells. JMJD3 is modulated by viruses such as the Epstein–Barr virus (EBV), which is involved in the development of GC-B and the development of HL. EBV and the latent oncoprotein membrane protein-1 (LMP1), modified in 50% of HLs by EBV, induce strong regulation of JMJD3 in primary B cells. The NOTCH homolog 2 N-terminal-like (NOTCH2NL) and CD58 genes have been identified as JMJD3 targets in GC-B and are overexpressed in HL cells. After JMJD3 inhibition by interfering RNA, a reduction of H3K27me3 is observed on target genes, which provides sufficient evidence that JMJD3 is involved in the development of HL via LMP1 in GC-B [76].

In DLBCL, JMJD3 overexpression in GC-B is associated with a poor prognosis. Demethylation, moreover, plays a role in disease development. JMJD3 affects the B-cell receptor (BCR) and the downstream B-cell lymphoma 6 protein (BCL6). These proteins are involved in B-cell survival, and the use of the JMJD3 inhibitor significantly sensitizes B cells to chemotherapy treatments compared to the use of treatments alone [77]. In both subtypes of DLBCL, which are the ABC or GCB subtypes, overexpressed JMJD3 acts on the regulatory factor 4 interferon (IRF4), which plays a role in hematopoietic cell differentiation. On the other hand, two distinct mechanisms have been put forward depending on DLBCL type: The ABC subtype seems to use a pathway linking JMJD3–IRF4–NF- κ B to induce cell survival, while for the GCB subtype, survival is mediated by the Bcl-2 survival gene, which is sensitive to JMJD3 demethylase activity [78]. There also appears to exist a connection between JMJD3 demethylase and cyclin-dependent kinase 9 (CDK9), which is abnormally expressed in DLBCL cells. CDK9 inhibitors utilization affects JMJD3 and H3K27 methylation leading to a weakening of the expression of anti-apoptotic myeloid cell leukemia 1 (MCL1) and X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) proteins [79].

However, in anaplastic large cell lymphomas (ALCLs), an oncogenic mutation, such as in the N-terminal portion of nucleophosmin and in the intracellular domain of anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK), in cells may lead to a weak expression of the p16INK4a/Rb

tumor suppressive pathway. This pathway activates oncogene-induced senescence (OIS), which limits tumor development. JMJD3 is found to be a partial contributor to the activation of p16INK4a/Rb in an NPM-ALK context and could be a novel agent to contribute to the upregulation of the p16INK4a/Rb pathway [80].

2.3.4. Colorectal Cancer

Colorectal cancer (CRC) is the second most deadly cancer in the world [1], but relatively few investigations address the contribution of JMJD3 to the development of CRC.

Once again, JMJD3 presents itself as a double actor. It is under expressed in CRC on clinical samples [81] and acts as a tumor suppressor when activated by the active metabolite of vitamin D: 1,25(OH)₂D₃. Although the mechanism remains unclear, JMJD3's presence limits the expression of key participants implied in EMT (*SNAIL1*, Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (*ZEB1*)) and facilitates chromatin access to the genes involved in cell adhesion and the 1,25(OH)₂D₃ target genes (*CYP24A*, *CDHA1/E-cadherin*, and *CST5/cystatin D*), all of which have a role in restraining tumor progression [82,83]. In Tokugunaga et al., the loss of the JMJD3 was considered a marker of poor prognosis in CRC and promoted cell proliferation, suppression of apoptosis, and reduction in the expression of the p15INK4b tumor suppressor [81]. JMJD3 also regulates tumor immunity in CRC by enabling the transcription of the Th-1 type chemokine (*CXCL9* and *CXCL10*), and treating the primary cells of CRC with GSK-J4 leads to a reduction in the chemokine level. These chemokines have been shown to be positively correlated with CRC patients' survival [84].

On the other hand, JMJD3 plays a role in the histone promotor demethylation of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) gene playing a role in the proliferative process in some of cancers and which is overexpressed in CRCs [85]. In addition, the aberrant activation of NOTCH1 in CRC, specifically serrated neoplasia pathway, leads to an increase in Ephrin type-B receptor 4 (EPHB4), which promotes tumor growth and cell migration. It turns out that the intracellular NOTCH domain accompanies JMJD3 from the cytosolic compartment to the nuclear one to modify EPHB4 chromatin architecture in CRC [86]. These latest data position JMJD3 as a CRC oncoprotein.

2.3.5. Breast Cancer

Breast cancer (BC) is the leading cause of death in women worldwide [1]. There are different subtypes of this cancer depending on the expression of a number of receptors [87]. On the other hand, hormone-dependent BCs may become resistant to hormonotherapy, hence the interest in finding new therapeutic strategies. Among those strategies, epigenetics is increasingly revealing itself as an interesting area of research in the discovery of new targets for anti-cancer treatments.

Svetelis et al. showed that after stimulation of Er α by estrogens, JMJD3 is co-recruited at the Er α binding regions on the promotor of the B-cell lymphoma 2 (*BCL2*) anti-apoptotic gene to induce its expression. The link between the modification of *BCL2*'s chromatin architecture and its constitutive activation in estrogen-resistant cancer cells has been demonstrated, identifying JMJD3 and methyltransferase EZH2 as interesting therapeutic targets. Indeed, estrogen-resistant cancer cells overexpress HER2, which results in the constitutive activation of *BCL2* by inactivating EZH2 through the AKT pathway. In this case, the involvement of JMJD3 is no longer needed, which highlights the existence of non-genomic pathways in the regulation of the *BCL2* gene by EZH2, whereas JMJD3 is able to positively regulate *BCL2* expression in a genomic way in non-resistant breast cancer cell lines [88]. JMJD3 could be targeted in non-resistant cancer cells, and EZH2 in both non-resistant cancer cells and estrogen-resistant cancer cells, to limit *BCL2* activation.

It is clear that JMJD3 has a role on cancer stem cell (CSC) pluripotency. In BC, JMJD3 has an inhibitory effect on Oct4 (stemness marker) via the degradation of PHF20 in triple-negative and luminal BC cell models [89]. In both luminal and triple-negative models, JMJD3 acts in disfavor of stemness characteristics. The same finding was reported by Zhao et al. on fibroblasts [38]. However, a further study highlighted the favorable effect

of inhibiting JMJD3 in limiting tumor progression in vitro and in vivo with a decrease in cell proliferation and pluripotency markers (Nanog, Sox2, and Oct4) and in tumor size and weight after GSK-J4 treatment [90]. In addition, as previously seen in CRC [82,83], Xun et al. confirmed that JMJD3 is activated by vitamin D analogues such as paricalcitol (vitamin D receptor agonist), also resulting in decreased stem-cell-like properties [89]. Controversially, JMJD3 is involved in promoting the mesenchymal characteristics induced by TGF- β and activating *SNAI1* in BC [91]. An additional study showed that the microenvironment plays a role in the activity of JMJD3 and, particularly, hypoxia within tumors through a reduction in the activity of demethylase and, consequently, a greater presence of the H3K27me3 marker at the epigenome [92]. While Wei et al. demonstrated that a loss of H3K27 trimethylation is associated with a poor predictor in BC [93], another team highlighted the link between hypoxia, JMJD3, and the development of stem cell capacity by regulating the methylation state of DICER. The lack of oxygen leads to a reduction of JMJD3 oxygen-dependent demethylase activity that reduces DICER expression because of its over-methylated state. DICER controls miRNA production and DICER repression, leading to a repression of the miR-200 family that activates EMT [92,94]. In this context, JMJD3 activity seems to be important to counter the development of stem cell capacity and EMT, thus reducing metastasis.

2.3.6. Lung Cancer

JMJD3's function in lung cancer is controversial. In the cell model of adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549 cell line), JMJD3 contributes to the proliferation of A549 by affecting the cell cycle (decreasing p21 mRNA production), but has no effect on cell migration [95]. Conversely, a recent study showed its effects on EMT activation and its favorable influence on cell migration in a non-small cell lung cancer (NSCLC) model [96]. The same study also demonstrated an elevation in the expression of JMJD3 in the tumor tissue and showed a positive correlation with cancer progression to lymph node metastasis. These results are consistent with those found in primary sarcomatoid carcinoma of the lung, which is a type of pulmonary sarcomatoid carcinoma where JMJD3 is inversely correlated with patient survival [97]. This is of interest as a study performed on human serum samples from blood (healthy or NSCLC-affected) showed a decrease in the JMJD3 mRNA expression of serum NSCLC positively correlated with disease severity (N1 and N2 metastasis nodes) [98]. This differential expression of JMJD3 between serum and tumor tissue could potentially establish JMJD3 as a diagnostic tool and biomarker for NSCLC.

2.3.7. Other Types of Cancer

The table below summarizes and describes how JMJD3 is regulated in previously described cancers and liver, ovarian, and gastric cancer and what the consequences are in terms of its role in favor of, or against, tumor progression (Table 1).

Table 1. Jumoni domain-containing protein 3 demethylase regulation in liver, ovarian, and gastric cancers ^a.

Types of Cancer	Up/Down Regulation	How?	Oncogene/ Tumor Suppressor	References
Liver	Upregulated	+ EMT + Migration + Invasion via slug demethylation	Oncogene	[99]
	Downregulated by miR-941 in hepato carcinoma cell lines	- EMT - Invasion - Migration - Proliferation	Tumor Suppressor	[100]

Table 1. Cont.

Types of Cancer	Up/Down Regulation	How?	Oncogene/ Tumor Suppressor	References
Ovarian	-	+ Cell death + Self-renewal + Tumor initiation + EMT + Migration + Invasion + Proliferation + Metastatic Capacities via TGF-β1 expression	Oncogene	[101]
	Upregulated		Oncogene	[102]
	Upregulated in drug resistant ovarian cancer cells, positively correlated with HER2 expression	+ HER2 expression	Oncogene	[103]
Gastric	Upregulated	- Survival + Proliferation	Oncogene	[104]
	-	+ p15/p16 when associated with Long noncoding RNAs (ARHGAP27P1)	Tumor suppressor	[105]
Glioblastoma	Upregulated	+ Tumor growth + Proliferation - Apoptosis + Migration + Invasion + EMT (SNAIL and fibronectin and N-cadherins by regulating CXCL12) + P53 - Neurosphere formation - Proliferation	Oncogene Tumor suppressor	[39–43] [46,47,49]
	Upregulated	+ Proliferation (+ shh signaling) + DNA repair (+ topolIβ)	Oncogene Tumor suppressor	[51] [52]
Neuroblastoma	-	+ Differentiation (- MYCN) + Apoptosis (p53, PUMA) + Cell death (+ reticulo-endoplasmic stress)	Tumor suppressor	[53,54]
Prostate cancer	Upregulated (Differential expression according to AR status and aggressiveness)	+ Proliferation + Senescence - Proliferation + DNA repair (+ MGMT)	Oncogene Tumor suppressor	[61,66] [55,57,59,62,65]
T-ALL	Upregulated	+ NOTCH1 target genes + Tumor growth + AP-1	Oncogene	[67–70]
AML	-	+ Differentiation + Cell cycle arrest + Cell death (+ C/EBPβ and RIPK3) + Proliferation	Tumor suppressor	[71,72]
	Upregulated	+ Disease progression + HOX cAMP/PKA	Oncogene	[73–75]
HV	Upregulated	JMJD3 activated by LMP1 + NOTCH2NL	Oncogene	[76]
DLBCL	Upregulated	+ Survival (BCR, BCL6, IRF4-NF-kB, BCL2)- Apoptosis (XIAP, MCL1)	Oncogene	[77–79]
ALCL	-	+ p16INK4a/Rb pathway + Proliferation (+ EpCam) + Tumor growth + Migration	Tumor suppressor	[80]
	-	(NOTCH1/JMJD3 → +)	Oncogene	[85,86]

Table 1. Cont.

Types of Cancer	Up/Down Regulation	How?	Oncogene/ Tumor Suppressor	References
Colorectal cancer	Downregulated	JMJD3 activated by Vitamin D active metabolite – EMT (– <i>SNAI1</i> , – <i>ZEB1</i> , + cell adhesion genes) – Proliferation + Apoptosis + P15INK4B + Survival (+ <i>CXCL9</i> , <i>CXCL10</i>)	Tumor suppressor	[81–84]
Breast cancer	-	– Survival (+ <i>BCL2</i>) + Proliferation + Pluripotency (Nanog, Sox, Oct4) + Tumor growth + EMT (JMJD3 activated by TGFβ → + <i>SNAI1</i>)	Oncogene	[88,90,91,93]
	-	– Pluripotency (– Oct4) – Stem-like properties – EMT (+ <i>DICER</i> → – miR-200)	Tumor suppressor	[89,92,94]
Lung cancer	Upregulated	+ Cell cycle (– p21) + EMT (Migration) + Metastasis – Survival	Oncogene	[95–98]

^a EMT: Epithelial-mesenchymal transition; CXCL12: C-X-C motif chemokine 12; topoiIβ: Topoisomerase iiβ; SNAI1: Snail homolog 1; ZEB1: Zinc finger E-box-binding homeobox 1; Topoisomerase iiβ; MGMT: O-methylguanine-DNA methyltransferase; NOTCH1: Notch receptor 1; CREB: cAMP response element-binding protein; PKA: Protein kinase A; LMP1: Latent membrane protein-1; NOTCH2NL: Notch homolog 2 N-terminal-like; BCR: B-cell receptor; BCL6: B-cell lymphoma 6 protein; IRF4: Regulatory factor 4 interferon; BCL2: B-cell lymphoma 2 protein; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis; PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis; MCL1: Myeloid cell leukemia 1; EpCam: Epithelial cell adhesion molecule; JMJD3: Jumonji Domain-Containing Protein 3 demethylase.

2.4. Epi-Drugs of JMJD3

As previously highlighted in this review, epi-drugs are increasingly evolving towards new therapeutic strategies against cancer to regulate cancer progression. In the table below (Table 2.), we listed a few molecules likely to target JMJD3 in cancer and other pathologies.

GSK-J4 is the most studied molecule related to JMJD3 targeting and is an ester derivative of the GSK-J1 molecule. GSK-J4 is able to penetrate cells more easily and is hydrolyzed to GSK-J1, which binds to the active site of JMJD3 competitively with α-ketoglutarate [33].

A team recently developed pan-histone demethylase inhibitors based on the chemical characteristics of tranlycypromine (a known inhibitor of Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) belonging to the superfamily of the flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent amine oxidases), with the scaffolds 2,2'-bipyridine or 5-carboxy-8HQ, two competitive groupings of α-ketoglutarate. However, these compounds cannot be described as specific for JMJD3 since they simultaneously inhibit LSD1 and enzymes with a jumonji catalytic domain [110]. In addition, seven compounds derived from quinoline-5,8-dicarboxylic acid have been shown to exert strong inhibition on JMJD3 by binding to its active JMJD3 site [111]. Very recently, Giordano et al. also demonstrated the inhibitory effect of a molecule derived from 2-Benzoxazol-2-yl-phenol. One of these compounds (compound 8), moreover, showed cell cycle arrest on melanoma cancer cells [112]. Further, flavonol analogs (myricetin) were modeled, and eight of them appeared to have a strong affinity for the active site of JMJD3 compared to the binding of GSK-J1. On the other hand, these molecules have not been tested in vitro or in vivo [113]. Finally, Zhang et al. identified two new inhibitors (salvianic acid A and puerarin 6''-O-xyloside) using a capillary electrophoresis technique [114]. However, further studies at the cellular level should be done to validate the inhibitory effect of these molecules on JMJD3 (Table 2).

Table 2. Mechanisms of jumonji Domain-Containing Protein 3 demethylase (JMJD3) epi-drugs.

Epi-Drugs	Mechanisms	References
GSK-J4	Hydrolyzed to GSK-J1 Competitive fixation	[33,34,39,54,67–69,74,75,90,101,104,106–109]
Par-histone demethylase inhibitor	Covalent binding of tranlycypromine fragments and reversible binding of jumonji domain demethylase inhibitor scaffolds. Competitive fixation	[110]
Quinoline-5,8-dicarboxylic Acid Derivative	Fragmentary approach to quinoline-5,8 dicarboxylic acid Competitive fixation	[111]
2-Benzoxazol-2-yl-phenol Scaffold (Compound 8)	Fragmentary approach to 2-Benzoxazol-2-yl-phenol Competitive fixation	[112]
Flavonol analogues (myricetin)	Competitive fixation	[113]
Salvianic acid A and puerarin 6'-O-xyloside	Identified by capillary electrophoresis	[114]

To conclude, there is no doubt that JMJD3 is involved in carcinogenesis. We note that demethylase frequently acts on deregulated pathways in cancers (EMT, cell cycle, and P53). On the other hand, it is difficult to categorize JMJD3 as a tumor suppressor or oncoprotein. We highlighted in this scientific review the heterogeneous tissue-dependent demethylase activity of JMJD3. Within the same organ, the aggressiveness of the disease seems to influence the role of JMJD3. It is well known that epigenetic modifications are complex and that there is permanent context-dependent crosstalk between different epigenetic marks. It would be interesting to better understand this epigenetic dialogue in cancers to identify more precisely the role of JMJD3 in cancers. In addition, molecules (Table 2) capable of modifying JMJD3 activity have been developed. Unfortunately, apart from GSK-J4 and GSK-J1, these molecules are still rarely or never used experimentally, but they could become future epidrugs for clinical trials, treatments, and therapies for cancer patients.

Author Contributions: Conceptualization, A.S., F.Z.H.K., M.I., and D.B.-G.; validation, D.B.-G., L.G., Y.-J.B., and F.P.-L.; resources were collected by A.S.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, A.S., F.Z.H.K., M.I., and D.B.-G.; supervision, D.B.-G., L.G., Y.-J.B., and F.P.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: This work was supported by the French Ligue Régionale Contre Le Cancer—Comité du Puy-de-Dôme—and the ARTP (Association pour la Recherche sur les tumeurs de la Prostate).

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

Abbreviations

AML	Acute myeloid leukaemia
AR	Androgen receptor
ATRA	All-trans retinoid acid
AURK	Aurora kinase
BC	Breast cancer
BCL2	B-cell lymphoma 2 protein
BCL6	B-cell lymphoma 6 protein
BCR	B-cell receptor
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CDK9	Cyclin-dependent kinase 9
CREB	cAMP response element-binding protein
CRC	Colorectal cancer

CRISPRi	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference
CRPC	Castration-resistant prostate cancer
CSCs	Cancer stem cells
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
DDK1	Dickkopf-related protein 1
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
EBV	Epstein-Barr virus
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EPHB4	Ephrin type-B receptor 4 (EPHB4)
Er α	Estrogen receptor
EZH1	Enhancer of zeste homolog 1
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FAD	Flavin adenine dinucleotide
GC-B	Germinal center B
GSCs	Glioblastoma stem cells
GSK-J4	Ethyl3-((6-(4:5-dihydro-1H-benzo[d]azepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate
endo-siRNAs	Endogenous short rnas
H3K27me3	Tri methylation of lysine from histone 3
HATs	Histone acetyltransferases
HDMs	Histone demethylases
HDACs	Histone deacetylases
hMSCs	Histone methyltransferases
HL	Hodgkin's lymphoma
HTMs	Human mesenchymal stem cells
HSCs	Hematopoietic stem cells
IRF4	Regulatory factor 4 interferon
JMJD3	Jumonji Domain-Containing Protein 3 demethylase
KDM6B	Lysine-specific demethylase 6B
KLF2	Kruppel Like Factor 2
lnRNAs	Long non-coding rnas
LPS	Lipopolysaccharides
LMP1	Latent membrane protein-1
LSD1	Lysine-specific demethylase 1
MB	Medulloblastoma
MCL1	Myeloid cell leukemia 1
miRNA	micro rnas
MGMT	O—methylguanine-DNA methyltransferase
ncRNAs	Non-coding rnas
NOTCH1	Notch receptor 1
NOTCH2NL	Notch homolog 2 N-terminal-like
NOTCH3	Notch receptor 3
NK	Natural killer
NPM-ALK	Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase
NSCLC	Non-small cell lung cancer epithelial-mesenchymal transition
OIS	Oncogene-induced senescence
PC	Prostate cancer
PCR1	Polycomb repressive complex 1
PCR2	Polycomb repressive complex 2
PGR	Progesterone receptor
PDGFR α	Platelet-derived growth factor receptor A
piRNAs	PIWI-interacting rnas
PTMs	Post-translational modifications
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PKA	Protein kinase A

PZLF	Promyelocytic leukaemia zinc finger
RAR β 2	Retinoic acid receptor β 2
RGMA	Repulsive guidance molecule A
RPS6KA2	Ribosomal protein S6 kinase A2
RTK	Receptor tyrosine kinase
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
S1PR1	Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1
SNAIL1	Snail homolog 1
STAT3	Activator of transcription 3
T-ALL	T-cell acute lymphoblastic leukaemia
TopoII β	Topoisomerase β
TRA2A	Transformer 2 alpha homolog
U2AF1	2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
USP7	Ubiquitin-specific peptidase 7
UTX	Ubiquitously repeat transcribed tetratricopeptide repeat on the X chromosome
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1

References

- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aguilera, O.; Fernández, A.F.; Muñoz, A.; Fraga, M.F. Epigenetics and Environment: A Complex Relationship. *J. Appl. Physiol.* **2010**, *109*, 243–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Peschansky, V.J.; Wahlestedt, C. Non-Coding RNAs as Direct and Indirect Modulators of Epigenetic Regulation. *Epigenetics* **2014**, *9*, 3–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ballestar, E.; Esteller, M. Epigenetic Gene Regulation in Cancer. *Adv. Genet.* **2008**, *61*, 247–267. [[CrossRef](#)]
- Brait, M.; Sidransky, D. Cancer Epigenetics: Above and Beyond. *Toxicol. Mech. Methods* **2011**, *21*, 275–288. [[CrossRef](#)]
- Taby, R.; Issa, J.-P.J. Cancer Epigenetics. *CA Cancer J. Clin.* **2010**, *60*, 376–392. [[CrossRef](#)]
- Audia, J.E.; Campbell, R.M. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **2016**, *8*. [[CrossRef](#)]
- Hyun, K.; Jeon, J.; Park, K.; Kim, J. Writing, Erasing and Reading Histone Lysine Methylations. *Exp. Mol. Med.* **2017**, *49*, e324. [[CrossRef](#)]
- Xiang, Y.; Zhu, Z.; Han, G.; Lin, H.; Xu, L.; Chen, C.D. JMJD3 Is a Histone H3K27 Demethylase. *Cell Res.* **2007**, *17*, 850–857. [[CrossRef](#)]
- Wiles, E.T.; Selker, E.U. H3K27 Methylation: A Promiscuous Repressive Chromatin Mark. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2017**, *43*, 31–37. [[CrossRef](#)]
- Bannister, A.J.; Kouzarides, T. Regulation of Chromatin by Histone Modifications. *Cell Res.* **2011**, *21*, 381–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kanwal, R.; Gupta, S. Epigenetic Modifications in Cancer. *Clin. Genet* **2012**, *81*, 303–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Luger, K.; Mäder, A.W.; Richmond, R.K.; Sargent, D.F.; Richmond, T.J. Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution. *Nature* **1997**, *389*, 251–260. [[CrossRef](#)]
- Fischle, W.; Wang, Y.; Allis, C.D. Histone and Chromatin Cross-Talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 172–183. [[CrossRef](#)]
- Klose, R.J.; Kallin, E.M.; Zhang, Y. JmjC-Domain-Containing Proteins and Histone Demethylation. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 715–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Meng, Y.; Li, H.; Liu, C.; Zheng, L.; Shen, B. Jumonji Domain-Containing Protein Family: The Functions beyond Lysine Demethylation. *J. Mol. Cell Biol.* **2018**, *10*, 371–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cloos, P.A.C.; Christensen, J.; Agger, K.; Helin, K. Erasing the Methyl Mark: Histone Demethylases at the Center of Cellular Differentiation and Disease. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 1115–1140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Walport, L.J.; Hopkinson, R.J.; Vollmar, M.; Madden, S.K.; Gileadi, C.; Oppermann, U.; Schofield, C.J.; Johansson, C. Human UTY(KDM6C) Is a Male-Specific Nε-Methyl Lysyl Demethylase. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 18302–18313. [[CrossRef](#)]
- Hong, S.; Cho, Y.-W.; Yu, L.-R.; Yu, H.; Veenstra, T.D.; Ge, K. Identification of JmjC Domain-Containing UTX and JMJD3 as Histone H3 Lysine 27 Demethylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 18439–18444. [[CrossRef](#)]
- Farquharson, K.L. A Novel Class of Histone Readers. *Plant Cell* **2018**, *30*, 262–263. [[CrossRef](#)]
- Mozzetta, C.; Boyarchuk, E.; Pontis, J.; Ait-Si-Ali, S. Sound of Silence: The Properties and Functions of Repressive Lys Methyltransferases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 499–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jiang, W.; Wang, J.; Zhang, Y. Histone H3K27me3 Demethylases KDM6A and KDM6B Modulate Definitive Endoderm Differentiation from Human ESCs by Regulating WNT Signaling Pathway. *Cell Res.* **2013**, *23*, 122–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Burgold, T.; Voituron, N.; Caganova, M.; Tripathi, P.P.; Menuet, C.; Tusi, B.K.; Spreafico, F.; Bévangut, M.; Gestreau, C.; Buontempo, S.; et al. The H3K27 Demethylase JMJD3 Is Required for Maintenance of the Embryonic Respiratory Neuronal Network, Neonatal Breathing, and Survival. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 1244–1258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Ye, L.; Fan, Z.; Yu, B.; Chang, J.; Al Hezaimi, K.; Zhou, X.; Park, N.-H.; Wang, C.-Y. Histone Demethylases KDM4B and KDM6B Promotes Osteogenic Differentiation of Human MSCs. *Cell Stem. Cell* **2012**, *11*, 50–61. [[CrossRef](#)]
25. Naruse, C.; Shibata, S.; Tamura, M.; Kawaguchi, T.; Abe, K.; Sugihara, K.; Kato, T.; Nishiuchi, T.; Wakana, S.; Ikawa, M.; et al. New Insights into the Role of Jmjd3 and Utx in Axial Skeletal Formation in Mice. *FASEB J.* **2017**, *31*, 2252–2266. [[CrossRef](#)]
26. Agrawal Singh, S.; Lerdrup, M.; Gomes, A.-L.R.; van de Werken, H.J.; Vilstrup Johansen, J.; Andersson, R.; Sandelin, A.; Helin, K.; Hansen, K. PLZF Targets Developmental Enhancers for Activation during Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Elife* **2019**, *8*. [[CrossRef](#)]
27. Zhang, F.; Xu, L.; Xu, L.; Xu, Q.; Karsenty, G.; Chen, C.D. Histone Demethylase JMJD3 Is Required for Osteoblast Differentiation in Mice. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13418. [[CrossRef](#)]
28. Zhang, F.; Xu, L.; Xu, L.; Xu, Q.; Li, D.; Yang, Y.; Karsenty, G.; Chen, C.D. JMJD3 Promotes Chondrocyte Proliferation and Hypertrophy during Endochondral Bone Formation in Mice. *J. Mol. Cell Biol.* **2015**, *7*, 23–34. [[CrossRef](#)]
29. Zhang, T.; Huang, K.; Zhu, Y.; Wang, T.; Shan, Y.; Long, B.; Li, Y.; Chen, Q.; Wang, P.; Zhao, S.; et al. Vitamin C-Dependent Lysine Demethylase 6 (KDM6)-Mediated Demethylation Promotes a Chromatin State That Supports the Endothelial-to-Hematopoietic Transition. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 13657–13670. [[CrossRef](#)]
30. Yu, S.-H.; Zhu, K.-Y.; Zhang, F.; Wang, J.; Yuan, H.; Chen, Y.; Jin, Y.; Dong, M.; Wang, L.; Jia, X.-E.; et al. The Histone Demethylase Jmjd3 Regulates Zebrafish Myeloid Development by Promoting Spi1 Expression. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2018**, *1861*, 106–116. [[CrossRef](#)]
31. Manna, S.; Kim, J.K.; Baugé, C.; Cam, M.; Zhao, Y.; Shetty, J.; Vacchio, M.S.; Castro, E.; Tran, B.; Tessarollo, L.; et al. Histone H3 Lysine 27 Demethylases Jmjd3 and Utx Are Required for T-Cell Differentiation. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. De Santa, F.; Totaro, M.G.; Prosperini, E.; Notarbartolo, S.; Testa, G.; Natoli, G. The Histone H3 Lysine-27 Demethylase Jmjd3 Links Inflammation to Inhibition of Polycomb-Mediated Gene Silencing. *Cell* **2007**, *130*, 1083–1094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kruidenier, L.; Chung, C.; Cheng, Z.; Liddle, J.; Che, K.; Joberty, G.; Bantscheff, M.; Bountra, C.; Bridges, A.; Diallo, H.; et al. A Selective Jumonji H3K27 Demethylase Inhibitor Modulates the Proinflammatory Macrophage Response. *Nature* **2012**, *488*, 404–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cribbs, A.; Hookway, E.S.; Wells, G.; Lindow, M.; Obad, S.; Oerum, H.; Prinjha, R.K.; Athanasou, N.; Sowman, A.; Philpott, M.; et al. Inhibition of Histone H3K27 Demethylases Selectively Modulates Inflammatory Phenotypes of Natural Killer Cells. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 2422–2437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wijayatunge, R.; Liu, F.; Shpargel, K.B.; Wayne, N.J.; Chan, U.; Boua, J.-V.; Magnuson, T.; West, A.E. The Histone Demethylase Kdm6b Regulates a Mature Gene Expression Program in Differentiating Cerebellar Granule Neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **2018**, *87*, 4–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Miller, S.A.; Mohn, S.E.; Weinmann, A.S. Jmjd3 and UTX Play a Demethylase-Independent Role in Chromatin Remodeling to Regulate T-Box Family Member-Dependent Gene Expression. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 594–605. [[CrossRef](#)]
37. Miller, S.A.; Weinmann, A.S. Molecular Mechanisms by Which T-Bet Regulates T-Helper Cell Commitment. *Immunol. Rev.* **2010**, *238*, 233–246. [[CrossRef](#)]
38. Zhao, W.; Li, Q.; Ayers, S.; Gu, Y.; Shi, Z.; Zhu, Q.; Chen, Y.; Wang, H.Y.; Wang, R.-F. Jmjd3 Inhibits Reprogramming by Upregulating Expression of INK4a/Arf and Targeting PHF20 for Ubiquitination. *Cell* **2013**, *152*, 1037–1050. [[CrossRef](#)]
39. Hashizume, R.; Andor, N.; Ihara, Y.; Lerner, R.; Gan, H.; Chen, X.; Fang, D.; Huang, X.; Tom, M.W.; Ngo, V.; et al. Pharmacologic Inhibition of Histone Demethylation as a Therapy for Pediatric Brainstem Glioma. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1394–1396. [[CrossRef](#)]
40. Ramaswamy, V.; Remke, M.; Taylor, M.D. An Epigenetic Therapy for Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1378–1379. [[CrossRef](#)]
41. Sui, A.; Xu, Y.; Li, Y.; Hu, Q.; Wang, Z.; Zhang, H.; Yang, J.; Guo, X.; Zhao, W. The Pharmacological Role of Histone Demethylase JMJD3 Inhibitor GSK-J4 on Glioma Cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 68591–68598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sui, A.; Xu, Y.; Yang, J.; Pan, B.; Wu, J.; Guo, T.; Shen, Y.; Guo, X. The Histone H3 Lys 27 Demethylase KDM6B Promotes Migration and Invasion of Glioma Cells Partly by Regulating the Expression of SNAI1. *Neurochem. Int.* **2019**, *124*, 123–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zou, S.; Zhang, D.; Xu, Z.; Wen, X.; Zhang, Y. JMJD3 Promotes the Epithelial-Mesenchymal Transition and Migration of Glioma Cells via the CXCL12/CXCR4 Axis. *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 5930–5940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ryan, K.M.; Phillips, A.C.; Vousden, K.H. Regulation and Function of the P53 Tumor Suppressor Protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 332–337. [[CrossRef](#)]
45. Huang, J.; Sengupta, R.; Espejo, A.B.; Lee, M.G.; Dorsey, J.A.; Richter, M.; Opravil, S.; Shiekhhattar, R.; Bedford, M.T.; Jenuwein, T.; et al. P53 Is Regulated by the Lysine Demethylase LSD1. *Nature* **2007**, *449*, 105–108. [[CrossRef](#)]
46. Ene, C.I.; Edwards, L.; Riddick, G.; Baysan, M.; Woolard, K.; Kotliarova, S.; Lai, C.; Belova, G.; Cam, M.; Walling, J.; et al. Histone Demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a Tumor Suppressor by Regulating P53 Protein Nuclear Stabilization. *PLoS ONE* **2012**, *7*. [[CrossRef](#)]
47. Sherry-Lynes, M.M.; Sengupta, S.; Kulkarni, S.; Cochran, B.H. Regulation of the JMJD3 (KDM6B) Histone Demethylase in Glioblastoma Stem Cells by STAT3. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0174775. [[CrossRef](#)]
48. Regad, T. Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers* **2015**, *7*, 1758–1784. [[CrossRef](#)]
49. Yoon, S.; Wu, X.; Armstrong, B.; Habib, N.; Rossi, J.J. An RNA Aptamer Targeting the Receptor Tyrosine Kinase PDGFR α Induces Anti-Tumor Effects through STAT3 and P53 in Glioblastoma. *Mol. Ther. Nucleic. Acids* **2019**, *14*, 131–141. [[CrossRef](#)]

50. Millard, N.E.; De Braganca, K.C. Medulloblastoma. *J. Child. Neurol.* **2016**, *31*, 1341–1353. [\[CrossRef\]](#)
51. Shi, X.; Zhang, Z.; Zhan, X.; Cao, M.; Satoh, T.; Akira, S.; Shpargel, K.; Magnuson, T.; Li, Q.; Wang, R.; et al. An Epigenetic Switch Induced by Shh Signalling Regulates Gene Activation during Development and Medulloblastoma Growth. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5425. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Chen, J.; Zhao, J.; Zhou, X.; Liu, S.; Yan, Y.; Wang, Y.; Cao, C.; Han, S.; Zhou, N.; Xu, Y.; et al. Immunohistochemical Investigation of TopoII β , H3K27me3 and JMJD3 Expressions in Medulloblastoma. *Pathol. Res. Pract.* **2017**, *213*, 975–981. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Kaczówka, P.; Wieczorek, A.; Czogała, M.; Książek, T.; Szewczyk, K.; Balwierz, W. The Role of N-Myc Gene Amplification in Neuroblastoma Childhood Tumour—Single-Centre Experience. *Contemp. Oncol.* **2018**, *22*, 223–228. [\[CrossRef\]](#)
54. Lochmann, T.L.; Powell, K.M.; Ham, J.; Floros, K.V.; Heisey, D.A.R.; Kurupi, R.I.J.; Calbert, M.L.; Ghotra, M.S.; Greninger, P.; Dozmorov, M.; et al. Targeted Inhibition of Histone H3K27 Demethylation Is Effective in High-Risk Neuroblastoma. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*. [\[CrossRef\]](#)
55. Varambally, S.; Dhanasekaran, S.M.; Zhou, M.; Barrette, T.R.; Kumar-Sinha, C.; Sanda, M.G.; Ghosh, D.; Pienta, K.J.; Sewalt, R.G.A.B.; Otte, A.P.; et al. The Polycomb Group Protein EZH2 Is Involved in Progression of Prostate Cancer. *Nature* **2002**, *419*, 624–629. [\[CrossRef\]](#)
56. Daures, M.; Ngollo, M.; Judes, G.; Rifai, K.; Kemeny, J.-L.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. The JMJD3 Histone Demethylase and the EZH2 Histone Methyltransferase in Prostate Cancer. *OMICS* **2016**, *20*, 123–125. [\[CrossRef\]](#)
57. Ngollo, M.; Lebert, A.; Dagdemir, A.; Judes, G.; Karsli-Cepcioglu, S.; Daures, M.; Kemeny, J.-L.; Penault-Llorca, F.; Boiteux, J.-P.; Bignon, Y.-J.; et al. The Association between Histone 3 Lysine 27 Trimethylation (H3K27me3) and Prostate Cancer: Relationship with Clinicopathological Parameters. *BMC Cancer* **2014**, *14*. [\[CrossRef\]](#)
58. Ngollo, M.; Lebert, A.; Daures, M.; Judes, G.; Rifai, K.; Dubois, L.; Kemeny, J.-L.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; et al. Global Analysis of H3K27me3 as an Epigenetic Marker in Prostate Cancer Progression. *BMC Cancer* **2017**, *17*. [\[CrossRef\]](#)
59. Daures, M.; Idrissou, M.; Judes, G.; Rifai, K.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. A New Metabolic Gene Signature in Prostate Cancer Regulated by JMJD3 and EZH2. *Oncotarget* **2018**, *9*, 23413–23425. [\[CrossRef\]](#)
60. Ngollo, M.; Lebert, A.; Daures, M.; Penault-Llorca, F.; Bernard-Gallon, D.; Guy, L. Étude de la marque H3K27me3 à l'échelle du génome: Mise en place d'un profil épigénétique en fonction de l'agressivité du cancer de la prostate. *Prog. Urol.* **2015**, *25*, 757. [\[CrossRef\]](#)
61. Morozov, V.M.; Li, Y.; Clowers, M.M.; Ishov, A.M. Inhibitor of H3K27 Demethylase JMJD3/UTX GSK-J4 Is a Potential Therapeutic Option for Castration Resistant Prostate Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 62131–62142. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Sanchez, A.; El Ouardi, D.; Zohra Houfah Khoufah, F.; Mouhamed, I.; Boisnier, T.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. JMJD3 Demethylase and Its Inhibitor GSK-J4 in the Regulation of MGMT, TRA2A, RPS6KA2 and U2AF1 Genes in Prostate Cancer Cell Lines. *OMICS A J. Integr. Biol.* **2020**, *24*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. El Ouardi, D.; Idrissou, M.; Sanchez, A.; Penault-Llorca, F.; Guy, L.; Bignon, Y.-J.; Bernard-Gallon, D. The Inhibition of the Histone Methyltransferase EZH2 by DZNEP or siRNA Demonstrates Its Involvement in MGMT, TRA2A, RPS6KA2, and U2AF1 Gene Regulation in Prostate Cancer. *OMICS A J. Integr. Biol.* **2020**, *24*, 116–118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Idrissou, M.; Daures, M.; Jemia, A.B.; Judes, G.; Rifai, K.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. EZH2 Histone Methyltransferase and JMJD3 Histone Demethylase Implications in Prostate Cancer. *OMICS* **2017**, *21*, 751–753. [\[CrossRef\]](#)
65. Sun, D.; Layer, R.; Mueller, A.C.; Cichewicz, M.A.; Negishi, M.; Paschal, B.M.; Dutta, A. Regulation of Several Androgen-Induced Genes through the Repression of the MiR-99a/Let-7c/MiR-125b-2 miRNA Cluster in Prostate Cancer Cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 1448–1457. [\[CrossRef\]](#)
66. Tamgue, O.; Lei, M. Triptolide Promotes Senescence of Prostate Cancer Cells Through Histone Methylation and Heterochromatin Formation. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2017**, *18*, 2519–2526. [\[CrossRef\]](#)
67. Jin, Q.; Martinez, C.A.; Arcipowski, K.M.; Zhu, Y.; Gutierrez-Diaz, B.T.; Wang, K.K.; Johnson, M.R.; Volk, A.G.; Wang, F.; Wu, J.; et al. USP7 Cooperates with NOTCH1 to Drive the Oncogenic Transcriptional Program in T-Cell Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 222–239. [\[CrossRef\]](#)
68. Ntziachristos, P.; Tsirigos, A.; Welstead, G.G.; Trimarchi, T.; Bakogianni, S.; Xu, L.; Loizou, E.; Holmfeldt, L.; Strikoudis, A.; King, B.; et al. Contrasting Roles of Histone 3 Lysine 27 Demethylases in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Nature* **2014**, *514*, 513–517. [\[CrossRef\]](#)
69. Tottone, L.; Zhdanovskaya, N.; Carmona Pestaña, Á.; Zampieri, M.; Simeoni, F.; Lazzari, S.; Ruocco, V.; Pelullo, M.; Caiafa, P.; Felli, M.P.; et al. Histone Modifications Drive Aberrant Notch3 Expression/Activity and Growth in T-ALL. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 198. [\[CrossRef\]](#)
70. Mallaney, C.; Ostrand, E.L.; Celik, H.; Kramer, A.C.; Martens, A.; Kothari, A.; Koh, W.K.; Haussler, E.; Iwamori, N.; Gontarz, P.; et al. Kdm6b Regulates Context-Dependent Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Leukemogenesis. *Leukemia* **2019**, *33*, 2506–2521. [\[CrossRef\]](#)
71. Yu, S.-H.; Zhu, K.-Y.; Chen, J.; Liu, X.-Z.; Xu, P.-F.; Zhang, W.; Yan, L.; Guo, H.-Z.; Zhu, J. JMJD3 Facilitates C/EBP β -Centered Transcriptional Program to Exert Oncorepressor Activity in AML. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3369. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Park, J.W.; Cho, H.; Oh, H.; Kim, J.-Y.; Seo, S.-B. AURKA Suppresses Leukemic THP-1 Cell Differentiation through Inhibition of the KDM6B Pathway. *Mol. Cells* **2018**, *41*, 444–453. [\[CrossRef\]](#)

73. Illiano, M.; Conte, M.; Salzillo, A.; Ragone, A.; Spina, A.; Nebbioso, A.; Altucci, L.; Sapio, L.; Naviglio, S. The KDM Inhibitor GSKJ4 Triggers CREB Downregulation via a Protein Kinase A and Proteasome-Dependent Mechanism in Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Illiano, M.; Conte, M.; Sapio, L.; Nebbioso, A.; Spina, A.; Altucci, L.; Naviglio, S. Forskolin Sensitizes Human Acute Myeloid Leukemia Cells to H3K27me2/3 Demethylases GSKJ4 Inhibitor via Protein Kinase A. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Li, Y.; Zhang, M.; Sheng, M.; Zhang, P.; Chen, Z.; Xing, W.; Bai, J.; Cheng, T.; Yang, F.-C.; Zhou, Y. Therapeutic Potential of GSK-J4, a Histone Demethylase KDM6B/JMJD3 Inhibitor, for Acute Myeloid Leukemia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2018**, *144*, 1065–1077. [[CrossRef](#)]
76. Anderton, J.A.; Bose, S.; Vockerodt, M.; Vrzalikova, K.; Wei, W.; Kuo, M.; Helin, K.; Christensen, J.; Rowe, M.; Murray, P.G.; et al. The H3K27me3 Demethylase, KDM6B, Is Induced by Epstein-Barr Virus and over-Expressed in Hodgkin's Lymphoma. *Oncogene* **2011**, *30*, 2037–2043. [[CrossRef](#)]
77. Mathur, R.; Sehgal, L.; Havranek, O.; Köhrer, S.; Khashab, T.; Jain, N.; Burger, J.A.; Neelapu, S.S.; Davis, R.E.; Samaniego, F. Inhibition of Demethylase KDM6B Sensitizes Diffuse Large B-Cell Lymphoma to Chemotherapeutic Drugs. *Haematologica* **2017**, *102*, 373–380. [[CrossRef](#)]
78. Zhang, Y.; Shen, L.; Stupack, D.G.; Bai, N.; Xun, J.; Ren, G.; Han, J.; Li, L.; Luo, Y.; Xiang, R.; et al. JMJD3 Promotes Survival of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Subtypes via Distinct Mechanisms. *Oncotarget* **2016**, *7*, 29387–29399. [[CrossRef](#)]
79. Xie, S.; Wei, F.; Sun, Y.-M.; Gao, Y.-L.; Pan, L.-L.; Tan, M.-J.; Wang, S.-D.; Ding, J.; Chen, Y. EZH2 Inhibitors Abrogate Upregulation of Trimethylation of H3K27 by CDK9 Inhibitors and Potentiate Its Activity against Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Haematologica* **2020**, *105*, 1021–1031. [[CrossRef](#)]
80. Martinelli, P.; Bonetti, P.; Sironi, C.; Pruneri, G.; Fumagalli, C.; Raviolo, P.R.; Volorio, S.; Pileri, S.; Chiarle, R.; McDuff, F.K.E.; et al. The Lymphoma-Associated NPM-ALK Oncogene Elicits a P16INK4a/PRB-Dependent Tumor-Suppressive Pathway. *Blood* **2011**, *117*, 6617–6626. [[CrossRef](#)]
81. Tokunaga, R.; Sakamoto, Y.; Nakagawa, S.; Miyake, K.; Izumi, D.; Kosumi, K.; Taki, K.; Higashi, T.; Imamura, Y.; Ishimoto, T.; et al. The Prognostic Significance of Histone Lysine Demethylase JMJD3/KDM6B in Colorectal Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2016**, *23*, 678–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Pereira, F.; Barbáchano, A.; Silva, J.; Bonilla, F.; Campbell, M.J.; Muñoz, A.; Larriba, M.J. KDM6B/JMJD3 Histone Demethylase Is Induced by Vitamin D and Modulates Its Effects in Colon Cancer Cells. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 4655–4665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Pereira, F.; Barbáchano, A.; Singh, P.K.; Campbell, M.J.; Muñoz, A.; Larriba, M.J. Vitamin D Has Wide Regulatory Effects on Histone Demethylase Genes. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 1081–1089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Nagarsheth, N.; Peng, D.; Kryczek, I.; Wu, K.; Li, W.; Zhao, E.; Zhao, L.; Wei, S.; Frankel, T.; Vatan, L.; et al. PRC2 Epigenetically Silences Th1-Type Chemokines to Suppress Effector T-Cell Trafficking in Colon Cancer. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 275–282. [[CrossRef](#)]
85. Liao, M.-Y.; Kuo, M.Y.-P.; Lu, T.-Y.; Wang, Y.-P.; Wu, H.-C. Generation of an Anti-EpCAM Antibody and Epigenetic Regulation of EpCAM in Colorectal Cancer. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 1788–1800. [[CrossRef](#)]
86. Lian, H.; Jia, X.; Shi, N.; Xie, S.; Wang, J.; Wang, W.; Ma, F.; Liu, H.; Wang, A.; Cheng, X.; et al. Notch Signaling Promotes Serrated Neoplasia Pathway in Colorectal Cancer through Epigenetic Modification of EPHB2 and EPHB4. *Cancer Manag Res.* **2018**, *10*, 6129–6141. [[CrossRef](#)]
87. Falck, A.-K.; Fernö, M.; Bendahl, P.-O.; Rydén, L. St Gallen Molecular Subtypes in Primary Breast Cancer and Matched Lymph Node Metastases—Aspects on Distribution and Prognosis for Patients with Luminal A Tumours: Results from a Prospective Randomised Trial. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 558. [[CrossRef](#)]
88. Sotelis, A.; Bianco, S.; Madore, J.; Huppé, G.; Nordell-Markovits, A.; Mes-Masson, A.-M.; Gévry, N. H3K27 Demethylation by JMJD3 at a Poised Enhancer of Anti-Apoptotic Gene BCL2 Determines ER α Ligand Dependency. *EMBO J.* **2011**, *30*, 3947–3961. [[CrossRef](#)]
89. Xun, J.; Wang, D.; Shen, L.; Gong, J.; Gao, R.; Du, L.; Chang, A.; Song, X.; Xiang, R.; Tan, X. JMJD3 Suppresses Stem Cell-like Characteristics in Breast Cancer Cells by Downregulation of Oct4 Independently of Its Demethylase Activity. *Oncotarget* **2017**, *8*, 21918–21929. [[CrossRef](#)]
90. Yan, N.; Xu, L.; Wu, X.; Zhang, L.; Fei, X.; Cao, Y.; Zhang, F. GSKJ4, an H3K27me3 Demethylase Inhibitor, Effectively Suppresses the Breast Cancer Stem Cells. *Exp. Cell Res.* **2017**, *359*, 405–414. [[CrossRef](#)]
91. Ramadoss, S.; Chen, X.; Wang, C.-Y. Histone Demethylase KDM6B Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 44508–44517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Prickaerts, P.; Adriaens, M.E.; van den Beucken, T.; Koch, E.; Dubois, L.; Dahlmans, V.E.H.; Gits, C.; Evelo, C.T.A.; Chan-Seng-Yue, M.; Wouters, B.G.; et al. Hypoxia Increases Genome-Wide Bivalent Epigenetic Marking by Specific Gain of H3K27me3. *Epigenetics Chromatin* **2016**, *9*, 46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Wei, Y.; Xia, W.; Zhang, Z.; Liu, J.; Wang, H.; Adsay, N.V.; Albarracín, C.; Yu, D.; Abbruzzese, J.L.; Mills, G.B.; 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.* **2008**, *47*, 701–706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

94. van den Beucken, T.; Koch, E.; Chu, K.; Rupaimoole, R.; Prickaerts, P.; Adriaens, M.; Voncken, J.W.; Harris, A.L.; Buffa, F.M.; Haider, S.; et al. Hypoxia Promotes Stem Cell Phenotypes and Poor Prognosis through Epigenetic Regulation of DICER. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5203. [\[CrossRef\]](#)
95. Tian, C.; Deng, H.; Tang, X.; Hu, H.; Liu, X.; Luo, F. Effect of Jumonji domain-containing protein-3 on the proliferation and migration of lung cancer cell line. *J. Biomed. Eng.* **2012**, *29*, 514–518.
96. Zhang, Y.; Hua, P.-Y.; Jin, C.-Y.; Li, J.-D.; Zhang, G.-X.; Wang, B. JMJD3 Enhances Invasiveness and Migratory Capacity of Non-Small Cell Lung Cancer Cell via Activating EMT Signaling Pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 4784–4792. [\[CrossRef\]](#)
97. Li, S.; Jiang, L.; He, Q.; Wei, W.; Wang, Y.; Zhang, X.; Liu, J.; Chen, K.; Chen, J.; Xie, D. The Prognostic Significance of JMJD3 in Primary Sarcomatoid Carcinoma Of The Lung, A Rare Subtype Of Lung Cancer. *Onco Targets Ther.* **2019**, *12*, 9385–9393. [\[CrossRef\]](#)
98. Ge, T.; Zhou, Y.; Lu, H. The Diagnostic Performance of Lysine(K)-Specific Demethylase 6B (KDM6B) in Non-Small Cell Lung Cancer. *Artif. Cells Nanomed Biotechnol.* **2019**, *47*, 2155–2160. [\[CrossRef\]](#)
99. Tang, B.; Qi, G.; Tang, F.; Yuan, S.; Wang, Z.; Liang, X.; Li, B.; Yu, S.; Liu, J.; Huang, Q.; et al. Aberrant JMJD3 Expression Upregulates Slug to Promote Migration, Invasion, and Stem Cell-Like Behaviors in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 6520–6532. [\[CrossRef\]](#)
100. Zhang, P.-P.; Wang, X.-L.; Zhao, W.; Qi, B.; Yang, Q.; Wan, H.-Y.; Shuang, Z.-Y.; Liu, M.; Li, X.; Li, S.; et al. DNA Methylation-Mediated Repression of MiR-941 Enhances Lysine (K)-Specific Demethylase 6B Expression in Hepatoma Cells. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 24724–24735. [\[CrossRef\]](#)
101. Sakaki, H.; Okada, M.; Kuramoto, K.; Takeda, H.; Watarai, H.; Suzuki, S.; Seino, S.; Seino, M.; Ohta, T.; Nagase, S.; et al. GSKJ4, A Selective Jumonji H3K27 Demethylase Inhibitor, Effectively Targets Ovarian Cancer Stem Cells. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 6607–6614. [\[PubMed\]](#)
102. Liang, S.; Yao, Q.; Wei, D.; Liu, M.; Geng, F.; Wang, Q.; Wang, Y.-S. KDM6B Promotes Ovarian Cancer Cell Migration and Invasion by Induced Transforming Growth Factor-B1 Expression. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 493–506. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
103. Mo, J.; Wang, L.; Huang, X.; Lu, B.; Zou, C.; Wei, L.; Chu, J.; Eggers, P.K.; Chen, S.; Raston, C.L.; et al. Multifunctional Nanoparticles for Co-Delivery of Paclitaxel and Carboplatin against Ovarian Cancer by Inactivating the JMJD3-HER2 Axis. *Nanoscale* **2017**, *9*, 13142–13152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Xu, Z.; Xia, Y.; Xiao, Z.; Jia, Y.; Li, L.; Jin, Y.; Zhao, Q.; Wan, L.; Yi, T.; Yu, Y.; et al. Comprehensive Profiling of JMJD3 in Gastric Cancer and Its Influence on Patient Survival. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 868. [\[CrossRef\]](#)
105. Zhang, G.; Xu, Y.; Zou, C.; Tang, Y.; Lu, J.; Gong, Z.; Ma, G.; Zhang, W.; Jiang, P. Long Noncoding RNA ARHGAP27P1 Inhibits Gastric Cancer Cell Proliferation and Cell Cycle Progression through Epigenetically Regulating P15 and P16. *Aging* **2019**, *11*, 9090–9110. [\[CrossRef\]](#)
106. Lhuissier, E.; Aury-Landas, J.; Allas, L.; Boittin, M.; Boumediene, K.; Baugé, C. Antiproliferative Effect of the Histone Demethylase Inhibitor GSK-J4 in Chondrosarcomas. *IUBMB Life* **2019**, *71*, 1711–1719. [\[CrossRef\]](#)
107. Pediconi, N.; Salerno, D.; Lupacchini, L.; Angrisani, A.; Peruzzi, G.; De Smaele, E.; Levrero, M.; Belloni, L. EZH2, JMJD3, and UTX Epigenetically Regulate Hepatic Plasticity Inducing Retro-Differentiation and Proliferation of Liver Cells. *Cell Death Disease* **2019**, *10*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
108. Lulla, R.R.; Saratsis, A.M.; Hashizume, R. Mutations in Chromatin Machinery and Pediatric High-Grade Glioma. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1501354. [\[CrossRef\]](#)
109. Zhang, W.; Cheng, J.; Diao, P.; Wang, D.; Zhang, W.; Jiang, H.; Wang, Y. Therapeutically Targeting Head and Neck Squamous Cell Carcinoma through Synergistic Inhibition of LSD1 and JMJD3 by TCP and GSK-J1. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 528–538. [\[CrossRef\]](#)
110. Rotili, D.; Tomassi, S.; Conte, M.; Benedetti, R.; Tortorici, M.; Ciossani, G.; Valente, S.; Marrocco, B.; Labella, D.; Novellino, E.; et al. Pan-Histone Demethylase Inhibitors Simultaneously Targeting Jumonji C and Lysine-Specific Demethylases Display High Anticancer Activities. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 42–55. [\[CrossRef\]](#)
111. Giordano, A.; del Gaudio, F.; Johansson, C.; Riccio, R.; Oppermann, U.; Di Micco, S. Virtual Fragment Screening Identification of a Quinoline-5,8-dicarboxylic Acid Derivative as a Selective JMJD3 Inhibitor. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1160–1164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
112. Giordano, A.; Forte, G.; Terracciano, S.; Russo, A.; Sala, M.; Scala, M.C.; Johansson, C.; Oppermann, U.; Riccio, R.; Bruno, I.; et al. Identification of the 2-Benzoxazol-2-Yl-Phenol Scaffold as New Hit for JMJD3 Inhibition. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 601–605. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
113. Basu Mallik, S.; Pai, A.; Shenoy, R.R.; Jayashree, B.S. Novel Flavonol Analogues as Potential Inhibitors of JMJD3 Histone Demethylase-A Study Based on Molecular Modelling. *J. Mol. Graph. Model.* **2017**, *72*, 81–87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Zhang, Y.; Lou, C.; Xu, Y.; Li, J.; Qian, S.; Li, F.; Kang, J. Screening of Inhibitors against Histone Demethylation Jumonji Domain-Containing Protein 3 by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1613*, 460625. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Conclusion de la publication 1

Cette étude bibliographique permet de conclure que JMJD3 est sans doute impliquée dans la cancérogénèse mais son rôle est incertain. En effet, on remarque que JMJD3 est souvent impliquée dans des voies de signalisation qui sont dérégulées dans les cancers mais il est difficile de catégoriser JMJD3 en tant que suppresseur de tumeurs ou oncoprotéine (**Figure 24**). L'activité de JMJD3 semble dépendre du tissu dans lequel elle agit et au sein d'un même tissu, le rôle de JMJD3 est dépendant de l'agressivité de la maladie.

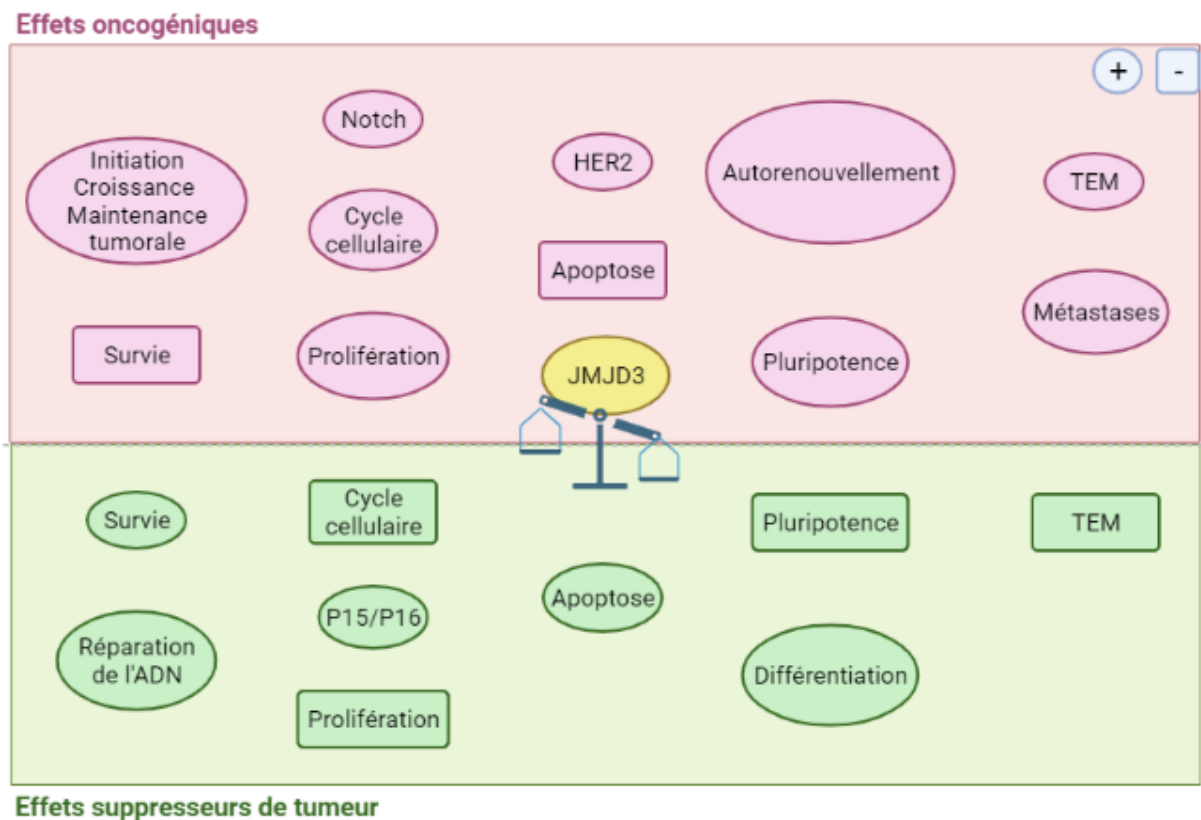


Figure 24 : Les différents effets oncogéniques et suppresseurs de tumeurs de JMJD3 sur les grandes voies impliquées dans la cancérogénèse.

ii. *La déméthylase UTX*

- Complexe protéique et mode d'action sur la marque H3K27me3

Comme précédemment évoqué, la méthylation des lysines a longtemps été considérée comme irréversible. C'est en 2007 qu'UTX a été identifié avec JMJD3 [6], comme déméthylases de la marque H3K27me2/me3, donnant un statut dynamique à la marque H3K27me3. C'est son domaine catalytique JmjC qui permet à UTX de déméthyliser H3K27me2/3 en utilisant un ion Fe²⁺ et de l' α -cétoglutarate. Les premières recherches sur UTX ont permis de l'identifier comme un acteur important dans la régulation de gènes impliqués dans l'inflammation [173] mais surtout dans le développement comme le gène *HOX* [174–178]. UTX a deux paralogues : JMJD3 et Ubiquitously Transcribed Tetratricopeptide Repeat Containing, Y-Linked (UTY). JMJD3 exerce la même activité qu'UTX, alors qu'UTY, qui possède 88% d'homologie avec UTX et un domaine JmjC bien conservé, n'est pas capable de déméthyliser H3K27me2/3 [176]. UTX fait partie du complexe Mixed-Lineage Leukemia 2 (MLL2) qui permet la mono-méthylation activatrice de H3K4. La déméthylation de H3K27me2/3 par UTX sur le promoteur des gènes en association avec le dépôt de la marque H3K4me1 est associé à des gènes transcriptionnellement actifs [178,179]. C'est son domaine de liaison au zinc qui lui permet de reconnaître l'extrémité N-terminale de H3 alors que le domaine JmjC reconnaît la partie C-terminale de H3 [180,181].

Les Rb et Retinoblastoma-like protein 2 (Rbl2) ainsi que des protéines de liaisons de Rb (gènes suppresseurs de tumeurs), ont été identifiés comme des gènes cibles d'UTX, qui au niveau de leur région promotrice, participe à la déméthylation de la marque H3K27me3 afin de permettre l'expression de ces gènes [182,183]. Par conséquent, la dérégulation de l'expression de la déméthylase peut conduire à un certain nombre de pathologies. D'ailleurs, *UTX* est surexprimée dans le cancer du rein [184]. Aussi, la perte de fonction d'UTX a été identifiée chez des patients atteints d'une maladie héréditaire appelée syndrome de Kabuki [185].

- Autres mode d'action

UTX interagit avec les facteurs de transcription T-box qui permettent de définir les lignées et un complexe de remodelage de la chromatine switch / sucrose non fermentable (SWI/SNF). L'interaction avec ces différents acteurs permet d'activer la transcription de gènes **indépendamment de son activité de déméthylase** [186]. Ce rôle indépendant de la

déméthylation de H3K27me3 a également été observé dans le contrôle de la différenciation du mésoderme médiée par UTX [187].

- Les rôles de la déméthylase UTX dans le cancer la prostate

A notre connaissance, il existe très peu de données sur le lien entre UTX et le développement d'un cancer de la prostate. Toutefois, *UTX* a été identifié comme un gène impliqué dans l'initiation et la progression du cancer en 2009 lorsqu'un certain nombre de mutations somatiques inactivant *UTX* ont été retrouvées dans plusieurs types de cancer [188]. En 2012, il a été identifié qu'*UTX* et son complexe *MLL2* étaient mutés dans le CRPC [189]. Toujours dans des modèles de CRPC, il a été mis en évidence que l'inhibition d'*UTX* avec le GSK-J4 permettait de maintenir les niveaux de H3K27me3 et de réduire la prolifération cellulaire [7]. Ces observations ont également été faites après utilisation de triptolide comme inhibiteur d'*UTX*, un triépoxyde diterpénique dérivé d'une plante médicinale, doté d'une puissante activité anti-tumorale [190].

c. Les épidrogues

De plus en plus de preuves mettent en évidence le lien entre les dérégulations épigénétiques et la cancérogénèse. Après des traitements par chimiothérapie ou hormonothérapie, beaucoup de patients atteints d'un cancer développent une tolérance aux traitements. Les DNMTs, HMTs (EZH2) et les KDMs (JMJD3 et UTX) sont dérégulées dans une large variété de cancers et font de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes à étudier dans le but de limiter ou supprimer la progression tumorale.

Les différentes épidrogues ciblant JMJD3 et particulièrement l'action de l'épidrogué GSK-J4 dans différents types de cancers, dont celui de la prostate, ont été décrits dans la publication 1 : « The Functions of JMJD3 in Cancers ». Brièvement, il en existe une petite vingtaine qui sont capables d'inhiber la déméthylase JMJD3 mais malheureusement, à par le GSK-J1 et le GSK-J4, ces molécules sont très peu ou pas utilisées en expérimentation car elles sont nouvellement découvertes. Elles pourraient, dans le future, être utilisées dans des essais cliniques. Un problème persiste souvent : les molécules identifiées comme inhibitrices de JMJD3 ou UTX peuvent aussi inhiber d'autres déméthylases comme LSD1 [191] ou Jumonji domain containing 1A (JMJD1A) et F-box and leucine-rich repeat 11 (FBXL11) [192]. Des molécules peuvent inhiber l'activité de JMJD3 par fixation compétitive sur son site catalytique

Jmjc mais n'inhibent pas forcément UTX [192], ou de façon moindre [193], ce qui n'est pas le cas de l'inhibiteur chimique GSK-J4 qui inhibe UTX et JMJD3. Le GSK-J4 semble être une molécule intéressante pour lutter contre la progression des cancers.

Les épidroques d'EZH2 sont beaucoup plus nombreuses. La plus connue est le 3-Deazaneplanocin (DZNeP), synthétisée en 1986 comme un inhibiteur de la S-adénylhomocystéine (SAH) hydrolase. Cette molécule inhibe donc EZH2 de façon indirecte car elle entraîne l'augmentation de SAH qui elle-même agit négativement sur le donneur de méthyle SAM. DZNeP a un effet sur la quantité de S-adényl-L-méthionine, le substrat endogène qui se lie au domaine SET d'EZH2 pour permettre le transfert d'un groupe méthyle sur le groupement aminé de la lysine 27 de l'histone H3. (**Figure 25**) [194]. Le DZNeP a déjà montré son efficacité dans le cancer de la prostate en diminuant la progression tumorale, par dé-répression de l'expression de facteurs aux fonctions de suppresseurs de tumeur comme *KLF2*, *IFNGR1*, d'inhibiteur de l'invasion tumorale (*TIMP*) [8,130,142,143,195,196]. L'inhibiteur SAH et la Sinefungin (analogue de SAM), sont capables d'inhiber l'activité d'EZH2. Toutefois, avec l'inhibiteur DZNeP, ces molécules montrent une faible spécificité pour la méthyltransférase, par conséquent des molécules compétitives du donneur de méthyle SAM conçues pour être plus spécifiques d'EZH2 ont été élaborées [197]. L'inhibiteur le plus prometteur d'EZH2 est le tazemetostat ou EPZ-6438, inhibiteur compétitif de SAM, et fait déjà l'objet d'une vingtaine d'essais cliniques. D'abord en pré-clinique chez les animaux, il a été démontré que la molécule avait une bonne biodisponibilité orale, et entraînait une diminution des tumeurs dans les lymphomes non hodgkiniens [198]. Dans un essai clinique de phase I, des réponses complètes au traitement par le tazemetostat ont été observées chez 38% patients atteints de lymphome non hodgkinien [199]. Cette molécule est aujourd'hui administrée sous le nom de TazvérikTM aux Etats-Unis à des adultes et des adolescents âgés de 16 ans et plus, atteints d'un sarcome épithélioïde localement avancé ou métastatique non éligible à une ablation totale [200]. Selon European Society for Medical Oncology (ESMO), des essais cliniques du tazemetostat en association avec l'abiratéron et la prednisone ou l'enzalutamide chez des patients atteints d'un CRPC métastatique sont en cours. La phase Ib démontre que la toxicité est conforme aux effets indésirables connus de chacune des molécules administrées. En terme d'efficacité, une réduction du PSA a été enregistrée. La phase II est donc en cours de recrutement pour le cancer de la prostate.

Outre les inhibiteurs de l'activité d'EZH2, il a été élaboré des molécules capables de perturber les interactions du complexe PRC2, notamment celles entre EZH2-EED et EZH2-

SUZ12. C'est par le développement de peptides stabilisés de l'hélice α d'EZH2 (SAH-EZH2) qui perturbent le complexe EZH2-EED que les niveaux de H3K27me3 et la croissance des cellules tumorales dépendantes d'EZH2 sont réduits [201]. De plus, la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est capable de phosphoryler l'histone méthyltransférase EZH2 pour perturber l'interaction entre EZH2 et SUZ12. Une corrélation positive a été mise en évidence entre EZH2 phosphorylée et la survie chez les patients atteints de cancer ovarien et mammaire [202].

La dérégulation de ces acteurs dans le cancer fait d'eux de bonnes cibles pour limiter la progression tumorale et pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses. Toutefois, les molécules pour cibler UTX et JMJD3 manquent, avec toujours aucun essai clinique ciblant ces protéines. La recherche sur les inhibiteurs d'EZH2 est à l'inverse très conséquente. Il faudrait concevoir et amener plus de molécules ciblant à la fois EZH1 et EZH2 en essai clinique. Cette combinaison permettrait d'éviter l'effet compensatoire d'EZH1 lorsque seule EZH2 est réprimée. La spécificité envers la protéine ciblée est indispensable pour éviter les problèmes de toxicité lors de l'administration aux patients. De plus, la combinaison de ces molécules à des traitements déjà existants semble être une très bonne stratégie pour le développement de nouveaux traitement anti-cancéreux.

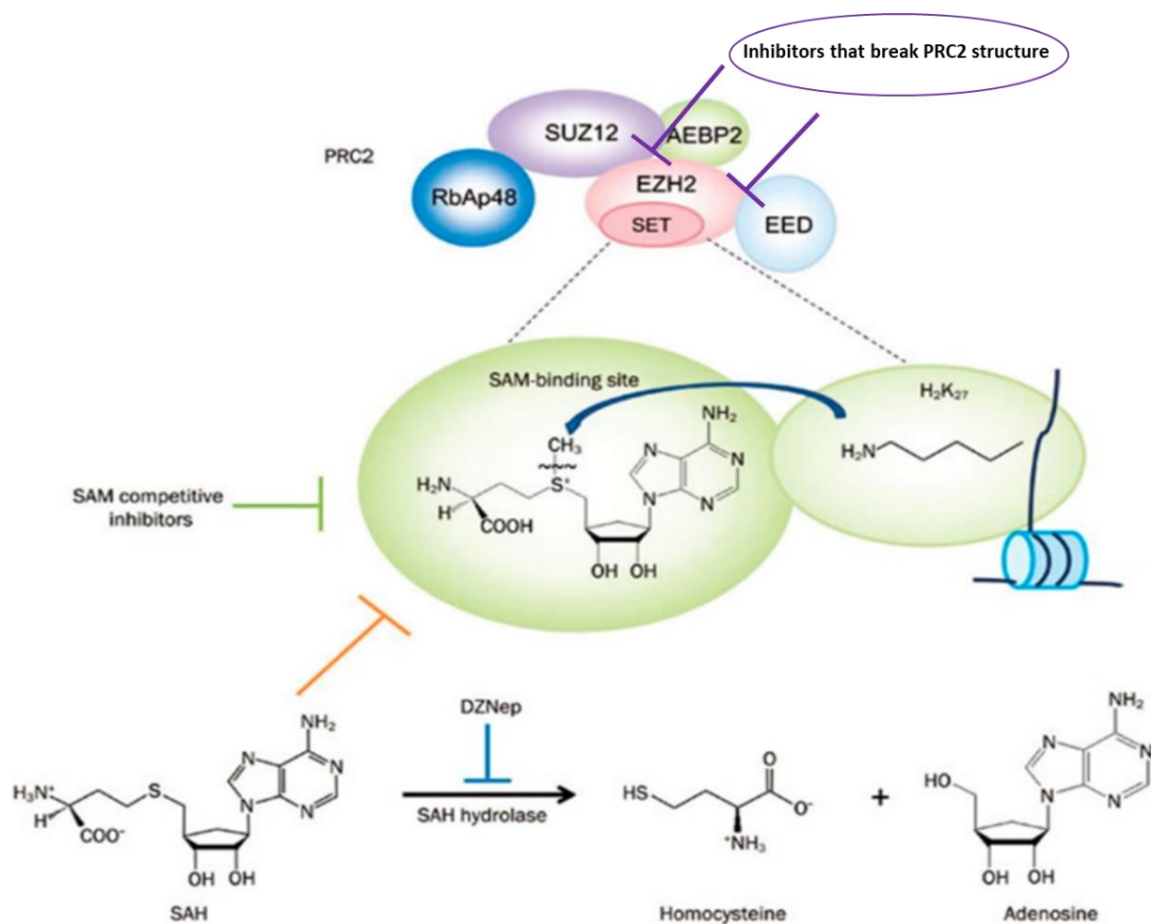


Figure 25: Composition des sous-unités de PRC2 et les 4 modes d'inhibition.

Inhibiteurs compétitifs de SAM, SAH, DZNep en tant d'inhibiteur de l'hydrolyase SAH, les inhibiteurs qui cassent la structure du complexe PRC2. Modifiée à partir de [197].

CHAPITRE II. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Ces travaux de thèse se focalisent sur les rôles d'EZH2, UTX et JMJD3 dans la régulation de la marque H3K27me3 sur les gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, *RPS6KA2* dans le cancer de la prostate. Premièrement, nous nous sommes demandés si :

- EZH2, JMJD3 et UTX sont-ils bien responsables de la dérégulation de l'expression de *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* dans le cancer de la prostate ?

Pour répondre à cette question, nous avons menés trois études *in vitro* par lesquelles nous avons évalué le rôle des trois acteurs dans la régulation de ces gènes. Ces études avaient pour objectifs de comparer l'enrichissement de la marque sur les gènes d'intérêt dans des cellules continues de cancer de la prostate non traitées et traitées par les inhibiteurs chimiques d'EZH2, UTX et JMJD3. Parallèlement, nous avons regardé quel était l'impact de l'inhibition des trois acteurs sur l'expression des gènes, en utilisant une inhibition chimique et une inhibition par siARNs.

Ensuite, nous nous sommes focalisés sur l'implication de JMJD3 dans le cancer de la prostate. En effet, il existe moins de données de littérature sur le rôle de JMJD3 dans le cancer de la prostate.

Après avoir examiné quel était le rôle de JMJD3 dans la régulation des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* dans le cancer de la prostate *in vitro*, il était important de comparer ces résultats avec des données *in vivo*. Nous nous sommes alors posés les questions suivantes :

- Quel est l'impact de l'inhibition de JMJD3 sur la croissance tumorale prostatique *in vivo* ?
- Quel est l'impact de l'inhibition de JMJD3 *in vivo* sur le profil d'expression d'un pool de gènes impliqués dans la cancérogénèse ?

Pour répondre à ces questions, nous avons mené une étude *in vivo*, sur des souris mâles immunodéprimées. Le but de cette étude était de comparer la progression tumorale entre deux groupes de souris porteuses de xénogreffes prostatiques traitées et non traitées par le GSK-J4.

CHAPITRE III. RÉSULTATS

1. Implication de la méthyltransférase EZH2 et des déméthylases JMJD3 et UTX dans le cancer de la prostate – Approche *in vitro* – La régulation des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2*

a. Mise en évidence d'un rôle différentiel d'EZH2 en fonction du statut en récepteur aux androgènes

Présentation de la publication 2

OMICS A Journal of Integrative Biology
Volume 24, Number 0, 2020
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/omi.2019.0162

Letter to the Editor

The Inhibition of the Histone Methyltransferase EZH2 by DZNEP or SiRNA Demonstrates Its Involvement in *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* Gene Regulation in Prostate Cancer

El Ouardi, D.; Idrissou, M.; **Sanchez, A.**; Penault-LLorca, F.; Guy, L.; Bignon, Y.-J.; Bernard-Gallon, D. OMICS: A Journal of Integrative Biology 2020, 24, 116–118.

Ces résultats traitent de l'implication d'EZH2 sur la régulation des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2*. Pour démontrer l'implication d'EZH2 sur la régulation de l'expression de ces gènes, nous avons utilisé des lignées continues de cellules de cancer de la prostate les LNCaP (RA+) et les DU-145, PC-3 (RA-) que nous avons traité avec le DZNeP, molécule qui inhibe l'activité méthyltransférase d'EZH2. A la suite de cette inhibition nous avons regardé l'enrichissement de la marque H3K27me3 et d'EZH2 sur les gènes d'intérêt par la technique de CHIP-qPCR. L'inhibition d'EZH2 a été comparée à une inhibition plus spécifique par l'utilisation de siEZH2 dont la dose adéquate a été identifiée par western blot. Nous avons ensuite regardé l'expression du panel de gènes par RT-qPCR après inhibition par siEZH2 et par traitement chimique DZNeP.

The Inhibition of the Histone Methyltransferase EZH2 by DZNEP or SiRNA Demonstrates Its Involvement in *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* Gene Regulation in Prostate Cancer

Driss El Ouardi,^{1,2} Mouhamed Idrissou,^{1,2} Anna Sanchez,^{1,2} Frédérique Penault-Llorca,^{2,3}
 Yves-Jean Bignon,^{1,2} Laurent Guy,^{2,4} and Dominique Bernard-Gallon^{1,2}

To the Editor:

In France, prostate cancer is the most common cancer in men (Bray et al., 2018). Previously, our team has reported the involvement of epigenetic factors in prostate cancer (Ngollo et al., 2014, 2017). The histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) is a repressive mark that induces chromatin compaction and thus gene inactivation. This mark is regulated positively by the methyltransferase EZH2 that found to be overexpressed in prostate cancer.

Lately, another study with prostate tumor biopsies showed an overexpression of *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2* genes with a colocalization of EZH2 in their promoters (Daures et al., 2018). These genes are involved in several cell pathways such as DNA repair, mRNA splicing, and MAPK pathways. However, H3K27me3 regulation by methyltransferase EZH2 may become a possible target to detect prostate cancer.

So, to demonstrate the involvement of EZH2 in the regulation of gene expression (*MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1*) in DU145, PC3 and LNCaP prostate cancer cell lines, chemical or siRNA inhibition of EZH2 were used. The chemical inhibitor was DZNeP and then chromatin immunoprecipitation (ChIP) followed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) allowed to quantify H3K27me3 enrichment on genes by EZH2. In contrast, the siRNA inhibition of EZH2 was first validated by Western Blotting with 0.05 μ M of siRNA for 72 h (Fig. 1B), secondly quantification of mRNA level for studied genes was determined by RT-qPCR and was compared with mRNA expression after DZNEP treatment of these studied prostate cancer cell lines.

Figure 1A exhibited the ChIP-qPCR results and shows that H3K27me3 enrichment tended to decrease on control genes (*Myoglobin*, *GAPDH*) and treated genes (*MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2*) in DU145 cells treated with DZNeP compared with untreated cells. However, EZH2 enrichment remains unchanged between treated and control cells. For

PC3 cells, the H3K27me3 and EZH2 enrichments on all genes tended to decrease in treated cells compared with control cells. On the contrary, in LNCaP cells, the DZNeP treatment induced an unexpected increase of H3K27me3 enrichment on all genes with significance for *Myoglobin*, *GAPDH*, *TRA2A*, and *U2AF1* genes compared with untreated cells.

These results indicate that DZNeP can reduce H3K27me3 enrichment on treated genes through EZH2 inhibition in DU145 and PC3 cell lines, but not in LNCaP cell line.

Then, we performed RT-qPCR to quantify mRNA levels of studied genes in these cell lines treated with siEZH2 or DZNeP and in their controls.

For DU145 cells, Figure 1C shows a significant increase of mRNA level of *MGMT* and *RPS6KA2* in cells treated with a siEZH2 compared with control cells. However, DZNeP treatment tended to increase mRNA levels of all genes compared with control cells.

Concerning PC3 cells, siEZH2 treatment tended to decrease significantly *MGMT* and *TRA2A* but increased *RPS6KA2* mRNA levels compared with control cells. However, DZNeP treatment tended to increase only the *U2AF1* mRNA level compared with control cells.

Finally, in LNCaP cells, siEZH2 treatment increased only *U2AF1* and tended to increase *RPS6KA2* mRNA levels compared with control cells. In contrast, DZNeP treatment tended to decrease significantly the *MGMT* and *RPS6KA2* mRNA levels but increases *U2AF1* compared with control cells.

Through this study, we demonstrated that DZNeP can reduce H3K27me3 enrichment in DU145 and PC3 cell lines that do not express the androgen receptor (AR⁺). This suggests a role of EZH2 in H3K27me3 regulation in these two cell lines. Since DZNeP only inhibits the EZH2 activity without affecting its binding capacities on gene promoters, EZH2 enrichment has not changed between DZNeP treated and untreated cells, therefore, validating the efficacy of DZNeP treatment in these cell lines.

¹Department of Oncogenetics, Centre Jean Perrin, CBRV, Clermont-Ferrand, France.

²INSERM—U1240—Molecular Imaging and Theranostic Strategies (IMOST), Clermont-Ferrand, France.

³Department of Biopathology, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France.

⁴Department of Urology, Gabriel Montpied Hospital, Clermont-Ferrand, France.

2

EL OUARDI ET AL.

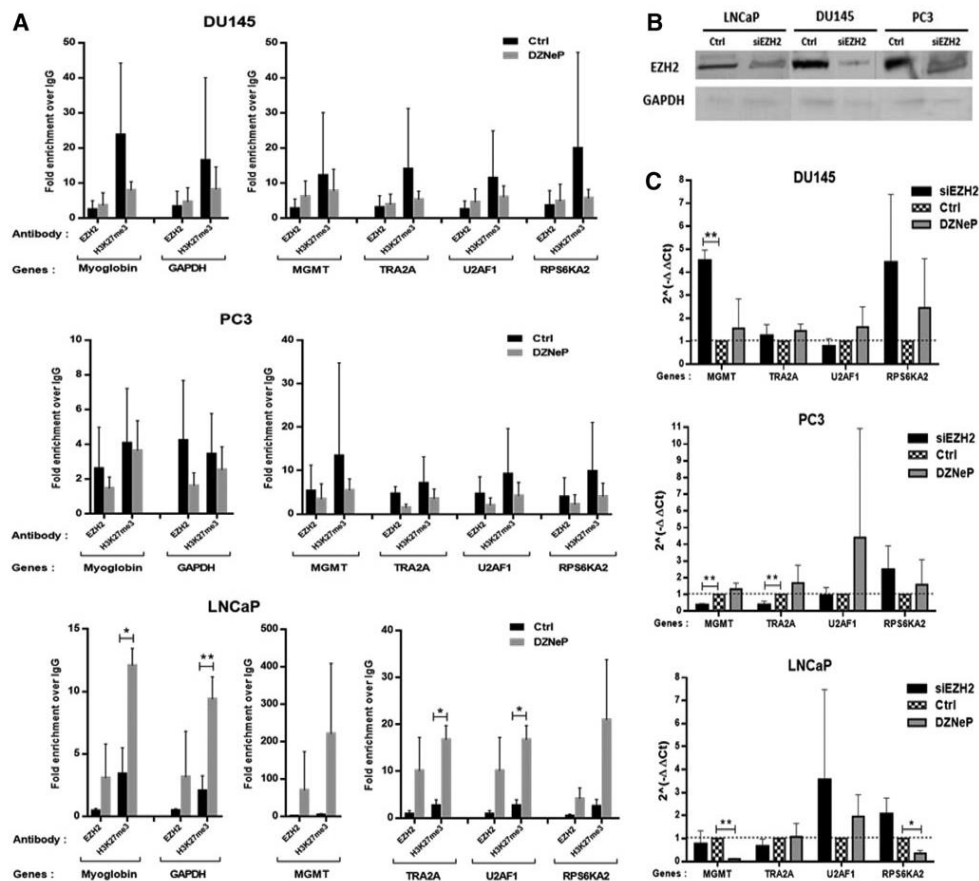


FIG. 1. Effects of EZH2 inhibition on H3K27me3 enrichment and gene expression in prostate cancer cell lines. (A) ChIP-qPCR analysis of H3K27me3 enrichment on control genes (*Myoglobin*, *GAPDH*) and treated genes (*MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *UZAF1*) in DU145, PC3, and LNCaP cell lines treated by DZNeP (gray bar) or control cells (black bar). ChIP was performed using antihuman H3K27me3 polyclonal rabbit antibody (No. C154101956; Diagenode), antihuman EZH2 polyclonal rabbit antibody (No. C15410039; Diagenode), and the negative control rabbit IgG (No. C15410206; Diagenode). The results were presented by fold enrichment over IgG. Value = means \pm SD with three measures. Data were analyzed by Student's *t*-test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (B) Western Blotting analysis of EZH2 inhibition by siRNA (AM16706 107418; Ambion) using antihuman EZH2 polyclonal rabbit antibody (No. C15410039; Diagenode) and anti-GAPDH monoclonal mouse antibody (Sc-47724) as positive control. (C) mRNA level analysis of treated genes in cell lines transfected with siEZH2 (black bar) or treated by DZNeP (gray bar) and control cells (dotted bar) were determined by RT-qPCR using comparative $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method. Fold change was used with reference set to 1. Value = means \pm SD with three measures. Data were analyzed by Student's *t*-test * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. ChIP, chromatin immunoprecipitation; H3K27me3, histone 3 lysine 27 tri-methylated; qPCR, quantitative polymerase chain reaction.

Surprisingly, in the LNCaP cell line that expresses the AR⁺ that is a transcription factor involved in many cell processes, we observed a reverse effect induced by DZNeP for H3K27me3 and EZH2 enrichments. A possible explanation, corroborating with other studies, might come from the involvement of AR in the repression of certain genes through their collaborations with EZH2 (Chng et al.,

2012; Zhao et al., 2012). Furthermore, a higher level of H3K27me3 for AR-repressed genes was also observed. Different genes have been found repressed, notably *MGMT* that is enriched with AR (Massie et al., 2011) and *TRA2A* (Zhao et al., 2012).

In contrast, gene expression analysis demonstrated that EZH2 inhibition by siRNA had not increased gene

THE INHIBITION OF EZH2 IN PROSTATE CANCER

3

expressions, except for *MGMT* and *U2AF1* in DU145 and *U2AF1* in LNCaP cells. This result indicates that siEZH2 efficacy depends on genes and cell lines. Likewise, authors reported that EZH2 knockdown by siEZH2 differentially regulates genes in LNCaP cells (Zhao et al., 2012). It suggests that other mechanisms could be involved in the regulation of these genes.

As for DZNeP treatment, the comparison of gene expression profiles and H3K27me3 enrichment shows a corroboration in the DU145 and PC3 cell lines. Indeed, by decreasing H3K27me3 enrichment, DZNeP tended to increase gene expression in these two cell lines. For LNCaP cell line, the low level of mRNAs of *MGMT* and *RPS6KA2* genes confirms the hypermethylated profile of these genes.

In conclusion, this study confirms the involvement of EZH2 in gene regulation through H3K27me3, and its inhibition by DZNeP or siEZH2 could be effective depending on the cell line and gene concerned. In the future, it would be interesting to study the effects of EZH2 inhibition on tumor growth *in vivo*.

Author Disclosure Statement

The authors declare they have no conflicting financial interests.

Funding Information

This study was supported by grants from the French *Ligue Régionale Contre Le Cancer*—Comité du Puy-de-Dôme and from ARTP (Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate).

References

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424.
- Chng KR, Chang CW, Tan SK, et al. (2012). A transcriptional repressor co-regulatory network governing androgen response in prostate cancers. *Embo J* 31, 2810–2823.
- Daires M, Idrissou M, Judes G, et al. (2018). A new metabolic gene signature in prostate cancer regulated by JMJD3 and EZH2. *Oncotarget* 9, 23413–23425.
- Massie CE, Lynch A, Ramos-Montoya A, et al. (2011). The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *Embo J* 30, 2719–2733.
- Ngollo M, Lebert A, Dagdemir A, et al. (2014). The association between histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and prostate cancer: Relationship with clinicopathological parameters. *BMC Cancer* 14, 994.
- Ngollo M, Lebert A, Daires M, et al. (2017). Global analysis of H3K27me3 as an epigenetic marker in prostate cancer progression. *BMC Cancer* 17, 261.
- Zhao JC, Yu J, Runkle C, et al. (2012). Cooperation between Polycomb and androgen receptor during oncogenic transformation. *Genome Res* 22, 322–331.

Address correspondence to
Dominique Bernard-Gallon, PhD
Department of Oncogenetics
Centre Jean Perrin, CBRV
INSERM U1240
28 Place Henri Dunant
Clermont-Ferrand 63001
France

E-mail: dominique.gallon-bernard@clermont.unicancer.fr

Abbreviations Used

AR	= androgen receptor
ChIP	= chromatin immunoprecipitation
DZNeP	= 3-deazaneplanocin A hydrochloride
EZH2	= enhancer of zeste homolog 2
GAPDH	= glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H3K27me3	= histone 3 lysine 27 tri-methylated
MAPK	= mitogen-activated protein kinase
MGMT	= O ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferase
RT-qPCR	= reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
RPS6KA2	= ribosomal protein S6 kinase A2
siRNA	= small interfering RNA
TRA2A	= transformer 2 alpha homolog
U2AF1	= U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1

Conclusion de la publication 2

Après inhibition d'EZH2 par le traitement DZNeP, nous avons observé une nette différence de comportement entre les cellules RA- (PC-3 et DU-145) et RA+ (LNCaP). En ce qui concerne la marque H3K27me3, on note une diminution de l'accumulation de la marque sur les gènes d'intérêt dans les cellules RA- tandis qu'une augmentation a été relevée dans la lignée LNCaP RA+. Aussi, le comportement d'EZH2 après inhibition n'était pas le même : Dans les cellules PC-3, une tendance à la diminution de l'accumulation d'EZH2 sur les gènes d'intérêt a été observée après traitement DZNeP alors qu'aucune différence n'a été noté dans la lignée DU-145. En revanche, le traitement des cellules LNCaP par le DZNeP a conduit à une forte augmentation de l'accumulation d'EZH2, en adéquation avec l'augmentation de la marque H3K27me3, sur ces mêmes gènes.

L'analyse de l'expression des gènes après traitement chimique et par siEZH2 est résumée dans le tableau ci-après (**Tableau 5**). Globalement, la diminution de H3K27me3 sur les gènes après traitement dans les cellules RA- a entraîné une plus ou moins forte augmentation de l'expression des gènes en adéquation avec le profil répressif de la marque. Les résultats de la RT-qPCR pour les LNCaP sont disparates en fonction des gènes : La diminution de l'expression de *MGMT* et *RPS6KA2* concorde avec le fort enrichissement de la marque sur ces gènes après traitement chimique. En revanche, le gène *TRA2A* ne montre pas de grande variation d'expression après les différents traitements alors que de façon surprenante, le gène *U2AF1*, enrichie en H3K27me3 après traitement est surexprimé. De plus, les résultats entre les deux traitements diffèrent dans les lignées PC-3 pour les gènes *MGMT*, *TRA2A* et *U2AF1* ; pour le gène *RPS6KA2* dans la lignée LNCaP et pour le gène *U2AF1* dans la lignée DU-145.

Les résultats de cette lettre à l'éditeur suggère qu'il y a un lien entre la régulation de la marque H3K27me3, EZH2 et le RA. EZH2 est impliquée dans la régulation de ces gènes puisque son inhibition entraîne des variations de leur expression. Toutefois, l'efficacité de l'inhibition d'EZH2 semble dépendre du contexte cellulaire.

Lignées cellulaires Traitements Gènes	DU-145		PC-3		LNCaP	
	siEZH2	DZNeP	siEZH2	DZNeP	siEZH2	DZNeP
<i>MGMT</i>	+**	+	._**	=+	=-	._**
<i>TRA2A</i>	=+	=+	._**	+	=-	=
<i>U2AF1</i>	=-	+	=	+	+	+
<i>RPS6KA2</i>	+	+	+	+	+	._*

Tableau 5 : Récapitulatif de l'effet des traitements DZNeP et siEZH2 sur l'expression des gènes d'intérêt *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* dans les différentes lignées continues de cellules cancéreuses de la prostate PC-3, DU-145 et LNCaP.

*Significativité ; + Surexpression ; - Sous-expression ; =+ Tendance à l'augmentation ; =- Tendance à la diminution. Les cases sont rouges lorsqu'il y a un effet inverse entre les deux types de traitement.

- b. *L'inhibition chimique avec le GSK-J4 ou des siARNs de JMJD3 entraîne une régulation négative des gènes d'intérêt MGMT, TRA2A, U2AF1, RPS6KA2*

Présentation de la publication 3

OMICS A Journal of Integrative Biology
Volume 24, Number 0, 2020
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/omi.2020.0054

Letter to the Editor

Role of JMJD3 Demethylase and Its Inhibitor GSK-J4 in Regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* Genes in Prostate Cancer Cell Lines

Sanchez, A.; El Ouardi, D.; Houfaf Khoufah, F.Z.; Idrissou, M.; Boisnier, T.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 2020, 24, 505–507.

Dans la même optique que pour l'étude de la régulation des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* par la méthyltransférase *EZH2*, nous avons regardé l'effet de deux types d'inhibition sur *JMJD3*, chimique par le *GSK-J4* ou par des *siJMJD3*, sur la régulation de ces gènes dans le cancer de la prostate. Les mêmes lignées continues de cellules cancéreuses prostatiques ont été utilisées. Nous avons ainsi regardé, après traitement *GSK-J4*, l'effet sur l'enrichissement des gènes en *H3K27me3* par *ChIP-qPCR*. Puis après inhibition chimique et par *siJMJD3*, l'effet sur l'expression des gènes d'intérêt par *RT-qPCR*.

Role of JMJD3 Demethylase and Its Inhibitor GSK-J4 in Regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* Genes in Prostate Cancer Cell Lines

Anna Sanchez,^{1,2} Driss El Ouardi,^{1,2} Fatma Zohra Houfah Khoufah,^{1,2} Mouhamed Idrissou,^{1,2}
 Tiphane Boisnier,^{1,2} Frédérique Penault-Llorca,^{2,3} Yves-Jean Bignon,^{1,2}
 Laurent Guy,^{2,4} and Dominique Bernard-Gallon^{1,2}

To the Editor:

Today more and more studies are illustrating the involvement of epigenetic alterations in cancer biology and therapeutics (Dzobo, 2019). Previously, it has been shown that the increased expression of Jumonji domain-containing protein 3 (JMJD3) demethylase was able to remove histone 3 lysine 27 trimethylated (H3K27me3) methylation in prostate cancer cell lines and human tumor biopsies (Daures et al., 2016). As a result of the latter research, four candidate genes (*MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1*) have been identified as a putative biosignature for prostate cancer. These genes are involved in different cellular processes such as DNA damage repair, mRNA splicing, or in the mitogen-activated protein kinase 6 (MAPK) regulatory pathway, thus having biological plausibility as potential markers.

In addition, after determination of the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀), it was shown that the inhibitor of JMJD3, ethyl 3-((6-(4,5-dihydro-1H-benzof[d]jzepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate (GSK-J4), was able to modulate the expression of these candidate genes in the DU-145, PC-3, and LNCaP cell lines (Daures et al., 2018).

Thus, to provide further evidence on the involvement of JMJD3 demethylase in prostate tumor progression, and particularly on *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* candidate gene expressions, an analysis of the H3K27me3 enrichment was performed by chromatin immunoprecipitation (ChIP)-quantitative polymerase chain reaction (qPCR) after inhibition of JMJD3 by GSK-J4 in prostate cancer cell lines. Subsequently, a reverse transcription (RT)-qPCR was conducted after inhibition of JMJD3 by small interfering RNA (siRNA) or GSK-J4 inhibitor to demonstrate its demethylase activity on the expression of studied genes. In addition, the inhibition of JMJD3 by siRNA was validated by Western blotting.

The analysis of H3K27me3 (Fig. 1A) showed an increase in H3K27me3 on the *MYOGLOBIN* and *GAPDH* control genes after treatment with GSK-J4 for the DU-145 and LNCaP cell lines, but no variation was observed in PC-3 cell line. In contrast, the enrichment of the marker on the genes of interest (*MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1*) tended to increase in different cell lines. Also, the accumulation of JMJD3 on target genes did not vary for DU-145 and PC-3 cell lines, but there was an in-

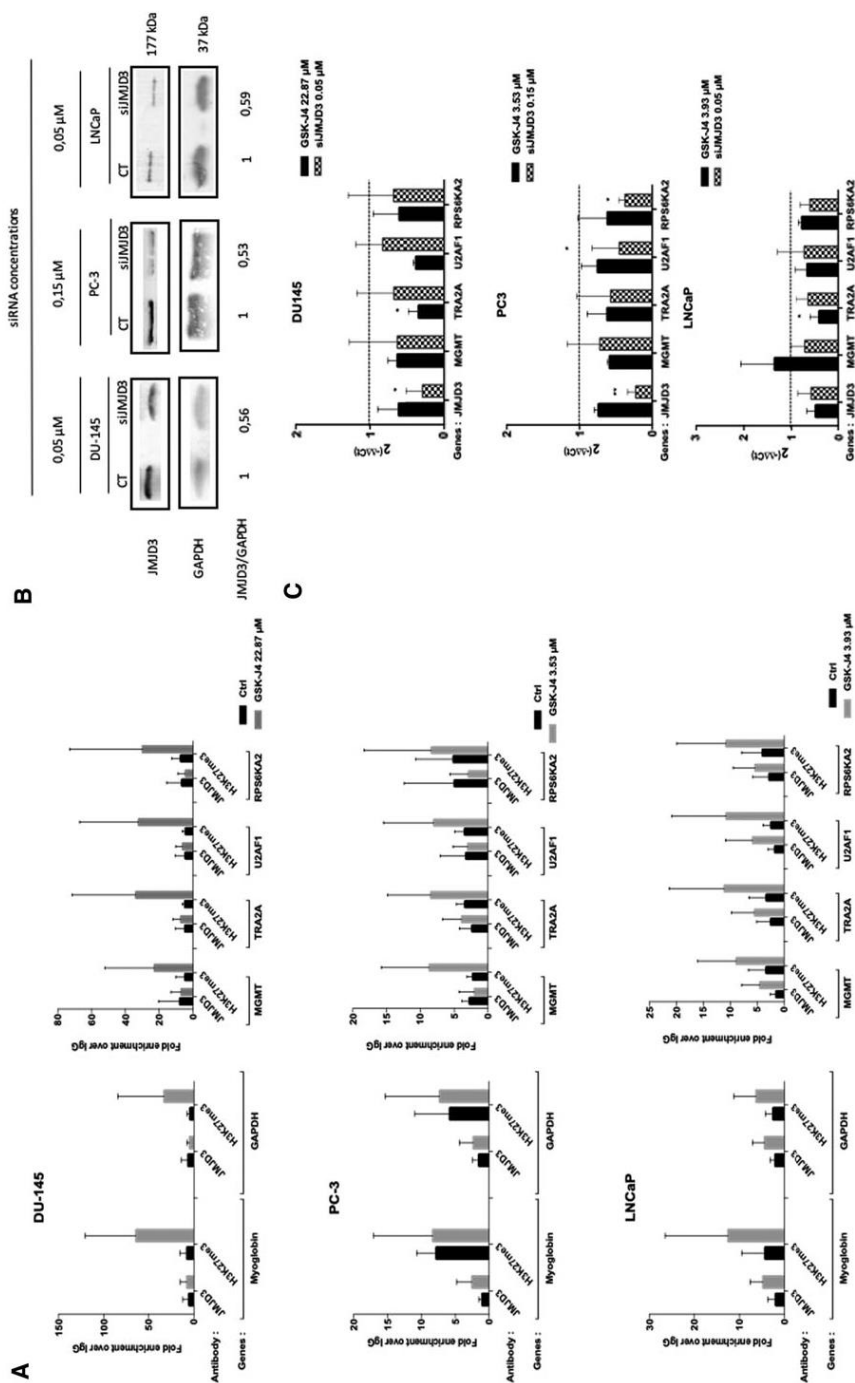
FIG. 1. Effects of JMJD3 inhibition on H3K27me3 enrichment and gene expression in prostate cancer cell lines. (A) ChIP-qPCR analysis of H3K27me3 enrichment on control genes (*Myoglobin*, *GAPDH*) and candidate genes (*MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2*) in DU-145, PC-3, and LNCaP cell lines treated by GSK-J4 (gray bar) or control cells (black bar). Cell lines were treated at IC₅₀ concentration for GSK-J4 (DU-145: 22.87 μM, PC-3: 3.53 μM and LNCaP: 3.93 μM). ChIP was performed using antihuman H3K27me3 polyclonal rabbit antibody (no. C154101956; Diagenode), antihuman JMJD3 polyclonal rabbit antibody (ab169197; Abcam) and the negative control rabbit IgG (C15410206; Diagenode). Results are presented by fold enrichment over IgG. Value = means ± SD with three samples. (B) Western blotting analysis of JMJD3 inhibition by siRNA (sc-93819; Santa Cruz Biotechnology) using antihuman JMJD3 polyclonal rabbit antibody 1:500 (ab169197; Abcam) and anti-GAPDH monoclonal mouse antibody (sc-47724; Santa Cruz Biotechnology) as positive control at 1:500 dilution. Secondary antimouse IgG (Fc), AP conjugate (S3721; Promega) or secondary antirabbit IgG (Fc), AP conjugate (S3731; Promega) were used at 1:2000 dilution. DU-145 and LNCaP cell lines were treated at 0.05 μM siJMJD3 and PC-3 cell line was treated at 0.15 μM siJMJD3. (C) mRNA level analysis of candidate genes in cell lines transfected with siJMJD3 (dotted bar) or treated by GSK-J4 (black bar) were determined by RT-qPCR using comparative 2^{-ΔΔCt} method. Values shown are the average (means ± SD) from three samples and normalized to control without treatment. Data were analyzed by Student's *t*-test **p* < 0.05; ***p* < 0.01. ChIP, chromatin immunoprecipitation; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GSK-J4, ethyl 3-((6-(4,5-dihydro-1H-benzof[d]jzepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate; H3K27me3, histone 3 lysine 27 trimethylated; IC₅₀, half maximal inhibitory concentration; JMJD3, Jumonji domain-containing protein 3; MAPK, mitogen-activated protein kinase 6; MGMT, O-methylguanine-DNA methyltransferase; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction; RPS6KA2, ribosomal protein S6 kinase A2; SD, standard deviation; siRNA, small interfering RNA; TRA2A, transformer 2 alpha homolog; U2AF1, 2 small nuclear RNA auxiliary factor 1.

¹Department of Oncogenetics, Centre Jean Perrin, CBRV, Clermont-Ferrand, France.

²INSERM-U1240-Molecular Imaging and Theranostic Strategies (IMOST), Clermont-Ferrand, France.

³Department of Biopathology, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France.

⁴Department of Urology, Gabriel Montpied Hospital, Clermont-Ferrand, France.



LETTER TO THE EDITOR

3

creased trend for LNCaP cell line. These results collectively suggest that GSK-J4 treatment inhibits the activity of JMJD3 leading to an increase in the enrichment of H3K27me3 on genes.

Inhibition of JMJD3 by siRNA was chosen to show a decrease in JMJD3 protein accumulation after Western blotting analysis (Fig. 1B). Figure 1C shows gene expression by RT-qPCR analysis after inhibition of JMJD3 by siRNA and chemical inhibition by GSK-J4. Inhibition of JMJD3 by GSK-J4 exhibited nonsignificant decrease in JMJD3 expression in the three cell lines. Conversely, the inhibition of JMJD3 by siRNA led to a significant decrease of JMJD3 expression in DU-145 and PC-3 cell lines. Consecutively, a significant decrease in the *TRA2A* gene expression was noted with GSK-J4 in DU-145 and LNCaP cell lines. *RPS6KA2* and *U2AF1* exhibited a significant decrease with JMJD3 siRNA in PC-3 cell line.

mRNA analysis confirmed that the enrichment in H3K27me3 on target genes, shown in Figure 1A, led to an inhibition of *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* expression, affirming H3K27me3 as a repressive marker.

Epigenetic drug mechanisms are increasingly studied today (Dzobo, 2019). Indeed, the low accumulation of JMJD3 on different genes (Fig. 1A) and the slight decrease in the expression of JMJD3 (Fig. 1C) after inhibition by GSK-J4 showed the efficacy of an epigenetic drug approach on the activity of JMJD3. The use of siJMJD3 resulted in a similar expression profile of the target genes.

The androgen receptor (AR) status seems to influence the accumulation of JMJD3 on candidate genes. Indeed, AR- cell lines (DU-145 and PC-3) showed no increase in JMJD3 after inhibition, whereas AR+ cell line (LNCaP) showed a tendency to accumulate JMJD3. This result was also demonstrated at the transcriptional level of JMJD3 between AR- and AR+ cell lines (Daures et al., 2016).

MGMT gene, involved in DNA repair, showed overexpression after inhibition by GSK-J4 in the LNCaP cell line. Presumably, this gene expression is dependent on the AR status. Indeed, a study showed a significant difference in *MGMT* gene methylation between AR+ and AR- cells in a prostate cancer model (Mishra et al., 2010).

Upregulation of genes such as *U2AF1* and *TRA2A* that are involved in splicing pathway appears to be important as studies are showing the link between splicing and tumor progression. The decrease in gene expression by inhibition of JMJD3 needs to be highlighted. It has already been shown that demethylase JMJD1 is a coactivator of AR in prostate cancer and that overexpression of a number of factors involved in splicing would lead to a wide variety of gene functions in carcinogenesis (Takayama, 2019).

Furthermore, inhibition of *RPS6KA2* has already been shown to decrease proliferation in LNCaP and PC-3 cell lines (Yu et al., 2015). In this context, the inhibition of an upstream actor of *RPS6KA2* could be a new therapeutic target for JMJD3.

In conclusion, these data and analysis emphasize the link between JMJD3 and the regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* genes in prostate cancer cell lines. Accumulation of H3K27me3 on specific genes leads to a decrease in their expression, making H3K27me3 a repressive epigenetic marker. JMJD3 is regulated *in vitro* by siRNA or GSK-J4, making JMJD3 a potential therapeutic target. In the future, it would be interesting to see the effect of JMJD3 inhibition on *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2* genes *in vivo*.

Author Disclosure Statement

The authors declare that no conflicting financial interests exist.

Funding Information

This study was supported by grants from the French *Ligue Régionale Contre le Cancer*—Comité du Puy-de-Dôme and from ARTP (Association pour la Recherche sur les tumeurs de la Prostate).

References

- Daures M, Idrissou M, Judes G, et al. (2018). A new metabolic gene signature in prostate cancer regulated by JMJD3 and EZH2. *Oncotarget* 9, 23413–23425.
- Daures M, Ngollo M, Judes G, et al. (2016). The JMJD3 histone demethylase and the EZH2 histone methyltransferase in prostate cancer. *OMICS* 20, 123–125.
- Dzobo K. (2019). Epigenomics-guided drug development: Recent advances in solving the cancer treatment ‘jigsaw puzzle’. *OMICS* 23, 70–85.
- Mishra DK, Chen Z, Wu Y, et al. (2010). Global methylation pattern of genes in androgen sensitive and androgen independent prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 9, 33–45.
- Takayama K. (2019). Splicing factors have an essential role in prostate cancer progression and androgen receptor signaling. *Biomolecules* 9, 7–8.
- Yu, G, Lee, Y-C, Cheng, C-J, et al. (2015). RSK promotes prostate cancer progression in bone through ING3, CKAP2, and PTK6-mediated cell survival. *Mol Cancer Res MCR* 13, 348348at.

Address correspondence to:
Dominique Bernard-Gallon, PhD
Department of Oncogenetics
Centre Jean Perrin, CBRV
INSERM U1240
28 Place Henri Dunant
Clermont-Ferrand 63001
France

E-mail: dominique.gallon-bernard@clermont.unicancer.fr

Abbreviations Used

- AR = androgen receptor
ChIP = chromatin immunoprecipitation
GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSK-J4 = ethyl 3-((6-(4,5-dihydro-1H-benzof[d]iazepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl) amino)propanoate
H3K27me3 = histone 3 lysine 27 trimethylated
IC₅₀ = half maximal inhibitory concentration
JMJD3 = Jumonji domain-containing protein 3
MAPK = mitogen-activated protein kinase 6
MGMT = O-methylguanine-DNA methyltransferase
RPS6KA2 = ribosomal protein S6 kinase A2
RT-qPCR = reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
SD = standard deviation
siRNA = small interfering RNA
TRA2A = transformer 2 alpha homolog
U2AF1 = 2 small nuclear RNA auxiliary factor 1

Conclusion de la publication 3

Ces travaux ont montré une augmentation de l'enrichissement de la marque sur les gènes d'intérêt après l'inhibition de JMJD3 par le GSK-J4. Parallèlement, l'inhibition par le GSK-J4 et siJMJD3 a entraîné une diminution de l'expression des gènes sauf pour le gène *MGMT* dans la lignée cellulaire LNCaP après traitement par le GSK-J4 (**Tableau 6**).

Cette analyse transcriptomique confirme l'effet répressif de la marque H3K27me3 et le rôle de JMJD3 dans la régulation des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* dans le cancer de la prostate.

Toutefois, le statut aux androgènes semble influencer l'accumulation de JMJD3 sur les gènes d'intérêt puisqu'on a systématiquement noté une accumulation de JMJD3 plus importante dans les cellules RA+ après traitement chimique alors que les cellules RA- ne montraient pas de variation de son accumulation après traitement.

Lignées cellulaires Gènes	DU-145		PC-3		LNCaP	
	Traitements siJMJD3	GSK-J4	siJMJD3	GSK-J4	siJMJD3	GSK-J4
<i>JMJD3</i>	_*	-	_**	-	-	-
<i>MGMT</i>	-	-	-	-	-	+
<i>TRA2A</i>	-	_*	-	-	-	_*
<i>U2AF1</i>	-	-	_*	-	-	-
<i>RPS6KA2</i>	-	-	_*	-	-	-

Tableau 6 : Récapitulatif de l'effet des traitements GSK-J4 et siJMJD3 sur l'expression des gènes d'intérêt *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* dans les différentes lignées continues de cellules cancéreuses de la prostate PC-3, DU-145 et LNCaP.

*Significativité ; + Surexpression ; - Sous-expression ; =+ Tendance à l'augmentation ; =- Tendance à la diminution. Les cases sont rouges lorsqu'il y a un effet inverse entre les deux types de traitement.

c. *Étude d'une autre déméthylase, UTX, impliquée dans la régulation de H3K27me3*

Présentation de la publication 4

OMICS A Journal of Integrative Biology
Volume 25, Number 0, 2021
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/omi.2020.0183

Letter to the Editor

Role of UTX Histone Demethylase in Regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2* Genes in Prostate Cancer Cell Lines

Houfah Khoufah, F.Z.; **Sanchez, A.**; Idrissou, M.; Boisnier, T.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. OMICS 2021, 25, 129–131.

Il existe très peu de données de littérature examinant le rôle d'UTX dans le cancer de la prostate, pourtant il y a de grandes chances que la déméthylase joue un rôle clé dans la cancérogénèse prostatique. En effet, il a déjà été démontré dans le laboratoire qu'il existe un enrichissement fort de H3K27me3 chez les patients atteints de cancer de la prostate par rapport aux patients sains avec une corrélation entre l'enrichissement de la marque et l'agressivité du cancer. UTX est un des acteurs de la voie de déméthylation de l'histone 3 sur sa lysine 27 mais son rôle sur la régulation de ces gènes n'a jamais étudié. Nous avons cherché à évaluer l'effet de son inhibition par le GSK-J4 et par des siARNs dirigés spécifiquement contre UTX sur l'expression des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* et leur enrichissement en H3K27me3.

Role of UTX Histone Demethylase in Regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2* Genes in Prostate Cancer Cell Lines

AU2 ▶ AU1 ▶ Fatma Zohra Houfai Khoufai,^{1,2} Anna Sanchez,^{1,2} Mouhamed Idrissou,^{1,2} Tiphanie Boisnier,^{1,2} Frédérique Penault-Llorca,^{2,3} Yves-Jean Bignon,^{1,2} Laurent Guy,^{2,4} and Dominique Bernard-Gallon^{1,2}

To the Editor:

AU3 ▶ **P**ROSTATE CANCER IS THE SECOND most common cancer in men in the world (Bray et al., 2018). This cancer has several risk factors and in particular, genetic and epigenetic determinants. Prostate cancer epigenetics is a field of intensive research (Morozov et al., 2017). A recent study (Ngollo et al., 2017) on prostate biopsies showed a histone 3 lysine 27 tri-methylated (H3K27me3) enrichment on the promoter of O-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*), transformer 2 alpha homolog (*TRA2A*), 2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 (*U2AF1*), and ribosomal protein S6 kinase A2 (*RPS6KA2*) genes. The marker H3K27me3 is deposited by the methyltransferase EZH2 and removed by the demethylases ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat on chromosome X (UTX) and jumonji domain-containing protein 3 (JMJD3). The four genes identified as a putative biosignature for prostate cancer have key roles in different cellular pathways such as DNA damage repair, mRNA splicing, or the mitogen-activated

protein kinase 6 (MAPK) pathway, and are considered to be tumor suppressor. These promoter genes showed also a colocalization of the histone methyltransferase EZH2 and demethylase JMJD3 in a ChIP-qPCR analysis. In the same study, a modulation of the transcriptional expression of these four genes was carried out by chemical treatments ethyl 3-((6-(4,5-dihydro-1H-benzof[4,5-d]azepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate (GSK-J4) and DZNeP (respective chemical inhibitors of JMJD3/UTX and EZH2) in three prostate cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU-145) (Daures et al., 2018).

We report in this study new evidence on the involvement of the histone demethylase UTX in regulation of the *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2* genes in the three prostate cancer cell lines LNCaP, PC3, and DU-145. We studied the impact of the inhibition of UTX on the regulation of these four genes.

Two types of inhibition were carried out: an inhibition by anti-UTX small interfering RNA (siRNA) treatment by

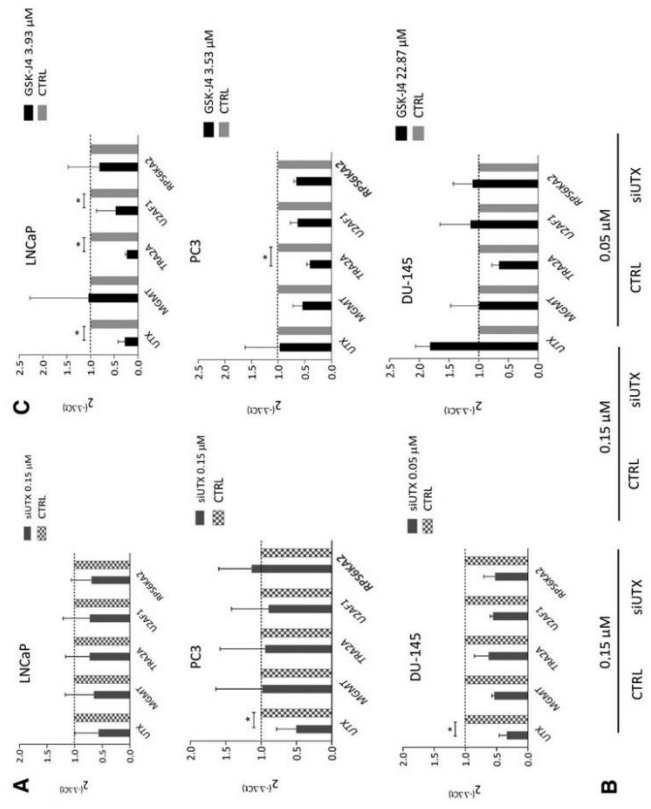
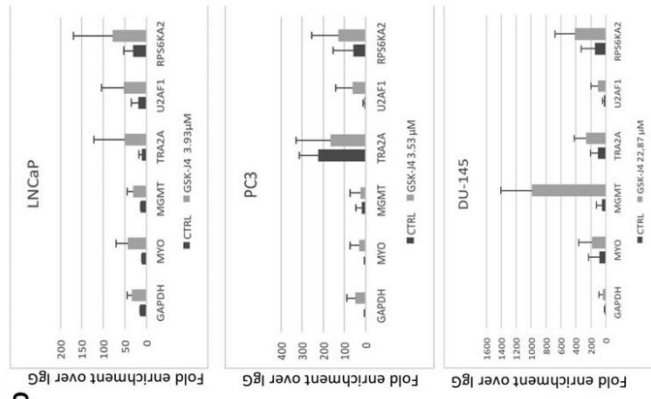
FIG. 1. Effects of UTX inhibition on gene expression and H3K27me3 enrichment in prostate cancer cell lines. (A) mRNA level analysis of UTX and the targeted genes in cell lines transfected with siUTX (sc_76881; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) were determined by RTqPCR using the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Values shown are the average (means \pm SD) from three samples and normalized to control without treatment. (B) Western blot analysis of UTX inhibition by siRNA using antihuman UTX polyclonal rabbit antibody (ab36938; Abcam) 1:500 dilution and anti-GAPDH monoclonal mouse antibody (sc_47724; Santa Cruz Biotechnology) as positive control at 1:1000 dilution. Secondary antimouse IgG, AP conjugate or secondary antirabbit IgG (S3731; Promega), AP conjugate were used at 1:2000 dilution. LNCaP and PC3 cells were treated with 0.15 μ M siUTX and DU-145 cell line was treated with 0.05 μ M siUTX. (C) mRNA level analysis of UTX and the targeted genes in the prostate cell lines treated with GSK-J4 were determined by RTqPCR using the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Values shown are the (means \pm SD) from three samples and normalized to control without treatment. (D) ChIP-qPCR analysis of H3K27me3 enrichment on control genes (*Myoglobin*, *GAPDH*) and targeted genes (*MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2*) in LNCaP, PC3, and DU-145 cell lines treated by GSK-J4 (gray bars) or untreated cells (black bars). ChIP was performed using antihuman H3K27me3 polyclonal rabbit antibody (No. C15410039, Diagenode) and the negative control rabbit IgG (No. C15410206, Diagenode). The results were presented by fold enrichment over IgG. Values shown are the (means \pm SD) of three measures. Data were analyzed by ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. ANOVA, analysis of variance; ChIP, chromatin immunoprecipitation; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GSK-J4, ethyl 3-((6-(4,5-dihydro-1H-benzof[4,5-d]azepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate; H3K27me3, histone 3 lysine 27 tri-methylated; *MGMT*, O-methylguanine-DNA methyltransferase; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; *RPS6KA2*, ribosomal protein S6 kinase A2; SD, standard deviation; siRNA, small interfering RNA; *TRA2A*, transformer 2 alpha homolog; *U2AF1*, 2 small nuclear RNA auxiliary factor 1; UTX, ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat on chromosome X.

¹Department of Oncogenetics, Centre Jean Perrin, CBRV, Clermont-Ferrand, France.

²INSERM—UMR 1240—Molecular Imaging and Theranostic Strategies (IMOST), Clermont-Ferrand, France.

³Department of Biopathology, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France.

⁴Department of Urology, Gabriel Montpied Hospital, Clermont-Ferrand, France.



LETTER TO THE EDITOR

3

transfection of cells with interfering RNAs (siRNAs), and an inhibition by chemical treatment GSK-J4. After inhibition of UTX by siRNA and by GSK-J4 treatment, we performed reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) to determine the expression of targeted genes. Inhibition by siRNA was validated by Western blot and the analysis of the enrichment of the targeted genes for H3K27me3 by immunoprecipitation of chromatin was followed by a qPCR (ChIP-qPCR).

The results in the LNCaP and PC3 cell lines show an effect of the siRNA UTX treatment at 0.15 μ M. For the DU-145 cell line, the treatment was effective at the 0.05 μ M (Fig. 1A). The Western blot shows a decrease in the accumulation of UTX protein for the samples treated with the 0.15 μ M dose for the cell lines LNCaP and PC3 and with the dose 0.05 μ M for the DU-145 cell line compared with their respective controls (untreated) as well as to the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) positive control (Fig. 1B).

The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of the four genes is less than one for LNCaP and DU-145 cells. For the latter, there is an underexpression of these genes upon inhibition of UTX by siRNA. For the PC3 cell line, the results show a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of about one for all four genes. Already found to be overexpressed in a context of prostate cancer (Daures et al., 2016) are the *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2* genes that have shown a low level of expression after the inhibition of histone demethylase UTX by siRNA in prostate tumor cells lines.

Within the cell lines treated with GSK-J4, we observed a decrease in the level of all the genes expression for LNCaP. Likewise, within the PC3 cell line, overall, the level of expression decreases for the genes studied (Fig. 1C). Whereas for the DU-145 cell line, the level of expression of each gene tends to increase (>1) except for *TRA2A* (<1). The decrease in the expression of the genes of interest after GSK-J4 treatment clearly shows the involvement of histone demethylase activity in their regulation. The analysis of H3K27me3 (Fig. 1D) showed an increase in H3K27me3 on the *Myoglobin* and *GAPDH* control genes after treatment with GSK-J4 for the three cell lines. The enrichment of the marker on the four targeted genes also tended to increase in the treated cell lines.

In conclusion, these observations suggest that GSK-J4 inhibits the activity of the demethylase UTX leading to an increase in the enrichment of H3K27me3 on genes. This study confirms the involvement of UTX and/or its demethylase activity in the regulation of the *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2* genes in prostate cancer, the main hypothesis of this study. These genes involved both in several cellular mechanisms and in prostate cancer could serve as potential biomarkers of prostate cancer prognosis. In addition, histone demethylase UTX could be a new therapeutic target. In the future, the effect of UTX inhibition on *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, and *RPS6KA2* can be studied *in vivo* to assess its impact on tumor growth as well.

Author Disclosure Statement


The authors declare they have no conflicting financial interests.

Funding Information

This study was supported by the French Ligue Régionale Contre Le Cancer—Comité du Puy-de-Dôme—and the ARTP (Association pour la Recherche sur les tumeurs de la Prostate).

References

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424.
- Daures M, Idrissou M, Judes G, et al. (2018). A new metabolic gene signature in prostate cancer regulated by JMJD3 and EZH2. *Oncotarget* 9, 23413–23425.
- Daures M, Ngollo M, Judes G, et al. (2016). The JMJD3 histone demethylase and the EZH2 histone methyltransferase in prostate cancer. *OMICS* 20, 123–125.
- Morozov VM, Li Y, Clowers MM, and Ishov AM. (2017). Inhibitor of H3K27 demethylase JMJD3/UTX GSK-J4 is a potential therapeutic option for castration resistant prostate cancer. *Oncotarget* 8, 62131–62142.
- Ngollo M, Lebert A, Daures M, et al. (2017). Global analysis of H3K27me3 as an epigenetic marker in prostate cancer progression. *BMC Cancer* 17, 261.

Address correspondence to  AU4
Dominique Bernard-Gallon, PhD
Department of Oncogenetics
CBRV Centre Jean Perrin
INSERM U 1240
28 Place Henri Dunant
Clermont-Ferrand 63001
France

E-mail: dominique.gallon-bernard@clermont.unicancer.fr

Abbreviations Used

ChIP	= chromatin immunoprecipitation
GSK-J4	= ethyl 3-((6-(4,5-dihydro-1H-benzodiazepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate
JMJD3	= jumonji domain-containing protein 3
GAPDH	= glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H3K27me3	= histone 3 lysine 27 tri-methylated
MAPK	= mitogen-activated protein kinase 6
MGMT	= O-methylguanine-DNA methyltransferase
RT-qPCR	= reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
RPS6KA2	= ribosomal protein S6 kinase A2
siRNA	= small interfering RNA
TRA2A	= transformer 2 alpha homolog
U2AF1	= 2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
UTX	= ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat on chromosome X

Conclusion de la publication 4

Cette lettre à l'éditeur a permis d'éclaircir le rôle d'UTX sur la régulation des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2*. En effet, l'inhibition par siUTX dans la lignée cellulaire LNCaP et DU-145 a entraîné une diminution de l'expression de l'ensemble des quatre gènes d'intérêt. Parallèlement, l'analyse de l'enrichissement de ces mêmes gènes par ChIP-qPCR a montré une augmentation de la marque H3K27me3 au niveau de leur promoteur. Ensembles, ces résultats prouvent qu'UTX est impliquée dans la régulation de ces gènes dans la lignée LNCaP (RA+) et DU-145 (RA-). Toutefois, l'inhibition par siUTX dans la lignée PC-3 n'a pas montré de différence dans l'activité des gènes par rapport aux contrôles ce qui suggère qu'UTX n'est pas impliquée dans la régulation de ces gènes dans cette lignée cellulaire.

Ces résultats montrent l'implication d'UTX dans la régulation de cette signature génique du cancer de la prostate, toutefois, cette régulation reste dépendante du type cellulaire.

2. Mise en évidence d'un possible lien entre JMJD3 et le récepteur aux androgènes – Approche *in vivo*

Présentation de la publication 5

CANCER GENOMICS & PROTEOMICS 19: 339-349 (2022)
doi:10.21873/cgp.20324

Effects of GSK-J4 on JMJD3 Histone Demethylase in Mouse Prostate Cancer Xenografts

Sanchez, A.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. Cancer Genomics Proteomics **2022**, 19, 339–349, doi:10.21873/cgp.20324.

Après ces premières approches *in vitro*, nous avons voulu nous focaliser sur le rôle de JMJD3. Nous avons examiné l'effet de l'inhibition de JMJD3 *in vitro* sur le panel de gènes d'intérêt et nous avons voulu déterminer si ces effets étaient les mêmes dans une expérience *in vivo*. Cette expérience a été réalisée sur des souris mâles immunodéprimées porteuses de xénogreffes issues des lignées de cellules PC-3, DU-145 et LNCaP exprimant la luciférase. Les souris étaient traitées par le GSK-J4 quotidiennement pendant 10 jours consécutifs au début du protocole. Nous avons premièrement regardé l'effet de l'inhibition de JMJD3 par le GSK-J4 sur la croissance tumorale en évaluant le volume des xénogreffes par pied à coulisse et par bioluminescence au cours du temps. Puis nous avons prélevé les xénogreffes en fin de protocole afin d'étudier l'enrichissement des gènes en H3K27me3 et l'expression des gènes d'intérêt *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* et de gènes impliqués dans la tumorigénèse entre les souris contrôles et les souris traitées.

Effects of GSK-J4 on JMJD3 Histone Demethylase in Mouse Prostate Cancer Xenografts

ANNA SANCHEZ^{1,2}, FRÉDÉRIQUE PENAULT-LLORCA^{2,3}, YVES-JEAN BIGNON^{1,2},
LAURENT GUY^{2,4} and DOMINIQUE BERNARD-GALLON^{1,2}

¹Department of Oncogenetics, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France;

²INSERM U 1240 Molecular Imagery and Theranostic Strategies (IMoST), Clermont-Ferrand, France;

³Department of Biopathology, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France;

⁴Department of Urology, Gabriel Montpied Hospital, Clermont-Ferrand, France

Abstract. *Background/Aim:* Histone methylation status is required to control gene expression. H3K27me3 is an epigenetic tri-methylation modification to histone H3 controlled by the demethylase JMJD3. JMJD3 is dysregulated in a wide range of cancers and has been shown to control the expression of a specific growth-modulatory gene signature, making it an interesting candidate to better understand prostate tumor progression in vivo. This study aimed to identify the impact of JMJD3 inhibition by its inhibitor, GSK4, on prostate tumor growth in vivo. *Materials and Methods:* Prostate cancer cell lines were implanted into Balb/c nude male mice. The effects of the selective JMJD3 inhibitor GSK-J4 on tumor growth were analyzed by bioluminescence assays and H3K27me3-regulated changes in gene expression were analyzed by ChIP-qPCR and RT-qPCR. *Results:* JMJD3 inhibition contributed to an increase in tumor growth in androgen-independent (AR-) xenografts and a decrease in androgen-dependent (AR+). GSK-J4 treatment modulated H3K27me3 enrichment on the gene panel in DU-145-luc xenografts while it had little effect on PC3-luc and no effect on LNCaP-luc. Effects of JMJD3 inhibition affected the panel gene expression. *Conclusion:* JMJD3 has a differential effect in prostate tumor progression according to AR status. Our results suggest that JMJD3 is able to play a

role independently of its demethylase function in androgen-independent prostate cancer. The effects of GSK-J4 on AR+ prostate xenografts led to a decrease in tumor growth.

Prostate cancer (PC) is a heterogeneous disease depending on the aggressiveness of the cancer. Annual incidence and mortality in 2020 were 1,414,259 cases and 375,304 deaths. It is the second most common cancer after lung cancer and the fourth most deadly among men (1).

PC is a multifactorial disease with risk factors that can be extrinsic or intrinsic [National Cancer Institute, Bethesda in Maryland (MD)]. An increasing number of studies highlight the link between epigenetics and tumor initiation and progression. Epigenetic processes can be defined as the modification of gene expression without changes in DNA sequence and are involved in a large number of cellular events such as cell division, differentiation, cell survival (2-4). Epigenetic modulation can be achieved through chromatin compaction by activation or inhibition of gene expression (5). The deregulation of these mechanisms can lead to the transformation of healthy cells into cancerous cells. Our study focuses on one type of epigenetic modification: post-translational modification (PTM) of histones and more specifically the tri-methylation of histone 3 at lysine 27 (H3K27me3), a repressive epigenetic mark (6). H3K27 methylation is regulated by Enhancer Zeste Homolog 2 methyltransferase (EZH2) (7-9) and jumoni domain-containing protein 3 demethylase (JMJD3), also called KDM6B, which is able to remove the di-tri methylation of H3K27 (10).

The ability of JMJD3 to demethylate H3K27me3 confers a role in activating transcription (11). JMJD3 acts in many biological processes such as neuronal differentiation (12), immunity (13), inflammation (14-16), hematopoiesis (17, 18), osteogenesis (19-23) and embryonic development (24, 25). Moreover, JMJD3 has a role in chromatin remodeling (26, 27) and in cell reprogramming (28) independently of its demethylase activity. JMJD3 is often over or under expressed in a large variety of cancers including, but no limited to

Correspondence to: Dominique Bernard-Gallon, Ph.D., Department of Oncogenetics, Centre Jean Perrin, IMoST, 28 place Henri-Dunant, 63001, Clermont-Ferrand, France. Tel: +33 473178358, e-mail: dominique.gallon-bernard@clermont.unicancer.fr

Key Words: Prostate cancer, epigenetics, JMJD3, H3K27me3, epidrugs, GSK-J4, xenografts, AR status.



This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC-ND) 4.0 international license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

nervous system, prostate, blood, colorectal, breast, lung, liver, ovarian, gastric cancers. This makes the demethylase difficult to classify as a tumor suppressor or oncoprotein (29).

JMJD3 and EZH2 have been previously shown to be overexpressed in PC (30, 31). JMJD3 expression was dependent on the aggressiveness of the cancer, as indicated by an increased Gleason score (32-34). A previous study by Daures *et al.* identified a gene signature on prostate biopsies, impacted by JMJD3 and EZH2, comprised of; O-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*), transformer 2 alpha homolog (*TRA2A*), 2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 (*U2AF1*) and ribosomal protein S6 kinase A2 (*RPS6KA2*). These genes are involved in DNA damage repair, mRNA splicing and cell differentiation (34). Furthermore, a link between the androgen receptor (AR), EZH2 (35) and JMJD3 demethylase activity was demonstrated: androgen status resulted in differential accumulation of JMJD3 at candidate genes between AR+ and AR- cells (36) and this was reflected at the transcriptional level (32). JMJD3 is therefore an interesting candidate to study for a better understanding of prostate tumor progression.

Novel therapeutic strategies that target epigenetic regulatory factors, such as JMJD3, offer promising new therapeutic potential to treat aggressive prostate cancer. An increasing number of molecules inhibiting JMJD3 are currently being developed, but ethyl 3-((6-(4,5-dihydro-1H-benzo[d]azepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate (GSK-J4) remains the most studied in basic research. This molecule inhibits demethylase by binding to the active site in a competitive manner with α -ketoglutarate (15).

In this study, we analyzed JMJD3 involvement in tumor progression *in vivo* after pharmacological inhibition of JMJD3 using GSK-J4. JMJD3 being a demethylase of chromatin-bound histone 3 trimethylation, analysis of candidate gene expression as well as enrichment of these genes for trimethylation on histone 3 was performed on the collected xenografts. The study revealed that JMJD3 has a role in tumor progression and supports the hypothetical link between JMJD3 and AR. Furthermore, we identified a differential effect of the inhibitor depending on the xenograft hormonal status.

Materials and Methods

Cell culture conditions. PC3-luc (PerkinElmer, Beaconsfield, UK) and DU-145-luc (JCRB Cell Bank) cells were grown in EMEM medium (ATCC, VA, USA) and LNCaP-luc (PerkinElmer, Beaconsfield, UK) were grown in RPMI 1640 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). All cells were grown at 37°C and 5% CO₂ in a supplemented medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1% L-glutamine and 0.1% of gentamicin (Panpharma, Luitré, France) (DU-145-luc and LNCaP-luc) and 0.1% of puromycin (InvivoGen, Toulouse, France) (PC3-luc). All cells express firefly luciferase for *in vivo* bioluminescence imaging.

Table I. *Origins, AR, PTEN and luciferase status of the cell lines (PC-3, DU-145, LNCaP) used to create xenografts.*

Cell lines	Origins	AR status	PTEN status	Luciferase
PC-3	Bone metastasis	-	-	+
DU-145	Brain metastasis	-	+	+
LNCaP	Lymph node metastasis	+	-	+

Table I summarizes origins, AR, Phosphatase and tension homolog (PTEN) and Luciferase status of the cell lines (PC-3, DU-145, LNCaP) used to create xenografts.

Xenografts studies. Five-week-old male athymic mice (nu/nu genotype, BALB/c background) were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed under aseptic conditions. All protocols in this study were approved by the Ethics Committee (No. 2018122116517595). Mice were anesthetized by isoflurane and 3x10⁶ cells (PC3-luc and DU-145-luc), 10x10⁶ (LNCaP-luc) in 100 μ l of cell culture media resuspended in 100 μ l of matrigel (354248, Corning, NY, USA) were injected subcutaneously into the right flank of mice. To test the effects of JMJD3 inhibition by GSK-J4, mice were randomly assigned to vehicle (DMSO) and GSKJ4 treatment groups. The treatment began one day after cell injection and 50 mg/kg of GSK-J4 were administered by intraperitoneal injection every day for 10 consecutive days. Tumor growth and response to therapy were determined once a week by caliper measurement and twice a week by bioluminescent imaging. For imaging, mice were anesthetized with isoflurane and examined for tumor bioluminescence 10 min following intraperitoneal injection of XenoLight D-Luciferin, Potassium Salt at 150 mg/kg (122799, PerkinElmer, Beaconsfield, UK). Signal intensities were quantified within regions of interest, as defined by the Living Image software. Mice were sacrificed at 31, 50 and 65 days post inoculation respectively for the PC3-luc, LNCaP-luc and DU-145-luc cell lines. The protocol was ended upon reaching endpoints determined by the ethics committee. Tumors were collected and were preserved in liquid nitrogen. Tumor volumes (mm³) were measured with caliper and calculated using the formula $V=L \times L \times S/2$ where L and S are the largest and smallest diameters in millimeters. After collection, tumors were also weighed with a precision balance.

RT-qPCR. Total RNA was extracted from tumor according to the manufacturer's instruction (Macherey Nagel, Hoerd, France). The purity of RNA was determined using the NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massy, France). RNase-free DNase treatment, (1 U/ μ l) (Thermo Scientific) was performed for 1 μ g of total RNA was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, CA, USA). Incubation was at 25°C for 10 min, reverse transcription was at 37°C for 120 min, and inactivation was at 85°C for 5 min.

All genes and control genes studied were amplified in triplicate using TaqMan Gene Expression PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). qPCR was performed on plates designed by Applied Biosystems (TaqMan[®] Array 96 well Fast Plate, Custom format 16) using ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

Table II. Gene list and assay ID for TaqMan – RT-qPCR assay.

Gene symbol(s)	Gene name(s)	Assay ID
18s	–	Hs99999901_s1
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	Hs01037698_m1
TRA2A	transformer 2 alpha homolog	Hs01110203_m1
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 5;U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1	Hs00733884_m1
RPS6KA2	ribosomal protein S6 kinase A2	Hs00179731_m1
PTEN	phosphatase and tensin homolog	Hs02621230_s1
KDM6B	lysine demethylase 6B	Hs00996325_g1
TP53	tumor protein p53	Hs01034249_m1
CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1A	Hs00355782_m1
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	Hs00178289_m1
AR	androgen receptor	Hs00171172_m1
NFKB1	nuclear factor kappa B subunit 1	Hs00765730_m1
EZH2	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	Hs00544830_m1
HIF1A	hypoxia inducible factor 1 alpha subunit	Hs00153153_m1
ACTB	actin beta	Hs99999903_m1

Table III. Primers and probes used for ChIP-qPCR assay.

Gene symbol(s)	Sequence primers	MGB probes
MGMT	F: AAAGGTACGGGCCATTGG R: GGCGCCTCCACAGTT	TAAGGCACAGAGCCTC
TRA2A	F: CTTCTGTAAGTATGTTCTTGATATGGA R: GCCCAGTTTGCTGGTTGTAATA	CTTTGAATGGTGCCAATG
U2AF1	F: GAGCATGTCGTCATGGAGACA R: GGTCTGGCTAAACGTCGGGTTT	TGCTCTCGGTTGCACAA
RPS6KA2	F: GGAGATAGACATCAGCCATCATGT R: AGCTCAAACCTGGGAAGGATCTG	AAGGAGGGCTTTGAGAAG

Data were collected after 50°C during 2 min, 95°C for 10 min, 95°C for 15 s and 60°C for 1 min and the two latest steps were repeated in 40 cycles. The analysis was conducted on 13 genes (Table II). Genes were considered significantly expressed and their transcript measurable if their corresponding cycle threshold (CT) value was less than 35. The relative quantification method 2^{-ΔΔCT} was used to calculate the relative gene expression. Paired *t*-tests were used to compare gene expression levels. Control of the false discovery rate due to multiple testing was done according to the Holm-Sidak method.

Chromatin extraction and sonication. A total of 30-40 mg of xenografts were disrupted with gentleMACS Dissociator (Miltenyie Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) in cold PBS/PIC (Protease Inhibitor Cocktail) (Diagenode, Seraing, Belgium). Protein-DNA binding was done using 1% formaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 8 min at room temperature. Cross-linking was stopped with 0.125 M glycine for 5 min at room temperature followed by two washes (5 min, 900 g). The cell lysis step was performed according to the manufacturer's instructions (iDeal ChIP-seq Kit for Histones, Diagenode, Seraing, Belgium). Samples were next sonicated in shearing buffer+PIC in Bioruptor™ sonicator (Diagenode) for 10 min (10 cycles, 30 s ON/30 s OFF) at 4°C. Lysates were clarified by centrifugation (10 min at 14,000 g, 4°C), and supernatants were transferred to new tubes.

Chromatin immunoprecipitation assay. ChIP was performed using an iDeal ChIP-seq Kit for Histones (Diagenode) according to the manufacturer's protocol on an SX-8G IP-Star® Compact Automated System (Diagenode). ChIP used 200 µL of sonicated chromatin and 3 µg of antibodies: anti-H3K27me3 (#C15410069, Diagenode) and anti-IgG for negative control (#C15410206, Diagenode). Antibody coating reaction with protein A-coated magnetic beads lasted 3 h, and the immunoprecipitation reaction 13 h at 4°C. Reverse cross-linking was carried out for 4 h at 65°C with 5 M NaCl. Immunoprecipitated DNA (IP) and total DNA (input) were purified by MicroChIP DiaPure columns (#C03040001, Diagenode) according to the manufacturer's instructions, and analyzed by real-time PCR.

qPCR. DNA (5 µl) was analyzed by qPCR (ABI PRISM 7900HT, Applied Biosystems) in triplicate in a 25 µl reaction volume containing TaqMan Gene Expression PCR Master Mix (Applied Biosystems) with the forward and reverse primers (400 nM) and probes (250 nM) (Table III): *MGMT*, *RPS6KA2*, *TRA2A*, *U2AF1*. To calculate the relative amount of immunoprecipitated DNA compared to the INPUT DNA, the formula used was:

$$\%recovery = 2^{[(Ct_{input} - \log_2(X\%)) - Ct_{sample}]} \times 100\%$$

Where: log₂(x) accounts for the INPUT dilution.

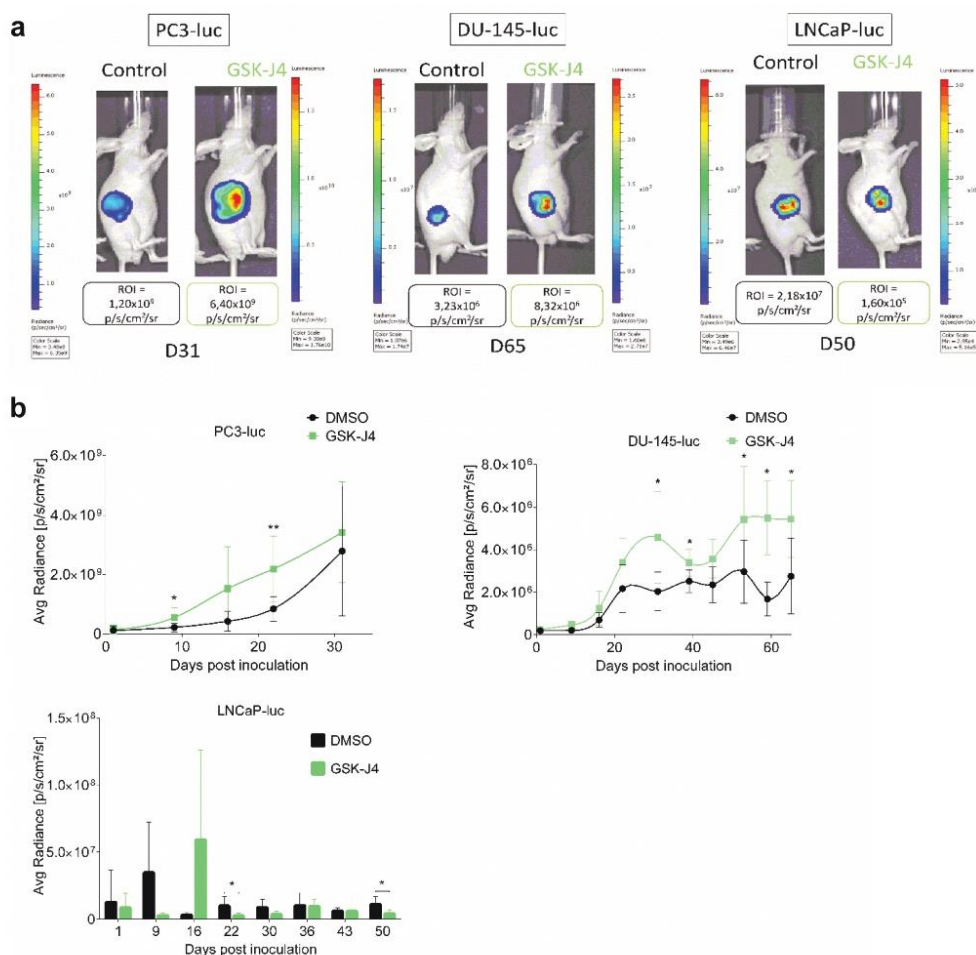


Figure 1. Continued

Ethical disclosure. For *in vivo* xenograft models, the authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval (APAFIS#18214-2018122116517595 V2).

Results

Effects of JMJD3 inhibition differed depending on xenograft type. To determine the role of JMJD3 in PC tumor growth, 5-week-old male athymic mice (nu/nu genotype, BALB/c background) were subcutaneously implanted with PC3-luc,

DU-145-luc and LNCaP-luc cells to form xenografts and were treated with JMJD3 inhibitor (GSK-J4). The treatment began one day after cell injection and 50 mg of GSK-J4 were administered intraperitoneally every day for 10 consecutive days. As can be seen in Figure 1a, GSK-J4 treatment induced higher xenograft growth over time for AR- cells (PC3-luc and DU-145-luc) compared to controls. The growth is reflected by the bioluminescence intensity of the xenografts. Treated AR+ xenografts (LNCaP-luc) grew less rapidly than control xenografts during the 10 days of treatment. A strong rebound

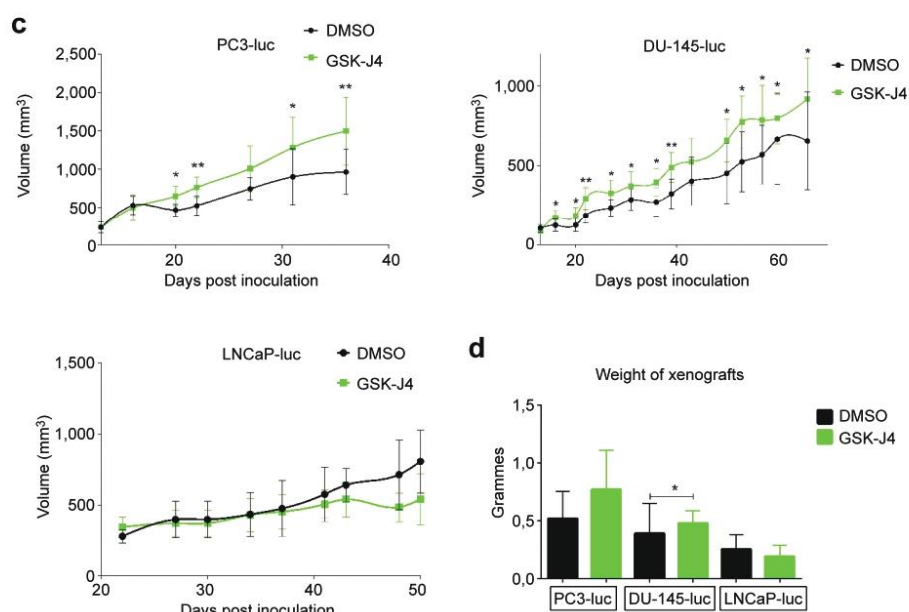


Figure 1. Effects of GSK-J4 treatment on tumor growth in vivo. (a) Images of measuring bioluminescence intensity of the region of interest (ROI) in p/sec/cm²/sr of PC3-luc, DU-145-luc and LNCaP-luc xenografts on the last day of the protocol (days 31, 65, 50 respectively). (b) Measurement of tumor growth by bioluminescence, tumor volume (c) and tumor weight (d) after inoculation of PC3-luc, DU-145-luc and LNCaP-luc cells in male balb/c nude mice controls or treated with GSK-J4. PC3-luc xenografts n=9, DU-145-luc xenografts n=8 and LNCaP-luc xenografts n=5. Data are expressed as means for each group, and error bars indicate the 95% confidence interval of the mean value. Data were analyzed by paired=TRUE Student's t-test (*p<0.05; **p<0.01) for PC3-luc and DU-145-luc xenografts and data were analyzed by a non-parametric test, the Mann-Whitney test (p<0.05) for LNCaP-luc xenografts.

in bioluminescence was noted at D16 (week after the end of treatment) in treated mice and then as early as D22 and at D50, less bioluminescence was observed in treated mice compared to control mice. These results could be matched with the measurement of tumor volume over time (Figure 1b) for the AR- xenografts (PC3-luc and DU-145-luc). Indeed, it was noted that tumor volume was larger in the treated group compared to the control group. In contrast, the difference in bioluminescence of LNCaP-luc xenografts between the control and treated groups noted in Figure 1a does not reflect what was measured in volume (mm³) for the first 37 days in Figure 1b where no difference in volume was observed between the control and treated groups. In agreement with the bioluminescence results, the xenografts showed a difference in volume from D37 until the end of the protocol. Finally, the xenografts were weighed at the end of the protocol, after mice were sacrificed. Figure 1c shows that the treated PC3-luc and DU-145-luc xenografts were heavier than the control

xenografts. The treated LNCaP-luc xenografts were lighter than the control xenografts. The difference in tumor growth between the control and treated groups in the different categories of xenografts suggests that the treatment was successful and that JMJD3 and H3K27me3 are in part involved in PC tumor growth. The difference in results between AR- and AR+ xenografts suggests that AR status may also play a role, in association with JMJD3.

Three different profiles in H3K27me3 enrichment on *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, *RPS6KA2* genes. To ascertain the impact of JMJD3 inhibition on H3K27me3 enrichment on the candidate gene promoters identified *in vitro* (34), we performed ChIP-qPCR on collected xenografts. ChIP undertaken on treated PC3-luc xenografts (Figure 2a) showed that H3K27me3 was found more enriched in the promoter of the control genes (*Myoglobin* and *GAPDH*) compared to the control groups. In contrast, GSK-J4 treatment on these same xenografts had no

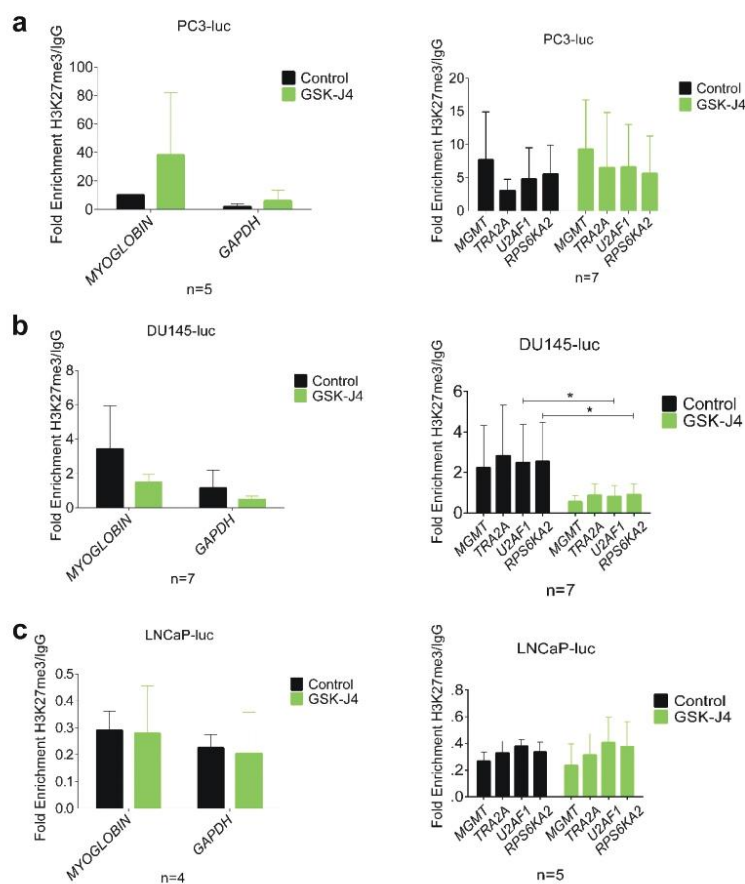


Figure 2. Effects of GSK-J4 treatment on enrichment of *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, *RPS6KA2* genes in vivo. (a) PC3-luc, (b) DU-145-luc and (c) LNCaP-luc xenografts treated with GSK-J4 (green bar) and untreated (black bar) were subjected to ChIP qPCR analysis of H3K27me3 enrichment on control genes (Myoglobin and GAPDH) and candidate genes (*MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, *RPS6KA2*). Results are represented as fold enrichment over IgG. Values=mean±SD and data were analyzed by unpaired non-parametric test, the Mann-Whitney t-test (*p<0.05).

effect on the enrichment of H3K27me3 in the promoters of the four candidate genes (*MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1*, *RPS6KA2*), even though there was a tendency to increase in the treated group. While JMJD3 demethylates H3K27me3, its inhibition by GSK-J4 in DU-145-luc xenografts (Figure 2b) showed an unexpected decrease of H3K27me3 on the promoters of the whole set of genes studied with a significant decrease for *U2AF1* and *RPS6KA2* genes in the treated group compared to the control group. Furthermore, GSK-J4 treatment on LNCaP-luc xenografts (Figure 2c) had no effect on H3K27me3 enrichment on the promoter of the genes since there was no

difference between the control group and the treated group. These results suggest that the hormonal and PTEN status of the different xenografts could influence the treatment and again highlight a definite role for AR in relation to the treatment outcomes of LNCaP-luc xenografts. Based on these results, it appears that GSK-J4 treatment modulated H3K27me3 enrichment on the gene panel in DU-145-luc while it had little effect on PC3-luc and no effect LNCaP-luc xenografts.

Inhibition of JMJD3 affects the expression of MGMT, TRA2A, U2AF1, RPS6KA2 and candidate oncogenes and oncosuppressors

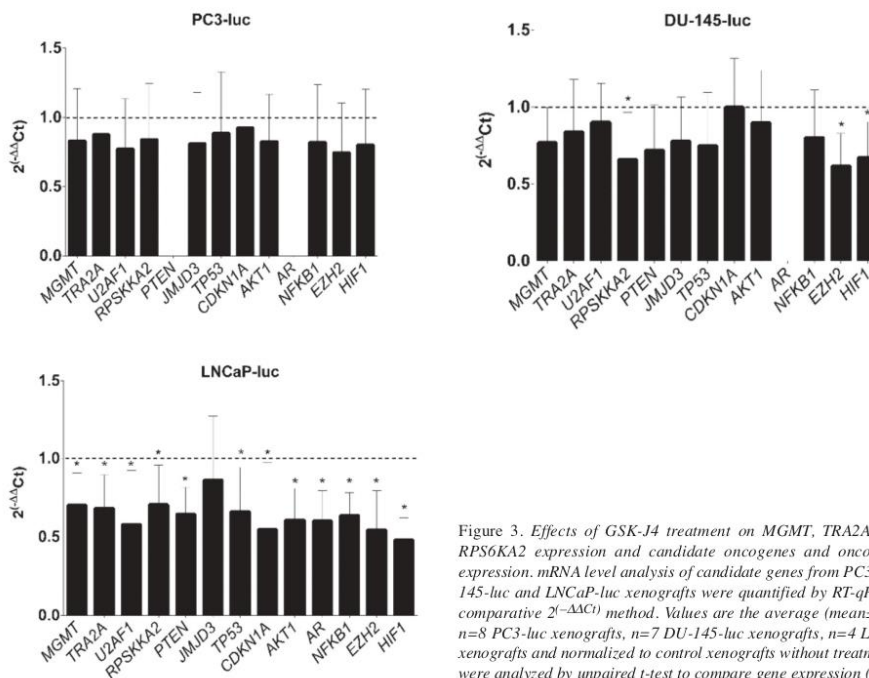


Figure 3. Effects of GSK-J4 treatment on MGMT, TRA2A, U2AF1, RPS6KA2 expression and candidate oncogenes and oncosuppressor expression. mRNA level analysis of candidate genes from PC3-luc, DU-145-luc and LNCaP-luc xenografts were quantified by RT-qPCR using comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Values are the average (mean \pm SD) from $n=8$ PC3-luc xenografts, $n=7$ DU-145-luc xenografts, $n=4$ LNCaP-luc xenografts and normalized to control xenografts without treatment. Data were analyzed by unpaired *t*-test to compare gene expression (* $p<0.05$).

in LNCaP xenografts. In order to better understand the reason of the difference in tumor growth between treated and untreated xenografts, MGMT, TRA2A, U2AF1, RPS6KA2, PTEN, JMJD3, TP53, CDKN1A, AKT1, AR, NFKB1, EZH2 and HIF1 expression analysis by RT-qPCR was conducted on PC3-luc, DU-145-luc and LNCaP-luc xenografts (Figure 3). These genes were selected after an extensive review of the literature on the roles of JMJD3 in different cancers. They have shown particular interest in other types of cancer. In agreement with gene expression profile of the different tumor types, no AR expression was found in AR- xenografts (PC-3-luc and DU-145-luc), nor PTEN expression in PC3-luc (PTEN^{-/-}) was discovered. In contrast, PTEN expression was notable in LNCaP xenografts due to the cells harboring one deleted allele and one mutated allele (37). A slight decrease in gene expression was observed in PC3-luc and DU-145-luc xenografts compared to controls with a significant decrease in RPS6KA2, EZH2, and HIF1 expression and no difference in CDKN1A expression for DU-145-luc xenografts. In AR+ xenografts (LNCaP-luc), a significant decrease in gene expression (except JMJD3) was demonstrated in the treated group compared to the control group.

Discussion

In this study, we demonstrated that JMJD3 and H3K27me3 have a role in prostate cancer progression. H3K27me3, whose demethylation is regulated by JMJD3, was found to be under- or over-expressed in a wide range of cancers (29). This study aims to identify the impact of JMJD3 inhibition by its inhibitor, GSK4, on prostate tumor growth *in vivo*. To evaluate this, we used three continuous prostate cancer lines representing different levels of aggressiveness: PC-3, DU-145 and LNCaP. These are defined as the three standard models for studying prostate cancer. The PC-3 cell line, isolated from bone metastases, is considered as the most aggressive of the three with high metastatic potential compared to the DU-145 and LNCaP cell lines that have moderate and low metastatic potential respectively. The DU-145 cell line was isolated from brain metastases and the LNCaP cell line from lymph node metastases. In contrast to the LNCaP cell line (AR+), the PC-3 and DU-145 cell lines are hormone insensitive (AR-) and do not exhibit AR at the transcriptional and protein level (38). The DU-145 cell line expresses PTEN heterozygously and exhibit a functional protein which is not the case for the LNCaP and PC-3 cell lines (37).

We first looked at *in vivo* the effect of JMJD3 inhibition by its chemical inhibitor, GSK-J4, on tumor growth. We demonstrated a difference in behavior between AR- and AR+ xenografts with more pronounced tumor growth for AR-treated xenografts and less for AR+ treated xenografts (Figure 1a-d). This was reflected by bioluminescence assays, tumor volume measurement and xenograft weight.

JMJD3 involvement in carcinogenesis remains unclear and the role of JMJD3 has been described in promoting cancer, but also as a tumor suppressor. A number of studies have used GSK-J4 to identify the roles of JMJD3 in carcinogenesis: In glioma, methylation maintenance by JMJD3 inhibition seems to be a new therapeutic strategy because it leads to increased survival and reduced tumor growth (39, 40). In neuroblastoma, GSK-J4 decreased tumor growth in *in vivo* xenograft models (41). The anti-proliferative effects of GSK-J4 were also demonstrated in acute myeloid leukemia *via* the protein kinase A (PKA) pathway by protein down-regulation of BCL2 and caspase 3 activation (42). In breast cancer, *in vivo*, chemical treatment has shown a decrease in tumor growth and particularly the suppression of self-renewal and expression of stemness related markers of breast cancer stem cells (43). In contrast, in colorectal cancer, JMJD3 was identified to be positively associated with patient survival. Its inhibition by GSK-J4 showed a reduction in chemokine expression (CXCL9 and CXCL10) involved in tumor immunity (44). These differences in the effect of JMJD3 inhibition on carcinogenesis suggest that the action of JMJD3 is tissue dependent. Finally, our study shows that even in cells from the same tissue, *i.e.*, the prostate, JMJD3 seems to have a different action depending on the properties of the cell lines studied.

The results we obtained seem to differ according to the hormonal status of the xenografts studied: AR- (PC3-luc and DU-145-luc) and AR+ (LNCaP-luc). A previous study in the laboratory had already shown that the androgen receptor status of PC-3, DU-145 (AR-) and LNCaP (AR+) cells generated opposite gene expression profiles (34). Increasingly, authors describe a demethylase action independent of their enzymatic activity, for example by interaction with transcription factors or protein, by preventing their degradation by the proteasome. This has been described in prostate cancer with KDM4B demethylase being part of the same jumonji domain-containing protein family as JMJD3. KDM4B activity is necessary to activate AR at the transcriptional level, and independently to its enzymatic activity by stabilizing AR to avoid its degradation by ubiquitination. Conversely, it has been shown that AR also regulates the activity of KDM4B. Moreover, after KDM4B inhibition by siRNA, authors demonstrated a decrease in proliferation in AR+ cell lines whereas there was no effect on AR- cell lines (45). This suggest that the effects on proliferation are mediated by AR function. This could explain the difference in cell growth after treatment between

AR+ and AR- xenografts and in gene expression (Figure 3). JMJD3 could be an AR co-activator and thus there would be a differential expression of candidate genes depending on the type of xenograft. It has already been shown, in breast cancer, that JMJD3 can interact with transcription factors such as estrogen receptor (ER α). After induction of ER α by estrogen, JMJD3 is co-recruited on the BCL2 anti-apoptotic gene promoter to induce an active transcriptional state according to a genomic pathway this time (46).

Then, to demonstrate the impact of JMJD3 inhibition on H3K27me3 enrichment on four candidate genes promoters identified *in vitro* (34), we performed ChIP-qPCR on collected xenografts. There was no difference in H3K27me3 enrichment on the promoter of all candidate genes after treatment in LNCaP-luc (AR+) xenografts (Figure 2), whereas a difference in the expression of the same candidate genes (Figure 3) as well as an effect of treatment on tumor growth (Figure 1) were demonstrated. H3K27me3 is therefore not involved in the modulation of gene expression in the LNCaP cell line. However, this suggests that JMJD3 inhibition in this xenograft model could allow mediation of androgen-induced transcription of target genes involved in tumorigenesis or that the genes whose expression is decreased following JMJD3 inhibitory treatment could come from another type of repressive expression modification. It would be interesting to use cells transfected with shJMJD3 to form xenografts. This would allow us to examine if the physical absence of JMJD3 could have another effect than inhibition of its demethylase activity.

Surprisingly, treatment with GSK-J4 resulted in overall decrease in H3K27me3 gene enrichment in DU-145-luc xenografts, an opposite effect to what was expected. This cell line differs from PC-3 and LNCaP by its *PTEN*+ status, which confers an ability to negatively regulate AKT that is not shared by the other two cell lines (37). *PTEN* is a known tumor suppressor (47), homozygous *PTEN* deletion in a prostate cancer model leads to an increase in progenitor/stem cells and thus to tumor initiation (48). Although the decrease in EZH2 expression in DU-145-luc treated xenografts (Figure 3) could explain in part the loss of H3K27me3 and perhaps there is a link between JMJD3 demethylase and *PTEN* that could explain these results. Two previous studies in monocytic cells and renal fibrosis have made comparable observations that support this hypothesis (49, 50). We noted an effect of JMJD3 inhibition on *PTEN* expression with a slight decrease, but there was no impact on *AKT* expression between control and treated mice (Figure 3). Moreover, Gong *et al.* found that *PTEN* C-terminal portion is able to maintain the heterochromatin status by interacting and stabilizing the HP1 α protein (51). There may be a dynamic interaction between HP1 protein stabilization and the repressive H3K27me3 mark. Some studies have found that the balance of H3K27me3 at the genome level can be impacted by other PTMs like DNA methylation or other

histone PTMs and it is well established that epigenetic modifications are complex and that there is permanent context- and cellular-dependent crosstalk between epigenetic marks (52, 53). In this light, this could explain that generally, treatment resulted in a small decrease in overall gene expression (except *CDKN1A*) while genes were weakly enriched in H3K27me3 in DU-145-luc xenografts.

Our results on gene expression after inhibition by GSK-J4 were consistent with those previously performed *in vitro* on the three cell lines. By contrast, the increase in H3K27me3 gene enrichment after treatment was evident *in vitro* (36) while disparities have been demonstrated *in vivo*. It is certain that the tumor microenvironment must be taken into consideration, the tumor stroma, the infiltrating immune cells, and the blood vessels surrounding the tumor lead to molecular events that do not exist *in vitro*. The NF- κ B pathway has a major role in tumor-associated chronic inflammation and HIF1 in the hypoxic environment. Activation of NF- κ B in infiltrating leukocytes leads to secretion of TNF- α among others. This initiates and drives the regulated expression of cytokine genes responsible for cell proliferation (54). The effects of treatment on gene expression in AR+ xenografts (Figure 3) showed decreased expression of *NF- κ B* as well as *HIF1*. The latter is widely implicated in tumor survival (55) and overexpressed in prostate cancer (56). These latter results, together with the decrease in *AKT* expression in treated AR+ xenografts, suggest that JMJD3 has a direct or indirect action on the expression of these genes and might contribute to the decrease in tumor growth in an AR+ prostate cancer model (Figure 1).

Conclusion

We identified a role for JMJD3 in prostate tumor progression in relation to the androgen receptor. There is a difference between AR+ and AR- xenografts in tumor growth after JMJD3 inhibition. The differential expression of the gene panel of H3K27me3 genes suggests that JMJD3 is able to play a role independently of its demethylase function in androgen-independent prostate cancer. Finally, the effects of GSK-J4 on AR+ prostate xenografts led to a decrease in tumor growth and could be used as an epidrug and a new therapeutic strategy.

Conflicts of Interest

There are no conflicts of interest to declare in relation to this study.

Authors' Contribution

Conceptualization, A.S., L.G. and D.B.-G.; validation, D.B.-G., L.G., Y.-J.B., and F.P.-L.; experiments, A.S.; resources were collected by A.S.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, A.S. and D.B.-G.; supervision, D.B.-G., L.G.,

Y.-J.B., and F.P.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank S.Besse for training us in the different techniques on mouse models. We also thank L.Quayle for editing the English version of the manuscript. This work was supported by the French Ligue Régionale Contre Le Cancer—Comité du Puy-de-Dôme—and the ARTP (Association pour la Recherche sur les tumeurs de la Prostate).

References

- 1 Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A and Bray F: Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*, 2021. PMID: 33818764. DOI: 10.1002/ijc.33588
- 2 Ballestar E and Esteller M: Epigenetic gene regulation in cancer. *Adv Genet* 61: 247-267, 2008. PMID: 18282509. DOI: 10.1016/S0065-2660(07)00009-0
- 3 Brait M and Sidransky D: Cancer epigenetics: above and beyond. *Toxicol Mech Methods* 21(4): 275-288, 2011. PMID: 21495866. DOI: 10.3109/15376516.2011.562671
- 4 Taby R and Issa JP: Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin* 60(6): 376-392, 2010. PMID: 20959400. DOI: 10.3322/caac.20085
- 5 Aguilera O, Fernández AF, Muñoz A and Fraga MF: Epigenetics and environment: a complex relationship. *J Appl Physiol* (1985) 109(1): 243-251, 2010. PMID: 20378707. DOI: 10.1152/jappphysiol.00068.2010
- 6 Wiles ET and Selker EU: H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark. *Curr Opin Genet Dev* 43: 31-37, 2017. PMID: 27940208. DOI: 10.1016/j.gde.2016.11.001
- 7 Gan L, Yang Y, Li Q, Feng Y, Liu T and Guo W: Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. *Biomark Res* 6: 10, 2018. PMID: 29556394. DOI: 10.1186/s40364-018-0122-2
- 8 Margueron R and Reinberg D: The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469(7330): 343-349, 2011. PMID: 21248841. DOI: 10.1038/nature09784
- 9 Yamagishi M and Uchimaruk K: Targeting EZH2 in cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 29(5): 375-381, 2017. PMID: 28665819. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000390
- 10 Xiang Y, Zhu Z, Han G, Lin H, Xu L and Chen CD: JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res* 17(10): 850-857, 2007. PMID: 17923864. DOI: 10.1038/cr.2007.83
- 11 Mozzetta C, Boyarchuk E, Pontis J and Ait-Si-Ali S: Sound of silence: the properties and functions of repressive Lys methyltransferases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16(8): 499-513, 2015. PMID: 26204160. DOI: 10.1038/nrm4029
- 12 Wijayatunge R, Chen LF, Cha YM, Zannas AS, Frank CL and West AE: The histone lysine demethylase Kdm6b is required for activity-dependent preconditioning of hippocampal neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 61: 187-200, 2014. PMID: 24983519. DOI: 10.1016/j.jmcm.2014.06.008
- 13 Manna S, Kim JK, Baugé C, Cam M, Zhao Y, Shetty J, Vacchio MS, Castro E, Tran B, Tessarollo L and Bosselut R: Histone H3 Lysine 27 demethylases Jmjd3 and Utx are required for T-cell differentiation. *Nat Commun* 6: 8152, 2015. PMID: 26328764. DOI: 10.1038/ncomms9152

- 14 De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G and Natoli G: The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* 130(6): 1083-1094, 2007. PMID: 17825402. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.019
- 15 Kruidenier L, Chung CW, Cheng Z, Liddle J, Che K, Joberty G, Bantscheff M, Bountra C, Bridges A, Diallo H, Eberhard D, Hutchinson S, Jones E, Katso R, Leveridge M, Mander PK, Mosley J, Ramirez-Molina C, Rowland P, Schofield CJ, Sheppard RJ, Smith JE, Swales C, Tanner R, Thomas P, Tumber A, Drewes G, Oppermann U, Patel DJ, Lee K and Wilson DM: A selective jumoni3 H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* 488(7411): 404-408, 2012. PMID: 22842901. DOI: 10.1038/nature11262
- 16 Cribbs A, Hookway ES, Wells G, Lindow M, Obad S, Oerum H, Prinjha RK, Athanasou N, Sowan A, Philpott M, Penn H, Soderstrom K, Feldmann M and Oppermann U: Inhibition of histone H3K27 demethylases selectively modulates inflammatory phenotypes of natural killer cells. *J Biol Chem* 293(7): 2422-2437, 2018. PMID: 29301935. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000698
- 17 Zhang T, Huang K, Zhu Y, Wang T, Shan Y, Long B, Li Y, Chen Q, Wang P, Zhao S, Li D, Wu C, Kang B, Gu J, Mai Y, Wang Q, Li J, Zhang Y, Liang Z, Guo L, Wu F, Su S, Wang J, Gao M, Zhong X, Liao B, Chen J, Zhang X, Shu X, Pei D, Nie J and Pan G: Vitamin C-dependent lysine demethylase 6 (KDM6)-mediated demethylation promotes a chromatin state that supports the endothelial-to-hematopoietic transition. *J Biol Chem* 294(37): 13657-13670, 2019. PMID: 31341023. DOI: 10.1074/jbc.RA119.009757
- 18 Yu SH, Zhu KY, Zhang F, Wang J, Yuan H, Chen Y, Jin Y, Dong M, Wang L, Jia XE, Gao L, Dong ZW, Ren CG, Chen LT, Huang QH, Deng M, Zou LI, Zhou Y, Zhu J, Xu PF and Liu TX: The histone demethylase Jmjd3 regulates zebrafish myeloid development by promoting *spi1* expression. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1861(2): 106-116, 2018. PMID: 29378332. DOI: 10.1016/j.bbgrm.2017.12.009
- 19 Ye L, Fan Z, Yu B, Chang J, Al Hezaimi K, Zhou X, Park NH and Wang CY: Histone demethylases KDM4B and KDM6B promotes osteogenic differentiation of human MSCs. *Cell Stem Cell* 11(1): 50-61, 2012. PMID: 22770241. DOI: 10.1016/j.stem.2012.04.009
- 20 Naruse C, Shibata S, Tamura M, Kawaguchi T, Abe K, Sugihara K, Kato T, Nishiuchi T, Wakana S, Ikawa M and Asano M: New insights into the role of Jmjd3 and Utx in axial skeletal formation in mice. *FASEB J* 31(6): 2252-2266, 2017. PMID: 28188179. DOI: 10.1096/fj.201600642R
- 21 Agrawal Singh S, Lerdруп M, Gomes AR, van de Werken HJ, Vilstrup Johansen J, Andersson R, Sandelin A, Helin K and Hansen K: PLZF targets developmental enhancers for activation during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Elife* 8: e40364, 2019. PMID: 30672466. DOI: 10.7554/eLife.40364
- 22 Zhang F, Xu L, Xu L, Xu Q, Karsenty G and Chen CD: Histone demethylase JMJD3 is required for osteoblast differentiation in mice. *Sci Rep* 5: 13418, 2015. PMID: 26302868. DOI: 10.1038/srep13418
- 23 Zhang F, Xu L, Xu L, Xu Q, Li D, Yang Y, Karsenty G and Chen CD: JMJD3 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice. *J Mol Cell Biol* 7(1): 23-34, 2015. PMID: 25587042. DOI: 10.1093/jmcb/mjv003
- 24 Jiang W, Wang J and Zhang Y: Histone H3K27me3 demethylases KDM6A and KDM6B modulate definitive endoderm differentiation from human ESCs by regulating WNT signaling pathway. *Cell Res* 23(1): 122-130, 2013. PMID: 22907667. DOI: 10.1038/cr.2012.119
- 25 Burgold T, Voituron N, Caganova M, Tripathi PP, Menuet C, Tusi BK, Spreafico F, Bévençut M, Gestreau C, Buontempo S, Simeone A, Kruidenier L, Natoli G, Casola S, Hilaire G and Testa G: The H3K27 demethylase JMJD3 is required for maintenance of the embryonic respiratory neuronal network, neonatal breathing, and survival. *Cell Rep* 2(5): 1244-1258, 2012. PMID: 23103168. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.09.013
- 26 Miller SA, Mohn SE and Weinmann AS: Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. *Mol Cell* 40(4): 594-605, 2010. PMID: 21095589. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.10.028
- 27 Miller SA and Weinmann AS: Molecular mechanisms by which T-bet regulates T-helper cell commitment. *Immunol Rev* 238(1): 233-246, 2010. PMID: 20969596. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00952.x
- 28 Zhao W, Li Q, Ayers S, Gu Y, Shi Z, Zhu Q, Chen Y, Wang HY and Wang RF: Jmjd3 inhibits reprogramming by upregulating expression of INK4a/Arf and targeting PHF20 for ubiquitination. *Cell* 152(5): 1037-1050, 2013. PMID: 23452852. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.006
- 29 Sanchez A, Houfai Khoufai FZ, Idrissou M, Penault-Llorca F, Bignon YJ, Guy L and Bernard-Gallon D: The functions of the demethylase JMJD3 in cancer. *Int J Mol Sci* 22(2): 968, 2021. PMID: 33478063. DOI: 10.3390/ijms22020968
- 30 Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Ote AP, Rubin MA and Chinnaiyan AM: The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419(6907): 624-629, 2002. PMID: 12374981. DOI: 10.1038/nature01075
- 31 Ngollo M, Lebert A, Dagdemir A, Judes G, Kararli-Ceppioglu S, Daures M, Kemeny JL, Penault-Llorca F, Boiteux JP, Bignon YJ, Guy L and Bernard-Gallon D: The association between histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and prostate cancer: relationship with clinicopathological parameters. *BMC Cancer* 14: 994, 2014. PMID: 25535400. DOI: 10.1186/1471-2407-14-994
- 32 Daures M, Ngollo M, Judes G, Rifai K, Kemeny JL, Penault-Llorca F, Bignon YJ, Guy L and Bernard-Gallon D: The JMJD3 histone demethylase and the EZH2 histone methyltransferase in prostate cancer. *OMICS* 20(2): 123-125, 2016. PMID: 26871869. DOI: 10.1089/omi.2015.0113
- 33 Ngollo M, Lebert A, Daures M, Judes G, Rifai K, Dubois L, Kemeny JL, Penault-Llorca F, Bignon YJ, Guy L and Bernard-Gallon D: Global analysis of H3K27me3 as an epigenetic marker in prostate cancer progression. *BMC Cancer* 17(1): 261, 2017. PMID: 28403887. DOI: 10.1186/s12885-017-3256-y
- 34 Daures M, Idrissou M, Judes G, Rifai K, Penault-Llorca F, Bignon YJ, Guy L and Bernard-Gallon D: A new metabolic gene signature in prostate cancer regulated by JMJD3 and EZH2. *Oncotarget* 9(34): 23413-23425, 2018. PMID: 29805743. DOI: 10.18632/oncotarget.25182
- 35 El Ouardi D, Idrissou M, Sanchez A, Penault-Llorca F, Bignon YJ, Guy L and Bernard-Gallon D: The inhibition of the histone methyltransferase EZH2 by DZNEP or siRNA demonstrates its

- involvement in *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* gene regulation in prostate cancer. *OMICS* 24(2): 116-118, 2020. PMID: 31895624. DOI: 10.1089/omi.2019.0162
- 36 Sanchez A, El Ouardi D, Houfak Khoufak FZ, Idrissou M, Boisnier T, Penault-Llorca F, Bignon YJ, Guy L and Bernard-Gallon D: Role of JMJD3 demethylase and its inhibitor GSK-J4 in regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* genes in prostate cancer cell lines. *OMICS* 24(8): 505-507, 2020. PMID: 32525734. DOI: 10.1089/omi.2020.0054
- 37 Vlietstra RJ, van Alewijk DC, Hermans KG, van Steenbrugge GJ and Trapman J: Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res* 58(13): 2720-2723, 1998. PMID: 9661880.
- 38 Cunningham D and You Z: *In vitro* and *in vivo* model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods* 2(1): e17, 2015. PMID: 26146646. DOI: 10.14440/jbm.2015.63
- 39 Hashizume R, Andor N, Ihara Y, Lerner R, Gan H, Chen X, Fang D, Huang X, Tom MW, Ngo V, Solomon D, Mueller S, Paris PL, Zhang Z, Petritsch C, Gupta N, Waldman TA and James CD: Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med* 20(12): 1394-1396, 2014. PMID: 25401693. DOI: 10.1038/nm.3716
- 40 Ramaswamy V, Remke M and Taylor MD: An epigenetic therapy for diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nat Med* 20(12): 1378-1379, 2014. PMID: 25473916. DOI: 10.1038/nm.3769
- 41 Lochmann TL, Powell KM, Ham J, Floros KV, Heisey DAR, Kurupi RJ, Calbert ML, Ghotra MS, Greninger P, Dozmorov M, Gowda M, Souers AJ, Reynolds CP, Benes CH and Faber AC: Targeted inhibition of histone H3K27 demethylation is effective in high-risk neuroblastoma. *Sci Transl Med* 10(441): eao4680, 2018. PMID: 29769286. DOI: 10.1126/scitranslmed.aao4680
- 42 Illiano M, Conte M, Sapio L, Nebbioso A, Spina A, Altucci L and Naviglio S: Forskolin sensitizes human acute myeloid leukemia cells to H3K27me2/3 demethylases GSKJ4 inhibitor *via* protein kinase A. *Front Pharmacol* 9: 792, 2018. PMID: 30079022. DOI: 10.3389/fphar.2018.00792
- 43 Yan N, Xu L, Wu X, Zhang L, Fei X, Cao Y and Zhang F: GSKJ4, an H3K27me3 demethylase inhibitor, effectively suppresses the breast cancer stem cells. *Exp Cell Res* 359(2): 405-414, 2017. PMID: 28823831. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.08.024
- 44 Nagarsheth N, Peng D, Kryczek I, Wu K, Li W, Zhao E, Zhao L, Wei S, Frankel T, Vatan L, Szeliga W, Dou Y, Owens S, Marquez V, Tao K, Huang E, Wang G and Zou W: PRC2 epigenetically silences Th1-type chemokines to suppress effector T-cell trafficking in colon cancer. *Cancer Res* 76(2): 275-282, 2016. PMID: 26567139. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1938
- 45 Coffey K, Rogerson L, Ryan-Munden C, Alkharaf D, Stockley J, Heer R, Sahadevan K, O'Neill D, Jones D, Darby S, Staller P, Mantilla A, Gaughan L and Robson CN: The lysine demethylase, KDM4B, is a key molecule in androgen receptor signalling and turnover. *Nucleic Acids Res* 41(8): 4433-4446, 2013. PMID: 23435229. DOI: 10.1093/nar/gkt106
- 46 Svoltelis A, Bianco S, Madore J, Huppé G, Nordell-Markovits A, Mes-Masson AM and Gévry N: H3K27 demethylation by JMJD3 at a poised enhancer of anti-apoptotic gene *BCL2* determines ER α ligand dependency. *EMBO J* 30(19): 3947-3961, 2011. PMID: 21841772. DOI: 10.1038/emboj.2011.284
- 47 Chen CY, Chen J, He L and Stiles BL: PTEN: Tumor suppressor and metabolic regulator. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 338, 2018. PMID: 30038596. DOI: 10.3389/fendo.2018.00338
- 48 Wang S, Garcia AJ, Wu M, Lawson DA, Witte ON and Wu H: Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103(5): 1480-1485, 2006. PMID: 16432235. DOI: 10.1073/pnas.0510652103
- 49 Ha SD, Cho W and Kim SO: HDAC8 prevents anthrax lethal toxin-induced cell cycle arrest through silencing PTEN in human monocytic THP-1 cells. *Toxins (Basel)* 9(5): 162, 2017. PMID: 28509866. DOI: 10.3390/toxins9050162
- 50 Yu C, Xiong C, Tang J, Hou X, Liu N, Bayliss G and Zhuang S: Histone demethylase JMJD3 protects against renal fibrosis by suppressing TGF β and Notch signaling and preserving PTEN expression. *Theranostics* 11(6): 2706-2721, 2021. PMID: 33456568. DOI: 10.7150/thno.48679
- 51 Gong L, Govan JM, Evans EB, Dai H, Wang E, Lee SW, Lin HK, Lazar AJ, Mills GB and Lin SY: Nuclear PTEN tumor-suppressor functions through maintaining heterochromatin structure. *Cell Cycle* 14(14): 2323-2332, 2015. PMID: 25946202. DOI: 10.1080/15384101.2015.1044174
- 52 Pirrotta V: The necessity of chromatin: a view in perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(1): a019547, 2016. PMID: 26729649. DOI: 10.1101/cshperspect.a019547
- 53 Audia JE and Campbell RM: Histone modifications and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(4): a019521, 2016. PMID: 27037415. DOI: 10.1101/cshperspect.a019521
- 54 Whiteside TL: The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27(45): 5904-5912, 2008. PMID: 18836471. DOI: 10.1038/onc.2008.271
- 55 Jun JC, Rathore A, Younas H, Gilkes D and Polotsky VY: Hypoxia-inducible factors and cancer. *Curr Sleep Med Rep* 3(1): 1-10, 2017. PMID: 28944164. DOI: 10.1007/s40675-017-0062-7
- 56 Zhong H, Agani F, Baccala AA, Laughner E, Rioseco-Camacho N, Isaacs WB, Simons JW and Semenza GL: Increased expression of hypoxia inducible factor-1 α in rat and human prostate cancer. *Cancer Res* 58(23): 5280-5284, 1998. PMID: 9850048.

Received December 13, 2021

Revised February 4, 2022

Accepted February 10, 2022

Conclusion de la publication 5

Dans un premier temps, cette étude a permis d'évaluer l'effet de l'inhibition de JMJD3 par son inhibiteur chimique, le GSK-J4, sur la croissance tumorale *in vivo*. L'utilisation de cellules cancéreuses bioluminescentes a permis de suivre la progression tumorale au cours du temps. Cette dernière était différente entre les cellules RA+ et RA-. En effet, le traitement a entraîné une progression tumorale plus importante dans les cellules RA- par rapport aux groupes contrôles tandis qu'une croissance tumorale moins importante dans les cellules RA+ a été relevée après traitement. De plus, le poids des xénogreffes pesées en fin de protocole concordait avec ces résultats. Les xénogreffes RA- étaient plus grosses dans les groupes traités et moins grosses dans les groupes traités RA+.

Avec les profils d'enrichissement des gènes en H3K27me3 et en se basant sur nos résultats, il apparaît que le traitement GSK-J4 a modulé l'enrichissement en H3K27me3 sur le panel de gènes dans les xénogreffes DU-145-luc alors qu'il a eu peu d'effet (tendance à l'augmentation) sur les PC3-luc et aucun effet sur les LNCaP-luc. Ces résultats pourraient suggérer que les statuts RA et PTEN des xénogreffes influencent le traitement et ceci met à nouveau en évidence une possible relation du RA et JMJD3 au regard des effets du traitement sur les xénogreffes LNCaP-luc. Toutefois, ces résultats ne sont pas comparables à ceux faits *in vitro* [203].

En ce qui concerne l'expression des gènes, une tendance à la diminution a été notée pour tous les gènes (sauf *CDKN1A* dans la lignée DU-145) dans les lignées cellulaires RA- avec une diminution significative pour *RPS6KA2* et *EZH2* dans la lignée DU-145 dans les groupes traités par le GSK-J4. La lignée LNCaP RA+ exhibait une diminution significative de l'ensemble du panel de gènes (sauf *JMJD3*). La diminution de l'expression des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* dans les différentes lignées cellulaires après traitement GSK-J4 était comparable à celle faite *in vitro* [203].

Cette étude apporte de nouvelles preuves d'un potentiel lien entre JMJD3 et le RA.

CHAPITRE IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme en France. Bien que son apparition soit tardive et son évolution lente, il reste tout de même le troisième cancer le plus mortel après le cancer des poumons et le cancer colorectal. Cette maladie est donc un problème de santé publique majeur.

Les altérations génétiques et l'instabilité génomique augmentent au cours de la carcinogénèse prostatique. Les altérations épigénétiques sont aussi présentes tout au long de la progression tumorale et peuvent être impliquées dans l'agressivité des tumeurs, la résistance à la castration ou également servir de biomarqueurs pour la détection de la maladie. C'est pourquoi la recherche dans ce domaine est importante pour mieux comprendre, diagnostiquer et traiter le cancer de la prostate.

Des études liant l'épigénétique et le cancer de la prostate ont déjà été menées dans notre laboratoire. Elles portent notamment sur l'implication de la méthyltransférase EZH2 et de la déméthylase JMJD3 impliquées dans la tri-méthylation post-traductionnelle de la lysine 27 de l'histone 3. Une étude a permis d'évaluer l'expression transcriptionnelle d'une vingtaine de gènes dans des tissus prostatiques sains et tumoraux. Une signature génique qui permet de discriminer les différents groupes clinico-pathologiques (tumeurs de bas grade et de mauvais pronostic) entre eux mais également avec le groupe de patients sains a été mise en évidence. Parmi ces gènes, six étaient particulièrement intéressants : *JMJD3*, *EZH2*, *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2* et *U2AF1*. Ces gènes sont enrichis en H3K27me3 dans les biopsies de la prostate mais de plus en plus exprimés selon l'agressivité tumorale [8].

Le sujet de cette thèse s'inscrit dans les domaines d'études de l'épigénétique et du cancer de la prostate. Plus particulièrement dans l'étude de l'implication de la tri-méthylation de H3K27 et des enzymes EZH2, JMJD3 et UTX qui la modulent, ainsi que dans la régulation des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* qui sont impliqués dans divers processus cellulaires.

Nous nous sommes d'abord demandé si **EZH2**, **JMJD3** et **UTX** étaient bien impliquées dans le dépôt et la suppression de la méthylation de H3K27 au niveau des gènes d'intérêt *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* et si H3K27me3 était impliquée dans la

régulation de leur expression génique. Pour évaluer ceci, nous avons utilisé trois lignées continues de cancer de la prostate représentant différents niveaux d'agressivité : les PC-3, les DU-145 et les LNCaP. Elles sont définies comme les trois modèles standards pour étudier le cancer de la prostate. La lignée PC-3, isolée à partir de métastases osseuses est considérée comme la plus agressive des trois avec un potentiel métastatique élevé en comparaison avec ceux des lignées DU-145 et LNCaP qui ont respectivement un potentiel métastatique modéré et faible. La lignée DU-145 a été isolée à partir de métastases cérébrales et la lignée LNCaP à partir de métastases de ganglions lymphatiques. Contrairement à la lignée LNCaP (RA+), les lignées continues PC-3 et DU-145 sont insensibles aux hormones (RA-) et ne présentent pas de RA au niveau transcriptionnel et protéique [204]. La lignée DU-145 exprime *PTEN* de façon hétérozygote avec la traduction d'une protéine fonctionnelle ce qui n'est pas le cas des lignées LNCaP et PC-3. *PTEN* étant un régulateur négatif de *AKT*, ces dernières lignées possèdent ainsi une activation constitutive d'*AKT* avec un effet positif sur la carcinogénèse et pouvant provoquer une diminution de la réponse aux médicaments chimiothérapeutiques [205]. Ces trois modèles cellulaires ont été traités avec le DZNeP, inhibiteur de l'activité d'*EZH2*, ou le GSK-J4, inhibiteur de l'activité de *JMJD3* et *UTX*. De plus, nous avons utilisé des siARNs dirigés spécifiquement contre ces enzymes pour voir l'effet de leur inhibition, lorsqu'elles ne sont pas traduites, sur l'expression des gènes d'intérêt.

La régulation des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* dans le cancer de la prostate - Approche *in vitro*

Nous avons mis en évidence qu'*EZH2*, *JMJD3* et *UTX* étaient impliquées dans la régulation des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* dans le cancer de la prostate. En effet, l'utilisation de leurs inhibiteurs chimiques a permis de moduler l'enrichissement de la marque au niveau des promoteurs des gènes d'intérêt. L'utilisation de siARNs et des traitements chimiques a permis de moduler leur expression après traitement. Cette partie reprendra ce qui est connu dans la littérature sur l'implication de ces gènes dans la cancérogénèse et plus particulièrement dans le cancer de la prostate.

La protéine **MGMT** est impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Elle est régulée à la baisse dans un certain nombre de cancers et sa perte d'expression a été rapportée dans plusieurs types de tumeurs, notamment dans le gliome. Comme *MGMT* joue un rôle protecteur vis-à-vis des mutations ADN induites par les agents alkylants, il se pourrait que cette

perte soit un mécanisme pré-tumoral [206]. Ce gène est souvent hyper méthylé dans plusieurs types de cancer. C'est cet état de méthylation de l'ADN qui est le plus souvent mis en cause pour expliquer la perte d'expression de *MGMT* dans le cancer et il existe peu d'études sur le rôle de H3K27me3 dans la régulation du gène *MGMT*. L'hyper méthylation du promoteur de *MGMT* a été mise en évidence dans le cancer de la prostate [207]. Elle peut être accompagnée d'une hypo acétylation et d'une hyper méthylation des histones dans le cancer colorectal [208]. Toutefois, une étude sur des tumeurs de prostate ne révèle pas d'inhibition de *MGMT* par la méthylation [209]. Cette observation a également été faite à partir de prélèvements sanguins de patients atteints d'un cancer de la prostate pour lesquels aucune différence de méthylation des promoteurs de *MGMT* entre les patients sains et malades n'a été mise en évidence [210]. Deux autres études ont montré que *MGMT* était moins exprimé dans les tumeurs de la prostate androgéno-sensible en comparaison avec des tumeurs issues de cancer plus développé, agressif et résistant à la castration que ce soit au niveau protéique ou par rapport au profil de méthylation de *MGMT* [211,212]. D'après nos résultats, l'expression de *MGMT* semble être régulée par H3K27me3 puisque l'inhibition des acteurs qui régulent le niveau de méthylation de H3K27 entraîne une modulation de l'expression de *MGMT*. Les effets de l'utilisation du DZNeP et du GSK-J4 sur l'expression de *MGMT* diffèrent en fonction de la lignée continue de cancer de la prostate avec un effet inverse entre les lignées RA+ et RA-. L'utilisation de siEZH2 dans la lignée PC-3 a entraîné une diminution de l'expression de *MGMT* alors que son inhibition par le DZNeP entraîne une diminution de l'accumulation de H3K27me3 sur le promoteur de *MGMT*. La régulation de *MGMT* par H3K27me3 pourrait se faire indépendamment de son activité enzymatique en fonction du type cellulaire, mais par quels mécanismes ?

U2AF1 intervient dans l'épissage alternatif et notamment dans la formation du spliceosome. Il a récemment été mis en évidence qu'il contribuait à limiter la progression du cancer en régulant négativement la traduction des ARNm par fixation directe aux ARNm matures dans le cytoplasme, indépendamment de son rôle dans l'épissage. Ce rôle peut être altéré par une mutation somatique S34F qui affecte la traduction d'une centaine d'ARNm impliqués dans le phénomène de métastase, d'inflammation et de progression tumorale [213]. D'après cette étude, U2AF1 aurait un rôle de suppresseur de tumeur. Dans un modèle de cellules PC-3 (RA-), la sous-expression de *U2AF1* est corrélée avec un mauvais pronostic. U2AF1 affecte la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques et agit sur la résistance aux androgènes. En effet, U2AF1 régule l'épissage de l'androgen receptor variant 7 (ARV7) dans le cancer de la prostate. *U2AF1* est sous-exprimé dans les tumeurs de prostate et entraîne une

expression plus élevée du variant ARV7. Ce variant est connu pour être fréquemment exprimé dans les cellules tumorales circulantes et être impliqué dans la résistance aux traitements anti-androgènes [214]. Toutefois, ces résultats ne sont pas en adéquation avec ceux précédemment faits dans le laboratoire qui montraient une surexpression progressive de *U2AF1* selon l'agressivité de la tumeur [8] alors que Cao *et al.*, qui n'ont pas fait de distinction entre l'agressivité des tumeurs, ont identifié une expression moins importante d'*U2AF1* par rapport au tissu sain adjacent [214].

TRA2A joue également un rôle crucial dans l'épissage alternatif des pré-ARNm. L'expression de ce gène a été retrouvée dérégulée dans plusieurs types de cancer. Dans le cancer de la prostate androgéno-indépendant, *TRA2A* se retrouve surexprimée dans les métastases de la moelle osseuse [117]. Dans le cancer de l'œsophage, *TRA2A* est aussi hautement exprimée. Cette dernière étude a permis de mettre en évidence un lien entre *TRA2A*, *EZH2* et la voie des ncARN (*MALAT1*). *TRA2A*, en se fixant à *MALAT1*, active *EZH2* ce qui est associé à la prolifération et la migration des cellules cancéreuses de l'œsophage [215]. A notre connaissance, c'est la seule étude qui met en lien *EZH2* et *TRA2A* et aucune n'aborde un possible lien entre *TRA2A* et *JMJD3* ou *UTX*. Une forte expression de *TRA2A* a également été retrouvée dans les cellules de gliome [216] et est associée à une hypo méthylation dans les germinomes pédiatriques pinéaux [217]. En plus d'être impliqué dans l'invasion, la prolifération et la migration des cellules du cancer du sein, ce gène joue un rôle dans la résistance au traitement Paclitaxel dans le cancer du sein triple négatif [218]. Néanmoins *TRA2A* s'est trouvé être un marqueur de pronostic favorable pour l'adénocarcinome canalaire pancréatique [219]. Par rapport à nos résultats, on ne peut pas dire que nous identifions un lien entre *EZH2* et *TRA2A* dans les lignées DU-145 et LNCaP puisque les traitements DZNeP et par si*EZH2* des cellules ont entraîné peu de variations de l'expression de *TRA2A*. Toutefois nous avons noté une variation de l'enrichissement du promoteur de *TRA2A* en H3K27me3 après traitement DZNeP. Aussi, l'absence d'*EZH2* générée par l'utilisation de si*EZH2* dans la lignée PC-3 a contribué, de façon très significative, à diminuer l'expression de *TRA2A* alors que les gènes étaient moins enrichis en marque répressive suggérant qu'*EZH2* pourrait réguler l'expression de *TRA2A* indépendamment de sa fonction enzymatique dans cette lignée cellulaire [147].

RPS6KA2 (ou *RSK3*) est une sérine-thréonine kinase appartenant à la famille des ribosomal S6 kinases (*RSK*) qui joue un rôle dans la voie de signalisation des MAPK/Ras. *RPS6KA2* agit en aval de cette voie et joue le rôle de médiateur dans l'activation des facteurs

de transcription induits par les mitogènes et le stress, elle régule la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire [220]. Par conséquent, la dérégulation de *RPS6KA2* peut aisément conduire à une exacerbation de ces phénomènes induisant des phénotypes cancéreux aux cellules. Peu d'études décrivent le rôle de *RPS6KA2* dans le cancer. Dans le laboratoire il avait été démontré que *RPS6KA2* était surexprimée dans le cancer de la prostate selon l'agressivité [8]. Une autre étude a été réalisée par Clark *et al.*, dans le cancer de la prostate mais traite du rôle de *RSK1* et *RSK2*. Ces deux kinases étaient retrouvées surexprimées au niveau protéique dans des biopsies de prostate et avec une relation linéaire positive selon l'agressivité. Les kinases étaient capables de réguler l'expression du *PSA* à travers la transcription médiée par le RA. *RSK* n'activerait pas directement le RA en le phosphorylant mais plutôt indirectement en phosphorylant un co-activateur du RA [221]. Nous avons précédemment décrit que la phosphorylation d'*EZH2* sur sa sérine 21, médiée par la voie *PI3K/AKT*, peut faire passer la fonction répressive d'*EZH2* à une fonction de co-activateur transcriptionnel du RA [92]. Il serait particulièrement intéressant de regarder sur nos modèles cellulaires de cancer de la prostate si *RPS6KA2* est capable de phosphoryler *EZH2* afin de moduler son activité. Ceci ne serait pas surprenant car il semblerait que ces kinases soient capables d'interagir avec l'acétyltransférase *P300* [221]. Ces faits sont très intéressants car ils mettent en avant une potentielle collaboration/activité de ces kinases avec/sur d'autres acteurs impliqués dans les PTMs comme *EZH2* ou *JMJD3*. La surexpression de *RPS6KA2* a également été décrite dans le cancer du sein où elle soutient la prolifération et semble avoir une répercussion sur la résistance des cellules aux inhibiteurs de la voie *PI3K* [222]. Aussi, des variants géniques de *RPS6KA2* sont associés au cancer du côlon et du rectum [223]. Néanmoins, le rôle de *RPS6KA2* semble dépendre du type de cancer car cette kinase a été décrite comme ayant un rôle suppresseur de tumeur dans le cancer de l'ovaire [224].

Nous savons que ces gènes sont surexprimés dans le cancer de la prostate avec une corrélation positive selon le Score de Gleason mettant en évidence une signature génique pour ce type de cancer. Ces gènes sont en partis régulés par *EZH2*, *JMJD3* et *UTX*. Cependant, ce panel de gènes est assez peu étudié dans le cancer de la prostate. Dans cette étude, nous n'avons pas identifié l'impact de la surexpression du panel de gènes sur les paramètres typiques relatifs au développement du cancer tels que la prolifération, la migration ou l'apoptose. Il serait donc intéressant de regarder l'effet de leur inactivation sur ces paramètres afin de mettre en évidence leur pouvoir oncogène ou non sur les cellules de cancer de la prostate.

Mise en évidence d'un possible lien entre EZH2, JMJD3 et le RA *in vitro*

L'étude sur EZH2 a permis de mettre en évidence un possible lien entre EZH2 et le RA. En effet, après traitement par le DZNeP, nous avons observé une nette différence de comportement entre les cellules RA- (PC-3 et DU-145) et RA+ (LNCaP). En ce qui concerne la marque H3K27me3 et après traitement chimique par le DZNeP, on note une diminution de l'accumulation de la marque sur les gènes d'intérêt dans les cellules RA- tandis qu'une augmentation de H3K27me3 et d'EZH2 est présente dans la lignée LNCaP RA+. Ceci est très surprenant car EZH2 est privée de son substrat mais on observe une augmentation de l'accumulation de la marque méthylée.

Ces résultats laissent supposer qu'il pourrait exister un lien entre EZH2 et le RA. Ceci a déjà été mis en évidence dans plusieurs études. En effet, EZH2 est capable d'interagir directement avec le RA dans des cellules RA+ de cancer de la prostate et ceci permet de réguler l'expression des gènes cibles du facteur de transcription. Dans ce cas précis, EZH2 en interaction avec le RA a un effet co-activateur sur l'expression des gènes *PSA* et *TMPRSS2* [151]. Cette observation a également été faite dans le CRPC. Ce mécanisme est dicté par la phosphorylation d'EZH2 sur la sérine 21, médiée par la voie PI3K/AKT et peut faire passer sa fonction de répresseur à celle de co-activateur transcriptionnel du RA [92].

Outre la capacité d'EZH2 et du RA à coopérer ensemble dans le but d'activer l'expression de certains gènes, EZH2 et le RA sont aussi capables de réprimer la transcription de gènes cibles dans les cellules cancéreuses de la prostate LNCaP RA+ et ceci dans un milieu faible en androgène. Cette fonction répressive est menée au moins en partie à la tri-méthylation de H3 assurée par EZH2. Ces gènes, inactivés par l'action de la marque H3K27me3, peuvent rester réprimés dans des cellules résistantes à la castration, indépendamment des androgènes [172]. Une autre étude montre que les androgènes suppriment l'expression d'EZH2 dans les cellules CRPC alors que dans les cellules LNCaP, les concentrations physiologiques d'androgènes stimulent l'expression des gènes du complexe PRC2 (*EZH2*, *SUZ12* et *EED*). Cet effet des androgènes sur l'expression d'*EZH2* est indirecte parce qu'elle est médiée par l'ATPase Family AAA Domain Containing 2 (*ATAD2*), elle-même induite par les androgènes. Ceci implique le complexe E2F, l'histone H3K4me3 méthylase MLL1 et le recrutement de la polymérase II [225]. En opposition avec cette dernière étude de Duan *et al.*, d'autres chercheurs montrent que l'expression d'EZH2 est réprimée par les androgènes à des concentrations de 1 nM ou plus et

qu'elle nécessite un RA fonctionnel. Ceci expliquerait la surexpression d'EZH2 dans les cas des CRPC [171].

Ensembles, tous ces résultats restent assez discordants et nos données ne permettent pas d'affirmer que l'effet du traitement DZNeP sur l'enrichissement de H3K27me3 et d'EZH2 sur les gènes est lié au RA. Une étude plus approfondie des interactions et rôles d'EZH2 et du RA semble indispensable dans un contexte de cancer de la prostate particulièrement affecté par les androgènes.

Tout d'abord, il serait intéressant de regarder par chIP-re-chIP si EZH2 et le RA sont co-localisés sur les gènes d'intérêt. Ceci permettrait de mettre en évidence s'ils ont une interaction et de mieux comprendre un potentiel rôle coopératif entre EZH2 et le RA sur l'enrichissement de la marque H3K27me3 sur les gènes d'intérêt. Ceci pourrait être réalisé avec et sans traitement inhibiteur de l'activité d'EZH2 pour déterminer ensuite si la modulation de l'activité des gènes est dépendante de l'activité enzymatique d'EZH2 ou de l'interaction d'EZH2 et du RA sur le promoteur des gènes.

Aussi, pour valider ces résultats il faudrait les compléter avec une expérience montrant l'impact d'une inhibition plus spécifique d'EZH2 sur l'enrichissement de la marque H3K27me3, en utilisant un inhibiteur spécifique d'EZH2 comme l'EPZ-6438 (tazemetostat). Ceci permettrait de mieux mettre en évidence le rôle d'EZH2. L'analyse de l'enrichissement des gènes en H3K27me3 a été réalisée uniquement après traitement des cellules par le DZNeP. Comme précédemment développé dans la partie I.2.c « Les épiproges » ; le traitement DZNeP est un inhibiteur de méthyltransférase et n'est pas très spécifique d'EZH2 [194], nous ne pouvons pas être certain que nous étudions bien le rôle d'EZH2 et non d'une autre méthyltransférase. Néanmoins son utilisation a eu un effet sur l'accumulation de la marque H3K27me3 et la modulation de l'expression des gènes suggérant que l'activité de DZNeP inhibe au moins en partie EZH2. Aussi, l'utilisation de siARNs dirigés spécifiquement contre EZH2 permettrait de mettre en évidence l'effet de son absence au niveau protéique sur la régulation du dépôt de H3K27me3 car nous avons uniquement regardé l'effet des siEZH2 sur l'expression des gènes d'intérêt.

De plus, malgré les thérapies de privation aux androgènes, de nombreux patients récidivent avec des formes de la maladie plus agressives qui ne répondent plus aux traitements anti-androgènes. Puisque de nombreuses études mettent en avant un lien entre EZH2 et le RA il serait intéressant de voir quel pourrait être l'effet de l'utilisation d'un inhibiteur spécifique

d'EZH2 combiné à un antagoniste du RA sur l'enrichissement des gènes d'intérêt et sur leur expression dans les différents modèles cellulaires. Ceci pourrait être réalisé sur les cellules RA- (PC-3 et DU-145) considérés comme résistants à la castration mais insensibles aux androgènes ainsi qu'une lignée de CRPC sensibles aux androgènes. Cette combinaison thérapeutique s'est déjà révélée prometteuse pour limiter la progression tumorale sur d'autres modèles de cellules cancéreuses de la prostate [98,226].

Nous avons aussi observé un effet différent de l'inhibiteur de JMJD3 *in vitro*, le GSK-J4, en fonction du statut du RA des cellules, bien que ces différences soient moins marquées que pour l'étude sur EZH2. Après traitement GSK-J4, JMJD3 s'est retrouvée systématiquement plus enrichie au niveau du promoteur des gènes étudiés dans les cellules LNCaP RA+. Nous suggérons qu'une implication de JMJD3 pourrait mettre en cause le RA.

Une étude a récemment montré que les niveaux d'ARNm de JMJD3 étaient plus élevés dans la lignée cellulaire LNCaP que dans les lignées cellulaires PC-3 et DU-145 n'exprimant pas le RA [227]. Ces résultats corroborent une étude précédemment faite dans le laboratoire entre les lignées PC-3 et LNCaP [136]. Hormis son rôle de déméthylase, JMJD3 est capable d'assurer des fonctions indépendamment de son activité enzymatique [186,228,229]. Nous supposons que les cellules traitées par le GSK-J4, en réponse à une diminution de l'activité de JMJD3 qui entraîne *in fine* une augmentation de la marque H3K27me3, recruteraient plus fortement JMJD3 au niveau des promoteurs des gènes enrichis en H3K27me3. Ce recrutement viserait à contrebalancer l'excès de dépôt de la marque répressive par fixation de JMJD3 au niveau des H3K27 ou H3K27me1 restantes, empêchant alors EZH2 d'exercer son activité de méthyltransférase sur ces résidus. Nous supposons que cette action pourrait être potentialisée par le RA. Il serait donc intéressant de :

1. Mettre en évidence la co-localisation de JMJD3 et H3K27 ou H3K27me1 sur le promoteur des gènes d'intérêt.
2. Mettre en évidence la co-localisation de JMJD3 et RA sur le promoteur des gènes d'intérêt.
3. Mettre en évidence le rôle du RA dans la potentialisation d'une fixation protectrice ou non de JMJD3 sur la marque H3K27/H3K27me1. Nous pourrions traiter les cellules avec des siARNs dirigés contre le RA dans des lignées qui expriment le RA (LNCaP). Nous comparerions l'enrichissement de JMJD3 co-localisés sur H3K27me1/H3K27 ainsi que

l'expression des gènes cibles dans les cellules traitées par siRA a des cellules non traitées par siRA.

Ces expériences devront se faire avec le traitement GSK-J4 afin de mettre en évidence un potentiel rôle de JMJD3 indépendant de son activité enzymatique.

UTX et JMJD3 : les différences

Le sujet de cette thèse se focalise davantage sur le rôle d'EZH2 et JMJD3 dans le cancer de la prostate. Toutefois, comme JMJD3 et UTX possèdent la même capacité à retirer la di/triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3, nous avons voulu voir quel pourrait être l'impact de l'inhibition d'UTX sur la régulation de l'expression des gènes d'intérêt.

Tout d'abord, l'inhibition par le GSK-J4 a entraîné les mêmes profils d'expression des gènes mis en évidence dans la publication 3 « Role of JMJD3 Demethylase and Its Inhibitor GSK-J4 in Regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *RPS6KA2*, and *U2AF1* Genes in Prostate Cancer Cell Lines » pour les lignées LNCaP et PC-3. En revanche, de façon surprenante, aucune variation de l'expression des gènes n'a été notée dans la lignée DU-145 [230]. Les expériences faites dans le cadre de l'étude du rôle de JMJD3 ont été réalisées à partir de cellules DU-145 avec un faible nombre de passages alors que les expériences réalisées pour la lettre UTX ont été faites avec des cellules avec un plus grand nombre de passages. Ce paramètre pourrait en partie expliquer les différences de résultats pour la lignée DU-145 car à chaque division, des erreurs peuvent s'intégrer dans le génome des cellules ce qui peut créer des différences au cours du temps. Pour confirmer cette hypothèse il faudrait peut-être utiliser des cellules avec un nombre de passages similaire.

En ce qui concerne les résultats sur la déplétion quasiment totale d'UTX par siUTX sur l'expression des gènes d'intérêt, nous avons mis en évidence que l'absence d'UTX entraîne une diminution de l'expression des gènes dans les lignées LNCaP et DU-145 alors qu'aucune variation n'a été établie dans la lignée PC-3. Il existe pourtant une variation de l'enrichissement des gènes en H3K27me3 et de l'expression des gènes après traitement GSK-J4 ce qui suggère que c'est JMJD3 qui pourrait réguler H3K27me3 et l'expression du panel de gènes dans la lignée PC-3, et non UTX.

Comme précédemment évoqué, il serait intéressant de voir l'effet des siARNs d'UTX et de JMJD3 sur l'enrichissement des gènes. De plus, il avait précédemment été montré que JMJD3

était localisée avec H3K27me3 sur les promoteurs des gènes étudiés mais ceci n'a pas été mis en évidence pour UTX. Cette expérience nous permettrait par exemple de confirmer qu'UTX n'est pas impliquée dans la régulation du panel de gènes dans la lignée PC-3 et que cette régulation se fait *via* JMJD3.

Il serait aussi intéressant de regarder si lorsque l'une des deux déméthylases est inhibée, un effet sur l'activité de l'autre déméthylase active, avec un phénomène de rétrocontrôle pour compenser la perte d'activité de la déméthylase ciblée par les siARNs, pourrait être observé.

A la suite de ces expérimentations *in vitro*, nous nous sommes focalisés sur le rôle de la déméthylase JMJD3 dans la progression tumorale prostatique. Nous avons voulu regarder **l'effet de l'inhibition de JMJD3 par son inhibiteur le GSK-J4 sur la croissance tumorale prostatique et sur l'enrichissement des gènes d'intérêt *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* en H3K27me3 et sur leur profil d'expression.** Cette marque épigénétique, dont la déméthylation est régulée par JMJD3, s'est avérée être sous- ou surexprimée dans un large éventail de cancer [231]. A partir des données de la littérature et par rapport au type de cancer que nous étudions, nous avons sélectionné d'autres gènes qui nous semblaient intéressants à étudier. Nous avons choisi les gènes : *PTEN*, *TP53*, *CDKN1A*, *AKT1*, *AR*, *NFKB1*, *EZH2* et *HIF1*. Cette étude a été réalisée sur des souris Balb/c mâles immunodéprimées. Des xénogreffes ont été implantées en sous-cutanée à partir des différents modèles cellulaires étudiés dans le laboratoire : PC-3, DU-145, LNCaP. Un groupe de souris a été traité quotidiennement avec le GSK-J4 pendant 10 jours consécutifs à partir du jour suivant l'inoculation des cellules en sous-cutanée. L'autre groupe était un groupe contrôle, traité quotidiennement avec le véhicule. Ce protocole nous a permis d'analyser l'effet du GSK-J4 sur la prise et la croissance tumorale. Les cellules exprimaient la luciférase de façon stable ce qui a permis d'étudier la croissance des xénogreffes par analyse de bioluminescence. La pousse tumorale a également été analysée par mesure du volume tumoral et pesage des xénogreffes en fin de protocole. L'analyse de l'enrichissement des gènes en H3K27me3 et de leur expression a été réalisée après prélèvement des xénogreffes.

Dans cette étude, nous avons montré que JMJD3 et H3K27me3 ont un rôle dans la progression du cancer de la prostate mais les effets divergent en fonction du statut au RA et de PTEN. Nos résultats suggèrent que JMJD3 est capable de moduler l'expression des gènes indépendamment de sa fonction déméthylase dans le cancer de la prostate. Les effets du GSK-J4 sur les xénogreffes de prostate AR+ ont conduit à une diminution de la croissance tumorale.

L'effet du GSK-J4 sur la progression tumorale prostatique *in vivo*

Nous avons d'abord examiné *in vivo* l'effet de l'inhibition de JMJD3 par son inhibiteur chimique, le GSK-J4, sur la croissance tumorale. Nous avons observé une différence de comportement entre les xénogreffes RA- et RA+. En effet, une croissance tumorale plus importante a été observée pour les xénogreffes traitées RA- et moindre pour les xénogreffes traitées RA+. Ceci s'est traduit par l'analyse de la bioluminescence, la mesure du volume tumoral et le poids des xénogreffes.

L'implication de JMJD3 dans la cancérogenèse n'est toujours pas claire. Son rôle a été décrit comme pouvant favoriser l'initiation et la progression du cancer mais aussi comme suppresseur de tumeur, jouant alors un rôle en défaveur de la tumorigénèse. Plusieurs études ont utilisé le GSK-J4 pour identifier les rôles de la déméthylase JMJD3 dans la cancérogenèse : Dans le gliome, le maintien de la méthylation, favorisée par l'inhibition de JMJD3, semble être une nouvelle stratégie thérapeutique car elle conduit à une augmentation de la survie et à une réduction de la croissance tumorale [232,233]. Le protocole de traitement GSK-J4 que nous avons utilisé a d'ailleurs été tiré de l'étude de Hashizume *et al.* qui travaillent sur le gliome. Dans le neuroblastome, le GSK-J4 contribue à diminuer la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffe *in vivo* [234]. Les effets antiprolifératifs du GSK-J4 ont également été démontrés dans la leucémie myéloïde aiguë *via* la voie de la protéine kinase A par le biais de la régulation négative de la protéine BCL2 et de l'activation de la caspase 3 [235]. Dans le cancer du sein, *in vivo*, le traitement chimique a montré une diminution de la croissance tumorale et notamment la suppression de l'auto-renouvellement et de l'expression des marqueurs caractéristiques des cellules souches du cancer du sein [236]. En revanche, dans le cancer colorectal, JMJD3 a été identifiée comme étant positivement associée à la survie des patients. Son inhibition par le GSK-J4 a montré une réduction de l'expression des chimiokines (CXCL9 et CXCL10) impliquées dans l'immunité tumorale [237]. Ces différences dans l'effet de l'inhibition de JMJD3 sur la carcinogenèse suggèrent que l'action de JMJD3 pourrait être tissu-dépendante. Enfin, notre étude montre que même dans les cellules d'un même tissu, à savoir la prostate, JMJD3 semble avoir une action différente selon les propriétés des lignées cellulaires étudiées.

Lors de notre étude, le protocole de traitement utilisé pour le GSK-J4 consistait à traiter les souris une fois par jour pendant 10 jours consécutifs. Nous pourrions regarder l'effet de l'utilisation des ciseaux Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats

CRISPR/Cas9. Cette technique permet l'élimination, la délétion, la correction ou l'ajout de gènes. Dans ce contexte d'étude, CRISPR/Cas9 permettrait d'invalider complètement JMJD3 dans les cellules à inoculer dans le but de former les xénogreffes. La technique CRISPR/Cas9 permettrait de limiter la manipulation des souris qui peut causer un stress quotidien et avoir un impact sur les résultats. De plus, le GSK-J4 est une poudre diluée dans du DMSO. Nous avons respecté les doses recommandées pour des injections intrapéritonéales chez la souris [238]. Toutefois, il semblerait que le DMSO puisse être toxique même à faible dose parce qu'il induit notamment une mort cellulaire [239]. La technique CRISPR/Cas9 permettrait également d'avoir une invalidation complète et stable dans le temps.

Mise en évidence d'un possible lien entre JMJD3 et le RA *in vivo*

Ensuite, nous avons également décelé un possible lien avec le RA, tout comme pour les études faites *in vitro* (Publication 2 et 3). Les résultats que nous avons obtenus dans la publication 5, notamment ceux concernant la croissance tumorale, semblent différer en fonction du statut hormonal des xénogreffes étudiées : RA- (PC3-luc et DU-145-luc) et RA+ (LNCaP-luc). Ce phénomène avait déjà été identifié par une analyse transcriptomique *in vitro* démontrant une opposition dans l'expression des gènes dans les lignées cellulaires RA+ par rapport aux RA- dans le cancer de la prostate [8].

De plus en plus d'auteurs décrivent une action des déméthylases indépendante de leur activité enzymatique, par exemple par interaction avec des facteurs de transcription ou des protéines, en empêchant leur dégradation par le protéasome. Ceci a été décrit dans le cancer de la prostate pour la déméthylase KDM4B. Elle fait partie de la même famille que JMJD3 et contient un domaine jumonji. L'activité de KDM4B est nécessaire pour activer le RA au niveau transcriptionnel, et indépendamment de son activité enzymatique, KDM4B est capable de stabiliser le RA pour éviter sa dégradation par ubiquitination. Inversement, il a été montré que le RA régule également l'activité de KDM4B. Après inhibition de KDM4B par siARNs, les auteurs ont mis en évidence une diminution de la prolifération dans les lignées cellulaires RA+ alors qu'il n'y avait aucun effet sur les lignées cellulaires RA- [240]. Ceci suggère que les effets sur la prolifération sont médiés par la fonction du RA et ces résultats pourraient expliquer la différence de croissance tumorale et d'expression des gènes après traitement entre les xénogreffes RA+ et RA-. Nous nous demandons donc si JMJD3 pourrait être une co-activatrice du RA ce qui pourrait induire une expression différentielle des gènes candidats selon le type de

xénogreffes dans notre étude. Il a déjà été montré dans le cancer du sein que JMJD3 peut interagir avec des facteurs de transcription tels que le récepteur aux œstrogènes ER α . Après induction de ER α par les œstrogènes, JMJD3 est co-recrutée sur le promoteur du gène anti-apoptotique *BCL2* pour induire un état transcriptionnel actif, cette fois selon une voie génomique [241].

Ensuite, pour démontrer l'impact de l'inhibition de JMJD3 sur l'enrichissement en H3K27me3 sur les promoteurs de quatre gènes candidats identifiés *in vitro* [8], une ChIP-qPCR a été réalisée sur des xénogreffes collectées.

Il n'y avait pas de différence dans l'enrichissement en H3K27me3 des gènes contrôles *Myoglobine* et *GAPDH* et de *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2* après traitement dans les xénogreffes LNCaP-luc (RA+) alors qu'une différence dans l'expression des mêmes gènes candidats ainsi qu'un effet du traitement sur la croissance tumorale étaient évidents. Ceci suggère que JMJD3, dans ce modèle de xénogreffe, pourrait permettre la médiation de la transcription induite par les androgènes de gènes cibles impliqués dans la tumorigenèse et indépendamment de la marque répressive H3K27me3, comme précédemment évoquée.

Le statut PTEN et son influence sur l'effet du traitement GSK-J4

De manière surprenante, le traitement par le GSK-J4 a entraîné une diminution globale de l'enrichissement en gènes H3K27me3 dans les xénogreffes DU-145-luc, un effet opposé à celui qui était attendu. Cette lignée cellulaire diffère de la lignée PC-3 et LNCaP par son statut PTEN+, qui lui confère une capacité à réguler négativement AKT par PTEN, ce qui n'est pas partagé par les deux autres lignées cellulaires [205,242]. *PTEN* est un gène suppresseur de tumeur connu [243], la délétion homozygote de *PTEN* dans un modèle de cancer de la prostate conduit à une augmentation des cellules pro génitrices/souches et ainsi à l'initiation de la tumeur [244]. Pour déterminer si nos résultats proviennent en partie de l'expression de PTEN, nous pourrions utiliser la transfection d'un vecteur d'expression de *PTEN* dans une lignée cellulaire PTEN-.

Bien que la diminution de l'expression d'EZH2 dans les xénogreffes DU-145 traitées par le GSK-J4 puisse expliquer en partie la perte de H3K27me3, il existe peut-être un lien entre la déméthylase JMJD3 et PTEN qui pourrait expliquer ces résultats. Deux études antérieures sur les cellules monocytaires et la fibrose rénale ont fait des observations qui soutiennent

l'hypothèse d'un lien entre PTEN et la déméthylase JMJD3 et notamment l'implication de JMJD3 dans la déméthylation de PTEN. Le traitement GSK-J4 induisait dans les deux études une augmentation de l'activité d'AKT [245,246]. Nous avons noté un effet de l'inhibition de JMJD3 sur l'expression de *PTEN* avec une légère diminution, mais il n'y a pas eu d'impact sur l'expression d'AKT entre les souris contrôles et les souris traitées. PTEN inhibe la phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) ce qui présente une opportunité de réguler une voie majeure de la survie des cellules cancéreuses. En effet, cette kinase contribue à recruter la sérine/thréonine kinase AKT à proximité de la membrane plasmique, où elle est alors phosphorylée et activée par la phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1 (PDK1). L'oncoprotéine AKT active ensuite plusieurs cibles en aval, notamment mTOR, largement impliquée dans la tumorigénèse [247] (**Figure 26**). Dans des biopsies de prostate avec un fort SG, AKT phosphorylée est surexprimée [248]. Des études *in vitro* pourraient être réalisées sur la lignée DU-145 pour identifier : Premièrement, si *PTEN* est un gène cible de la déméthylation de H3K27me3 médiée par l'activité enzymatique de JMJD3 dans ce modèle cellulaire de cancer de la prostate. Deuxièmement, nous pourrions regarder les taux protéiques d'AKT phosphorylée en conditions contrôles et traités avec le GSK-J4 afin de mieux comprendre l'implication de JMJD3 dans l'activation de cette voie de signalisation.

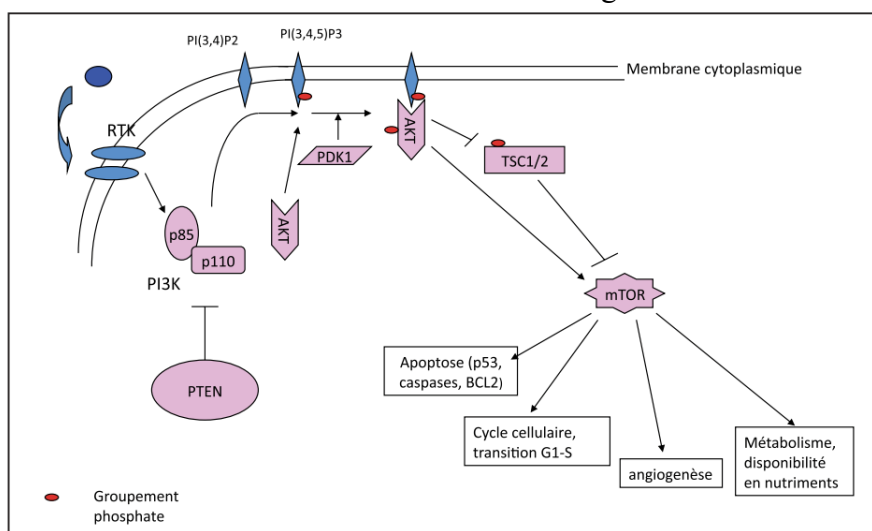





Figure 26: La voie PI3-K/AKT/mTOR

RTK : récepteur à tyrosine-kinase ; PIP2 : phosphatidylinositol 3,4,5-diphosphate PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate; PDK1 et 2 : 3-phosphoinositide dependent tyrosine kinase 1 et 2; PTEN : phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; TSC1 : Tuberous sclerosis complex-1 ; TSC2 : Tuberous sclerosis complex-2 ; PI3K: phosphatidylinositol 3-OH-kinase avec une sous-unité régulatrice p85, et une sous-unité catalytique p110; mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin [247].

Un effet du microenvironnement tumoral ?

Nos résultats sur l'expression des gènes après inhibition par le GSK-J4 étaient cohérents avec ceux précédemment réalisés *in vitro* sur les trois lignées cellulaires avec cette tendance à la diminution de leur expression. En revanche, l'augmentation de l'enrichissement des gènes en H3K27me3 après traitement était évidente *in vitro* [203] alors que des disparités ont été démontrées *in vivo*. Le **tableau 7** récapitule l'effet des traitements siEZH2, DZNeP, siUTX, siJMJD3 et GSK-J4 *in vitro* et *in vivo* sur l'expression des gènes d'intérêt *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2*, leur enrichissement en H3K27me3 et sur la croissance tumorale dans les différentes lignées continues de cellules cancéreuses de la prostate PC-3, DU-145 et LNCaP.

Il est certain que le microenvironnement tumoral doit être pris en considération, le stroma tumoral, les cellules immunitaires infiltrées et les vaisseaux sanguins entourant la tumeur entraînent des événements moléculaires qui n'existent pas *in vitro*. La voie NF- κ B joue un rôle majeur dans l'inflammation chronique associée à la tumeur et le facteur hypoxia-inducible factor-1 (HIF1) dans l'environnement hypoxique. L'activation de NF- κ B dans les leucocytes infiltrant conduit à la sécrétion de TNF- α entre autres. Ceci initie et conduit à l'expression régulée de gènes de cytokines responsables de la prolifération cellulaire [249]. Le traitement a agi sur l'expression globale des gènes dans les xénogreffes RA+ et a montré une diminution de l'expression de NF- κ B ainsi que de HIF1. Ce dernier est largement impliqué dans la survie des tumeurs [250] et surexprimé dans le cancer de la prostate [251]. Ces derniers résultats, ainsi que la diminution de l'expression d'*AKT* dans les xénogreffes RA+ traitées, suggèrent que JMJD3 pourrait avoir une action sur l'expression de ces gènes et contribuer à la diminution de la croissance tumorale dans un modèle de cancer de la prostate RA+. La mise au point de sphéroïdes traitées avec le GSK-J4 ou siJMJD3 et non traitées *in vitro* nous permettrait d'étudier plus en détail l'impact de JMJD3 sur ces voies de signalisation dans un modèle plus représentatif du microenvironnement tumoral que le modèle *in vitro* deux dimensions.

																						
Gènes	Analyses	Traitements																				
		In vitro						In vivo	In vitro						In vivo	In vitro						In vivo
		siEZH2	DZNeP	siUTX	GSK-J4 (lettre UTX)	siJMJD3	GSK-J4 (JMJD3)	siEZH2	DZNeP	siUTX	GSK-J4 (lettre UTX)	siJMJD3	GSK-J4 (JMJD3)	siEZH2	DZNeP	siUTX	GSK-J4 (lettre UTX)	siJMJD3	GSK-J4 (JMJD3)			
MGMT	H3K27me3		-		==		+	==		-		+		+	-		+		+		+	=
	Expression génique	_*	==	=	-	-	-	-	+**	+	-	=	-	-	-	==	_*	-	=	-	+	-
TRA2A	H3K27me3		-		==		+	==		-		+		+	-		+		+		+	=
	Expression génique	_*	+	=	_*	-	-	-	==	==	-	-	-	_*	-	==	=	-	_*	-	_*	-
U2AF1	H3K27me3		-		+		+	==		-		+		+	_*		+		+		+	=
	Expression génique	=	+	=	-	_*	-	-	==	+	-	==	-	-	-	+	+	-	_*	-	-	-
RPS6KA2	H3K27me3		-		+		+	==		-		+		+	_*		+		+		+	=
	Expression génique	+	+	=	-	_*	-	-	+	+	-	==	-	-	-	+	_*	-	==	-	-	-

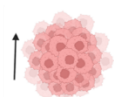
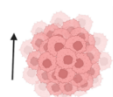


Tableau 7 : Récapitulatif de l'effet des traitements siEZH2, DZNeP, siUTX, siJMJD3 et GSK-J4 *in vitro* et *in vivo* sur l'expression des gènes d'intérêt *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2*, leur enrichissement en H3K27me3 et sur la croissance tumorale dans les différentes lignées continues de cellules cancéreuses de la prostate PC-3, DU-145 et LNCaP.

*Significativité ; + Augmentation de l'expression ; - Diminution de l'expression ; == Tendance à l'augmentation ; -= Tendance à la diminution ; = Pas de variation de l'expression des gènes ou de l'enrichissement de H3K27me3.

CONCLUSIONS

A l'inverse des altérations génétiques, les modifications épigénétiques sont des processus réversibles. Elles peuvent ainsi être régulées par l'action pharmacologique de molécules ciblant les différentes enzymes impliquées dans les PTMs d'histones. Nous avons montré par l'utilisation des inhibiteurs d'EZH2, JMJD3 et UTX que ces acteurs régulent le niveau de méthylation H3K27 au niveau des promoteurs des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2*, gènes impliqués dans la cancérogénèse. Ceci a conduit à modifier leur expression génique. L'inhibition d'EZH2 a permis de mettre en évidence une action différente sur l'enrichissement de la marque H3K27me3 en fonction du statut en récepteur aux androgènes des cellules suggérant un lien entre EZH2 et le RA. Nous avons également évalué l'implication de JMJD3 dans la progression tumorale *in vivo* et mis en évidence un effet régressif du traitement GSK-J4 sur les xénogreffes androgéno-dépendantes ainsi qu'un possible lien entre JMJD3 et le récepteur aux androgènes.

RÉFÉRENCES

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
2. Ballestar, E.; Esteller, M. Epigenetic Gene Regulation in Cancer. *Adv. Genet.* **2008**, *61*, 247–267, doi:10.1016/S0065-2660(07)00009-0.
3. Ke, X.-S.; Qu, Y.; Rostad, K.; Li, W.-C.; Lin, B.; Halvorsen, O.J.; Haukaas, S.A.; Jonassen, I.; Petersen, K.; Goldfinger, N.; et al. Genome-Wide Profiling of Histone H3 Lysine 4 and Lysine 27 Trimethylation Reveals an Epigenetic Signature in Prostate Carcinogenesis. *PLoS One* **2009**, *4*, e4687, doi:10.1371/journal.pone.0004687.
4. Ngollo, M.; Lebert, A.; Daures, M.; Judes, G.; Rifai, K.; Dubois, L.; Kemeny, J.-L.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; et al. Global Analysis of H3K27me3 as an Epigenetic Marker in Prostate Cancer Progression. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 261, doi:10.1186/s12885-017-3256-y.
5. Varambally, S.; Dhanasekaran, S.M.; Zhou, M.; Barrette, T.R.; Kumar-Sinha, C.; Sanda, M.G.; Ghosh, D.; Pienta, K.J.; Sewalt, R.G.A.B.; Otte, A.P.; et al. The Polycomb Group Protein EZH2 Is Involved in Progression of Prostate Cancer. *Nature* **2002**, *419*, 624–629, doi:10.1038/nature01075.
6. Xiang, Y.; Zhu, Z.; Han, G.; Lin, H.; Xu, L.; Chen, C.D. JMJD3 Is a Histone H3K27 Demethylase. *Cell Res* **2007**, *17*, 850–857, doi:10.1038/cr.2007.83.
7. Morozov, V.M.; Li, Y.; Clowers, M.M.; Ishov, A.M. Inhibitor of H3K27 Demethylase JMJD3/UTX GSK-J4 Is a Potential Therapeutic Option for Castration Resistant Prostate Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 62131–62142, doi:10.18632/oncotarget.19100.
8. Daures, M.; Idrissou, M.; Judes, G.; Rifai, K.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D.; Penault-Llorca, F. A New Metabolic Gene Signature in Prostate Cancer Regulated by JMJD3 and EZH2. *Oncotarget* **2018**, *9*, 23413–23425, doi:10.18632/oncotarget.25182.
9. McNeal, J.E. Regional Morphology and Pathology of the Prostate. *Am J Clin Pathol* **1968**, *49*, 347–357, doi:10.1093/ajcp/49.3.347.
10. Zarif, J.C.; Miranti, C.K. The Importance of Non-Nuclear AR Signaling in Prostate Cancer Progression and Therapeutic Resistance. *Cell Signal* **2016**, *28*, 348–356, doi:10.1016/j.cellsig.2016.01.013.
11. Schreyer, E.; Barthélémy, P.; Cottard, F.; Madi-Berthélémy, P.O.; Schaff-Wendling, F.; Kurtz, J.-E.; Céraline, J. Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate. *Med Sci (Paris)* **2017**, *33*, 758–764, doi:10.1051/medsci/20173308021.

12. Andreoiu, M.; Cheng, L. Multifocal Prostate Cancer: Biologic, Prognostic, and Therapeutic Implications. *Human Pathology* **2010**, *41*, 781–793, doi:10.1016/j.humpath.2010.02.011.
13. Chai, H.; Brown, R.E. Field Effect in Cancer—An Update. *Ann Clin Lab Sci* **2009**, *39*, 331–337.
14. Scott, L.J. Enzalutamide: A Review in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Drugs* **2018**, *78*, 1913–1924, doi:10.1007/s40265-018-1029-9.
15. Bahloul, A.; Charfi, S.; Franck, F.; Jung, J.L. Carcinome épidermoïde Primitif de la Prostate: A propos d’un cas et revue de la littérature. *African Journal of Urology* **2016**, *22*, 235–239, doi:10.1016/j.afju.2015.07.006.
16. Bostwick, D.G. Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Curr Urol Rep* **2000**, *1*, 65–70, doi:10.1007/s11934-000-0037-x.
17. Gleason, D.F. Classification of Prostatic Carcinomas. *Cancer Chemother Rep* **1966**, *50*, 125–128.
18. Harnden, P.; Shelley, M.D.; Coles, B.; Staffurth, J.; Mason, M.D. Should the Gleason Grading System for Prostate Cancer Be Modified to Account for High-Grade Tertiary Components? A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Lancet Oncology* **2007**, *8*, 411–419, doi:10.1016/S1470-2045(07)70136-5.
19. Barber, L.; Gerke, T.; Markt, S.C.; Peisch, S.F.; Wilson, K.M.; Ahearn, T.; Giovannucci, E.; Parmigiani, G.; Mucci, L.A. Family History of Breast or Prostate Cancer and Prostate Cancer Risk. *Clin Cancer Res* **2018**, *24*, 5910–5917, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0370.
20. Cavanagh, H.; Rogers, K.M.A. The Role of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Prostate, Pancreatic and Stomach Cancers. *Heredit Cancer Clin Pract* **2015**, *13*, 16, doi:10.1186/s13053-015-0038-x.
21. Lamy, P.-. J.; Trétarre, B.; Rebillard, X.; Sanchez, M.; Cénéé, S.; Ménégau, F. Family History of Breast Cancer Increases the Risk of Prostate Cancer: Results from the EPICAP Study. *Oncotarget* **2018**, *9*, 23661–23669, doi:10.18632/oncotarget.25320.
22. Brandão, A.; Paulo, P.; Teixeira, M.R. Hereditary Predisposition to Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Implications. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, E5036, doi:10.3390/ijms21145036.
23. Yamoah, K.; Asamoah, F.A.; Abrahams, A.O.D.; Awasthi, S.; Mensah, J.E.; Dhillon, J.; Mahal, B.A.; Gueye, S.M.; Jalloh, M.; Farahani, S.J.; et al. Prostate Tumors of Native Men from West Africa Show Biologically Distinct Pathways—A Comparative Genomic Study. *Prostate* **2021**, *81*, 1402–1410, doi:10.1002/pros.24238.
24. Rebbeck, T.R.; Haas, G.P. Temporal Trends and Racial Disparities in Global Prostate Cancer Prevalence. *Can J Urol* **2014**, *21*, 7496–7506.

25. Panz, V.R.; Joffe, B.I.; Spitz, I.; Lindenberg, T.; Farkas, A.; Haffeejee, M. Tandem CAG Repeats of the Androgen Receptor Gene and Prostate Cancer Risk in Black and White Men. *Endocrine* **2001**, *15*, 213–216, doi:10.1385/ENDO:15:2:213.
26. Porcaro, A.B.; Tafuri, A.; Panunzio, A.; Rizzetto, R.; Amigoni, N.; Cerrato, C.; Shakir, A.; Gallina, S.; Bianchi, A.; Cianflone, F.; et al. Endogenous Testosterone Density Predicts Unfavorable Disease at Final Pathology in Intermediate Risk Prostate Cancer. *Int Urol Nephrol* **2021**, *53*, 2517–2526, doi:10.1007/s11255-021-02990-9.
27. Vatten, L.J.; Ursin, G.; Ross, R.K.; Stanczyk, F.Z.; Lobo, R.A.; Harvei, S.; Jellum, E. Androgens in Serum and the Risk of Prostate Cancer: A Nested Case-Control Study from the Janus Serum Bank in Norway. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1997**, *6*, 967–969.
28. Fleshner, N.; Bagnell, P.S.; Klotz, L.; Venkateswaran, V. Dietary Fat and Prostate Cancer. *J Urol* **2004**, *171*, S19-24, doi:10.1097/01.ju.0000107838.33623.19.
29. Ohwaki, K.; Endo, F.; Kachi, Y.; Hattori, K.; Muraishi, O.; Nishikitani, M.; Yano, E. Relationship between Dietary Factors and Prostate-Specific Antigen in Healthy Men. *Urol Int* **2012**, *89*, 270–274, doi:10.1159/000339601.
30. Aronson, W.J.; Barnard, R.J.; Freedland, S.J.; Henning, S.; Elashoff, D.; Jardack, P.M.; Cohen, P.; Heber, D.; Kobayashi, N. Growth Inhibitory Effect of Low Fat Diet on Prostate Cancer Cells: Results of a Prospective, Randomized Dietary Intervention Trial in Men with Prostate Cancer. *J Urol* **2010**, *183*, 345–350, doi:10.1016/j.juro.2009.08.104.
31. Liss, M.A.; Al-Bayati, O.; Gelfond, J.; Goros, M.; Ullevig, S.; DiGiovanni, J.; Hamilton-Reeves, J.; O’Keefe, D.; Bacich, D.; Weaver, B.; et al. Higher Baseline Dietary Fat and Fatty Acid Intake Is Associated with Increased Risk of Incident Prostate Cancer in the SABOR Study. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **2019**, *22*, 244–251, doi:10.1038/s41391-018-0105-2.
32. Bidoli, E.; Talamini, R.; Bosetti, C.; Negri, E.; Maruzzi, D.; Montella, M.; Franceschi, S.; La Vecchia, C. Macronutrients, Fatty Acids, Cholesterol and Prostate Cancer Risk. *Ann Oncol* **2005**, *16*, 152–157, doi:10.1093/annonc/mdi010.
33. Crowe, F.L.; Key, T.J.; Appleby, P.N.; Travis, R.C.; Overvad, K.; Jakobsen, M.U.; Johnsen, N.F.; Tjønneland, A.; Linseisen, J.; Rohrmann, S.; et al. Dietary Fat Intake and Risk of Prostate Cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* **2008**, *87*, 1405–1413, doi:10.1093/ajcn/87.5.1405.
34. Park, S.-Y.; Murphy, S.P.; Wilkens, L.R.; Henderson, B.E.; Kolonel, L.N. Fat and Meat Intake and Prostate Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *Int J Cancer* **2007**, *121*, 1339–1345, doi:10.1002/ijc.22805.
35. Wallström, P.; Bjartell, A.; Gullberg, B.; Olsson, H.; Wirfält, E. A Prospective Study on Dietary Fat and Incidence of Prostate Cancer (Malmö, Sweden). *Cancer Causes Control* **2007**, *18*, 1107–1121, doi:10.1007/s10552-007-9050-4.

36. Lu, W.; Chen, H.; Niu, Y.; Wu, H.; Xia, D.; Wu, Y. Dairy Products Intake and Cancer Mortality Risk: A Meta-Analysis of 11 Population-Based Cohort Studies. *Nutr J* **2016**, *15*, 91, doi:10.1186/s12937-016-0210-9.
37. Mikami, K.; Ozasa, K.; Miki, T.; Watanabe, Y.; Mori, M.; Kubo, T.; Suzuki, K.; Wakai, K.; Nakao, M.; Tamakoshi, A.; et al. Dairy Products and the Risk of Developing Prostate Cancer: A Large-Scale Cohort Study (JACC Study) in Japan. *Cancer Med* **2021**, *10*, 7298–7307, doi:10.1002/cam4.4233.
38. Raimondi, S.; Mabrouk, J.B.; Shatenstein, B.; Maisonneuve, P.; Ghadirian, P. Diet and Prostate Cancer Risk with Specific Focus on Dairy Products and Dietary Calcium: A Case-Control Study. *Prostate* **2010**, *70*, 1054–1065, doi:10.1002/pros.21139.
39. Preble, I.; Zhang, Z.; Kopp, R.; Garzotto, M.; Bobe, G.; Shannon, J.; Takata, Y. Dairy Product Consumption and Prostate Cancer Risk in the United States. *Nutrients* **2019**, *11*, E1615, doi:10.3390/nu11071615.
40. Multigner, L.; Ndong, J.R.; Giusti, A.; Romana, M.; Delacroix-Maillard, H.; Cordier, S.; Jégou, B.; Thome, J.P.; Blanchet, P. Chlordecone Exposure and Risk of Prostate Cancer. *JCO* **2010**, *28*, 3457–3462, doi:10.1200/JCO.2009.27.2153.
41. Salamanca-Fernández, E.; Rodríguez-Barranco, M.; Amiano, P.; Delfrade, J.; Chirlaque, M.D.; Colorado, S.; Guevara, M.; Jimenez, A.; Arrebola, J.P.; Vela, F.; et al. Bisphenol-A Exposure and Risk of Breast and Prostate Cancer in the Spanish European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Environ Health* **2021**, *20*, 88, doi:10.1186/s12940-021-00779-y.
42. Castro, B.; Sánchez, P.; Torres, J.M.; Preda, O.; Moral, R.G. del; Ortega, E. Bisphenol A Exposure during Adulthood Alters Expression of Aromatase and 5 α -Reductase Isozymes in Rat Prostate. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e55905, doi:10.1371/journal.pone.0055905.
43. Lemarchand, C.; Tual, S.; Boulanger, M.; Levêque-Morlais, N.; Perrier, S.; Clin, B.; Guizard, A.-V.; Velten, M.; Rigaud, E.; Baldi, I.; et al. Prostate Cancer Risk among French Farmers in the AGRICAN Cohort. *Scand J Work Environ Health* **2016**, *42*, 144–152, doi:10.5271/sjweh.3552.
44. Band, P.R.; Abanto, Z.; Bert, J.; Lang, B.; Fang, R.; Gallagher, R.P.; Le, N.D. Prostate Cancer Risk and Exposure to Pesticides in British Columbia Farmers. *The Prostate* **2011**, *71*, 168–183, doi:10.1002/pros.21232.
45. Cohen, J.H.; Kristal, A.R.; Stanford, J.L. Fruit and Vegetable Intakes and Prostate Cancer Risk. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2000**, *92*, 61–68, doi:10.1093/jnci/92.1.61.
46. Wu, K.; Erdman, J.W.; Schwartz, S.J.; Platz, E.A.; Leitzmann, M.; Clinton, S.K.; DeGroff, V.; Willett, W.C.; Giovannucci, E. Plasma and Dietary Carotenoids, and the Risk of Prostate Cancer: A Nested Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2004**, *13*, 260–269, doi:10.1158/1055-9965.epi-03-0012.

47. Rowles, J.L.; Ranard, K.M.; Smith, J.W.; An, R.; Erdman, J.W. Increased Dietary and Circulating Lycopene Are Associated with Reduced Prostate Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **2017**, *20*, 361–377, doi:10.1038/pcan.2017.25.
48. Krinsky, N.I.; Johnson, E.J. Carotenoid Actions and Their Relation to Health and Disease. *Mol Aspects Med* **2005**, *26*, 459–516, doi:10.1016/j.mam.2005.10.001.
49. Thakur, V.S.; Gupta, K.; Gupta, S. Green Tea Polyphenols Causes Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Prostate Cancer Cells by Suppressing Class I Histone Deacetylases. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 377–384, doi:10.1093/carcin/bgr277.
50. Bettuzzi, S.; Brausi, M.; Rizzi, F.; Castagnetti, G.; Peracchia, G.; Corti, A. Chemoprevention of Human Prostate Cancer by Oral Administration of Green Tea Catechins in Volunteers with High-Grade Prostate Intraepithelial Neoplasia: A Preliminary Report from a One-Year Proof-of-Principle Study. *Cancer Res* **2006**, *66*, 1234–1240, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1145.
51. Karsli-Ceppioglu, S.; Ngollo, M.; Judes, G.; Penault-LLorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. The Role of Soy Phytoestrogens on Genetic and Epigenetic Mechanisms of Prostate Cancer. *Enzymes* **2015**, *37*, 193–221, doi:10.1016/bs.enz.2015.05.004.
52. Adjakly, M.; Bosviel, R.; Rabiau, N.; Boiteux, J.-P.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. DNA Methylation and Soy Phytoestrogens: Quantitative Study in DU-145 and PC-3 Human Prostate Cancer Cell Lines. *Epigenomics* **2011**, *3*, 795–803, doi:10.2217/epi.11.103.
53. Adjakly, M.; Ngollo, M.; Boiteux, J.-P.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. Genistein and Daidzein: Different Molecular Effects on Prostate Cancer. *Anticancer Res* **2013**, *33*, 39–44.
54. Arif, M.; Sadayappan, S.; Becker, R.C.; Martin, L.J.; Urbina, E.M. Epigenetic Modification: A Regulatory Mechanism in Essential Hypertension. *Hypertens Res* **2019**, *42*, 1099–1113, doi:10.1038/s41440-019-0248-0.
55. Collins, L.J.; Schönfeld, B.; Chen, X.S. Chapter 4 - The Epigenetics of Non-Coding RNA. In *Handbook of Epigenetics*; Tollefsbol, T., Ed.; Academic Press: San Diego, 2011; pp. 49–61 ISBN 978-0-12-375709-8.
56. Peschansky, V.J.; Wahlestedt, C. Non-Coding RNAs as Direct and Indirect Modulators of Epigenetic Regulation. *Epigenetics* **2014**, *9*, 3–12, doi:10.4161/epi.27473.
57. Greenberg, M.V.C.; Bourc'his, D. The Diverse Roles of DNA Methylation in Mammalian Development and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2019**, *20*, 590–607, doi:10.1038/s41580-019-0159-6.
58. Moore, L.D.; Le, T.; Fan, G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacol* **2013**, *38*, 23–38, doi:10.1038/npp.2012.112.

59. Li, Y.; Zheng, H.; Wang, Q.; Zhou, C.; Wei, L.; Liu, X.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Du, Z.; Wang, X.; et al. Genome-Wide Analyses Reveal a Role of Polycomb in Promoting Hypomethylation of DNA Methylation Valleys. *Genome Biol* **2018**, *19*, 18, doi:10.1186/s13059-018-1390-8.
60. Ambrosi, C.; Manzo, M.; Baubec, T. Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *Journal of Molecular Biology* **2017**, *429*, 1459–1475, doi:10.1016/j.jmb.2017.02.008.
61. Bannister, A.J.; Kouzarides, T. Regulation of Chromatin by Histone Modifications. *Cell Res* **2011**, *21*, 381–395, doi:10.1038/cr.2011.22.
62. Audia, J.E.; Campbell, R.M. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2016**, *8*, a019521, doi:10.1101/cshperspect.a019521.
63. Kanwal, R.; Gupta, S. Epigenetic Modifications in Cancer. *Clin Genet* **2012**, *81*, 303–311, doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01809.x.
64. Misteli, T. The Self-Organizing Genome: Principles of Genome Architecture and Function. *Cell* **2020**, *183*, 28–45, doi:10.1016/j.cell.2020.09.014.
65. Luger, K. Nucleosomes: Structure and Function. In; 2001 ISBN 978-0-470-01590-2.
66. Strahl, B.D.; Allis, C.D. The Language of Covalent Histone Modifications. *Nature* **2000**, *403*, 41–45, doi:10.1038/47412.
67. Fischle, W.; Wang, Y.; Allis, C.D. Histone and Chromatin Cross-Talk. *Current Opinion in Cell Biology* **2003**, *15*, 172–183, doi:10.1016/S0955-0674(03)00013-9.
68. Zhang, T.; Cooper, S.; Brockdorff, N. The Interplay of Histone Modifications – Writers That Read. *EMBO Rep* **2015**, *16*, 1467–1481, doi:10.15252/embr.201540945.
69. Hyun, K.; Jeon, J.; Park, K.; Kim, J. Writing, Erasing and Reading Histone Lysine Methylations. *Exp. Mol. Med.* **2017**, *49*, e324, doi:10.1038/emm.2017.11.
70. de la Cruz, X.; Lois, S.; Sánchez-Molina, S.; Martínez-Balbás, M.A. Do Protein Motifs Read the Histone Code? *Bioessays* **2005**, *27*, 164–175, doi:10.1002/bies.20176.
71. Cang, S.; Feng, J.; Konno, S.; Han, L.; Liu, K.; Sharma, S.C.; Choudhury, M.; Chiao, J.W. Deficient Histone Acetylation and Excessive Deacetylase Activity as Epigenomic Marks of Prostate Cancer Cells. *International Journal of Oncology* **2009**, *35*, 1417–1422, doi:10.3892/ijo_00000459.
72. Bannister, A.J.; Schneider, R.; Kouzarides, T. Histone Methylation: Dynamic or Static? *Cell* **2002**, *109*, 801–806, doi:10.1016/S0092-8674(02)00798-5.
73. Mozzetta, C.; Boyarchuk, E.; Pontis, J.; Ait-Si-Ali, S. Sound of Silence: The Properties and Functions of Repressive Lys Methyltransferases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 499–513, doi:10.1038/nrm4029.

74. Black, J.C.; Van Rechem, C.; Whetstine, J.R. Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact. *Mol Cell* **2012**, *48*, 491–507, doi:10.1016/j.molcel.2012.11.006.
75. Shi, Y.; Lan, F.; Matson, C.; Mulligan, P.; Whetstine, J.R.; Cole, P.A.; Casero, R.A.; Shi, Y. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell* **2004**, *119*, 941–953, doi:10.1016/j.cell.2004.12.012.
76. Shi, Y.G.; Tsukada, Y. The Discovery of Histone Demethylases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, a017947, doi:10.1101/cshperspect.a017947.
77. Klose, R.J.; Kallin, E.M.; Zhang, Y. JmjC-Domain-Containing Proteins and Histone Demethylation. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 715–727, doi:10.1038/nrg1945.
78. Tsukada, Y.; Fang, J.; Erdjument-Bromage, H.; Warren, M.E.; Borchers, C.H.; Tempst, P.; Zhang, Y. Histone Demethylation by a Family of JmjC Domain-Containing Proteins. *Nature* **2006**, *439*, 811–816, doi:10.1038/nature04433.
79. Cloos, P.A.C.; Christensen, J.; Agger, K.; Helin, K. Erasing the Methyl Mark: Histone Demethylases at the Center of Cellular Differentiation and Disease. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 1115–1140, doi:10.1101/gad.1652908.
80. Kauffman, E.C.; Robinson, B.D.; Downes, M.J.; Powell, L.G.; Lee, M.M.; Scherr, D.S.; Gudas, L.J.; Mongan, N.P. Role of Androgen Receptor and Associated Lysine-Demethylase Coregulators, LSD1 and JMJD2A, in Localized and Advanced Human Bladder Cancer. *Mol Carcinog* **2011**, *50*, 931–944, doi:10.1002/mc.20758.
81. Cao, R.; Zhang, Y. SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex. *Mol Cell* **2004**, *15*, 57–67, doi:10.1016/j.molcel.2004.06.020.
82. Montgomery, N.D.; Yee, D.; Chen, A.; Kalantry, S.; Chamberlain, S.J.; Otte, A.P.; Magnuson, T. The Murine Polycomb Group Protein Eed Is Required for Global Histone H3 Lysine-27 Methylation. *Curr Biol* **2005**, *15*, 942–947, doi:10.1016/j.cub.2005.04.051.
83. Montgomery, N.D.; Yee, D.; Montgomery, S.A.; Magnuson, T. Molecular and Functional Mapping of EED Motifs Required for PRC2-Dependent Histone Methylation. *J Mol Biol* **2007**, *374*, 1145–1157, doi:10.1016/j.jmb.2007.10.040.
84. O’Meara, M.M.; Simon, J.A. Inner Workings and Regulatory Inputs That Control Polycomb Repressive Complex 2. *Chromosoma* **2012**, *121*, 221–234, doi:10.1007/s00412-012-0361-1.
85. Holoch, D.; Margueron, R. Mechanisms Regulating PRC2 Recruitment and Enzymatic Activity. *Trends Biochem Sci* **2017**, *42*, 531–542, doi:10.1016/j.tibs.2017.04.003.
86. Margueron, R.; Reinberg, D. The Polycomb Complex PRC2 and Its Mark in Life. *Nature* **2011**, *469*, 343–349, doi:10.1038/nature09784.

87. Shi, Y.; Wang, X.; Zhuang, Y.; Jiang, Y.; Melcher, K.; Xu, H.E. Structure of the PRC2 Complex and Application to Drug Discovery. *Acta Pharmacol Sin* **2017**, *38*, 963–976, doi:10.1038/aps.2017.7.
88. Wang, H.; Wang, L.; Erdjument-Bromage, H.; Vidal, M.; Tempst, P.; Jones, R.S.; Zhang, Y. Role of Histone H2A Ubiquitination in Polycomb Silencing. *Nature* **2004**, *431*, 873–878, doi:10.1038/nature02985.
89. Park, S.H.; Fong, K.-W.; Mong, E.; Martin, M.C.; Schiltz, G.E.; Yu, J. Going beyond Polycomb: EZH2 Functions in Prostate Cancer. *Oncogene* **2021**, *40*, 5788–5798, doi:10.1038/s41388-021-01982-4.
90. Sanulli, S.; Justin, N.; Teissandier, A.; Ancelin, K.; Portoso, M.; Caron, M.; Michaud, A.; Lombard, B.; da Rocha, S.T.; Offer, J.; et al. Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation Jarid2. *Mol Cell* **2015**, *57*, 769–783, doi:10.1016/j.molcel.2014.12.020.
91. He, A.; Shen, X.; Ma, Q.; Cao, J.; von Gise, A.; Zhou, P.; Wang, G.; Marquez, V.E.; Orkin, S.H.; Pu, W.T. PRC2 Directly Methylates GATA4 and Represses Its Transcriptional Activity. *Genes Dev* **2012**, *26*, 37–42, doi:10.1101/gad.173930.111.
92. Xu, K.; Wu, Z.J.; Groner, A.C.; He, H.H.; Cai, C.; Lis, R.T.; Wu, X.; Stack, E.C.; Loda, M.; Liu, T.; et al. EZH2 Oncogenic Activity in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Is Polycomb-Independent. *Science* **2012**, *338*, 1465–1469, doi:10.1126/science.1227604.
93. Xu, H.; Xu, K.; He, H.H.; Zang, C.; Chen, C.-H.; Chen, Y.; Qin, Q.; Wang, S.; Wang, C.; Hu, S.; et al. Integrative Analysis Reveals the Transcriptional Collaboration between EZH2 and E2F1 in the Regulation of Cancer-Related Gene Expression. *Mol Cancer Res* **2016**, *14*, 163–172, doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0313.
94. Kim, E.; Kim, M.; Woo, D.-H.; Shin, Y.; Shin, J.; Chang, N.; Oh, Y.T.; Kim, H.; Rhee, J.; Nakano, I.; et al. Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 839–852, doi:10.1016/j.ccr.2013.04.008.
95. Zoma, M.; Curti, L.; Shinde, D.; Albino, D.; Mitra, A.; Sgrignani, J.; Mapelli, S.N.; Sandrini, G.; Civenni, G.; Merulla, J.; et al. EZH2-Induced Lysine K362 Methylation Enhances TMPRSS2-ERG Oncogenic Activity in Prostate Cancer. *Nat Commun* **2021**, *12*, 4147, doi:10.1038/s41467-021-24380-6.
96. Shen, Y.; Cao, J.; Liang, Z.; Lin, Q.; Wang, J.; Yang, X.; Zhang, R.; Zong, J.; Du, X.; Peng, Y.; et al. Estrogen Receptor α -NOTCH1 Axis Enhances Basal Stem-like Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotypes in Prostate Cancer. *Cell Commun Signal* **2019**, *17*, 50, doi:10.1186/s12964-019-0367-x.
97. Shi, B.; Liang, J.; Yang, X.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Wu, H.; Sun, L.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Li, R.; et al. Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Mol Cell Biol* **2007**, *27*, 5105–5119, doi:10.1128/MCB.00162-07.

98. Kim, J.; Lee, Y.; Lu, X.; Song, B.; Fong, K.-W.; Cao, Q.; Licht, J.D.; Zhao, J.C.; Yu, J. Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator. *Cell Rep* **2018**, *25*, 2808–2820.e4, doi:10.1016/j.celrep.2018.11.035.
99. Yi, Y.; Li, Y.; Meng, Q.; Li, Q.; Li, F.; Lu, B.; Shen, J.; Fazli, L.; Zhao, D.; Li, C.; et al. A PRC2-Independent Function for EZH2 in Regulating RRNA 2'-O Methylation and IRES-Dependent Translation. *Nat Cell Biol* **2021**, *23*, 341–354, doi:10.1038/s41556-021-00653-6.
100. Viré, E.; Brenner, C.; Deplus, R.; Blanchon, L.; Fraga, M.; Didelot, C.; Morey, L.; Van Eynde, A.; Bernard, D.; Vanderwinden, J.-M.; et al. The Polycomb Group Protein EZH2 Directly Controls DNA Methylation. *Nature* **2006**, *439*, 871–874, doi:10.1038/nature04431.
101. Kirby, M.K.; Ramaker, R.C.; Roberts, B.S.; Lasseigne, B.N.; Gunther, D.S.; Burwell, T.C.; Davis, N.S.; Gulzar, Z.G.; Absher, D.M.; Cooper, S.J.; et al. Genome-Wide DNA Methylation Measurements in Prostate Tissues Uncovers Novel Prostate Cancer Diagnostic Biomarkers and Transcription Factor Binding Patterns. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 273, doi:10.1186/s12885-017-3252-2.
102. Schlesinger, Y.; Straussman, R.; Keshet, I.; Farkash, S.; Hecht, M.; Zimmerman, J.; Eden, E.; Yakhini, Z.; Ben-Shushan, E.; Reubinoff, B.E.; et al. Polycomb-Mediated Methylation on Lys27 of Histone H3 Pre-Marks Genes for de Novo Methylation in Cancer. *Nat Genet* **2007**, *39*, 232–236, doi:10.1038/ng1950.
103. Takeshima, H.; Wakabayashi, M.; Hattori, N.; Yamashita, S.; Ushijima, T. Identification of Coexistence of DNA Methylation and H3K27me3 Specifically in Cancer Cells as a Promising Target for Epigenetic Therapy. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, 192–201, doi:10.1093/carcin/bgu238.
104. Moison, C.; Assemat, F.; Daunay, A.; Tost, J.; Guieysse-Peugeot, A.-L.; Arimondo, P.B. Synergistic Chromatin Repression of the Tumor Suppressor Gene RARB in Human Prostate Cancers. *Epigenetics* **2014**, *9*, 477–482, doi:10.4161/epi.27869.
105. Bachmann, I.M.; Halvorsen, O.J.; Collett, K.; Stefansson, I.M.; Straume, O.; Haukaas, S.A.; Salvesen, H.B.; Otte, A.P.; Akslen, L.A. EZH2 Expression Is Associated with High Proliferation Rate and Aggressive Tumor Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate, and Breast. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 268–273, doi:10.1200/JCO.2005.01.5180.
106. Bracken, A.P.; 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.* **2003**, *22*, 5323–5335, doi:10.1093/emboj/cdg542.
107. Abdelrahman, A.E.; Arafa, S.A.; Ahmed, R.A. Prognostic Value of Twist-1, E-Cadherin and EZH2 in Prostate Cancer: An Immunohistochemical Study. *Turk Patoloji Derg* **2017**, *1*, 198–210, doi:10.5146/tjpath.2016.01392.
108. Berezovska, O.P.; Glinskii, A.B.; Yang, Z.; Li, X.-M.; Hoffman, R.M.; Glinsky, G.V. Essential Role for Activation of the Polycomb Group (PcG) Protein Chromatin Silencing

- Pathway in Metastatic Prostate Cancer. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 1886–1901, doi:10.4161/cc.5.16.3222.
109. Bryant, R.J.; Cross, N.A.; Eaton, C.L.; Hamdy, F.C.; Cunliffe, V.T. EZH2 Promotes Proliferation and Invasiveness of Prostate Cancer Cells. *Prostate* **2007**, *67*, 547–556, doi:10.1002/pros.20550.
110. Filon, M.; Gawdzik, J.; Truong, A.; Allen, G.; Huang, W.; Khemees, T.; Machhi, R.; Lewis, P.; Yang, B.; Denu, J.; et al. Tandem Histone Methyltransferase Upregulation Defines a Unique Aggressive Prostate Cancer Phenotype. *Br J Cancer* **2021**, *125*, 247–254, doi:10.1038/s41416-021-01398-7.
111. Karanikolas, B.D.W.; Figueiredo, M.L.; Wu, L. Comprehensive Evaluation of the Role of EZH2 in the Growth, Invasion, and Aggression of a Panel of Prostate Cancer Cell Lines. *Prostate* **2010**, *70*, 675–688, doi:10.1002/pros.21112.
112. Matsika, A.; Srinivasan, B.; Day, C.; Mader, S.A.; Kiernan, D.M.; Broomfield, A.; Fu, J.; Hooper, J.D.; Kench, J.G.; Samaratinga, H. Cancer Stem Cell Markers in Prostate Cancer: An Immunohistochemical Study of ALDH1, SOX2 and EZH2. *Pathology* **2015**, *47*, 622–628, doi:10.1097/PAT.0000000000000325.
113. Melling, N.; Thomsen, E.; Tsourlakis, M.C.; Kluth, M.; Hube-Magg, C.; Minner, S.; Koop, C.; Graefen, M.; Heinzer, H.; Wittmer, C.; et al. Overexpression of Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Characterizes an Aggressive Subset of Prostate Cancers and Predicts Patient Prognosis Independently from Pre- and Postoperatively Assessed Clinicopathological Parameters. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, 1333–1340, doi:10.1093/carcin/bgv137.
114. Ngollo, M.; Lebert, A.; Dagdemir, A.; Judes, G.; Karsli-Ceppioglu, S.; Daures, M.; Kemeny, J.-L.; Penault-Llorca, F.; Boiteux, J.-P.; Bignon, Y.-J.; et al. The Association between Histone 3 Lysine 27 Trimethylation (H3K27me3) and Prostate Cancer: Relationship with Clinicopathological Parameters. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 994, doi:10.1186/1471-2407-14-994.
115. Rhodes, D.R.; Sanda, M.G.; Otte, A.P.; Chinnaiyan, A.M.; Rubin, M.A. Multiplex Biomarker Approach for Determining Risk of Prostate-Specific Antigen-Defined Recurrence of Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* **2003**, *95*, 661–668, doi:10.1093/jnci/95.9.661.
116. Saramäki, O.R.; Tammela, T.L.J.; Martikainen, P.M.; Vessella, R.L.; Visakorpi, T. The Gene for Polycomb Group Protein Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Is Amplified in Late-Stage Prostate Cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **2006**, *45*, 639–645, doi:10.1002/gcc.20327.
117. Stanbrough, M.; Bubley, G.J.; Ross, K.; Golub, T.R.; Rubin, M.A.; Penning, T.M.; Febbo, P.G.; Balk, S.P. Increased Expression of Genes Converting Adrenal Androgens to Testosterone in Androgen-Independent Prostate Cancer. *Cancer Res* **2006**, *66*, 2815–2825, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4000.

118. Tonini, T.; Bagella, L.; D'Andrilli, G.; Claudio, P.P.; Giordano, A. Ezh2 Reduces the Ability of HDAC1-Dependent PRb2/P130 Transcriptional Repression of Cyclin A. *Oncogene* **2004**, *23*, 4930–4937, doi:10.1038/sj.onc.1207608.
119. van Leenders, G.J.L.H.; Dukers, D.; Hessels, D.; van den Kieboom, S.W.M.; Hulsbergen, C.A.; Witjes, J.A.; Otte, A.P.; Meijer, C.J.; Raaphorst, F.M. Polycomb-Group Oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 Are Overexpressed in Prostate Cancer with Adverse Pathologic and Clinical Features. *Eur Urol* **2007**, *52*, 455–463, doi:10.1016/j.eururo.2006.11.020.
120. Karanikolas, B.D.W.; Figueiredo, M.L.; Wu, L. Polycomb Group Protein Enhancer of Zeste 2 Is an Oncogene That Promotes the Neoplastic Transformation of a Benign Prostatic Epithelial Cell Line. *Mol. Cancer Res.* **2009**, *7*, 1456–1465, doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0121.
121. Chen, H.; Tu, S.; Hsieh, J.-T. Down-Regulation of Human DAB2IP Gene Expression Mediated by Polycomb Ezh2 Complex and Histone Deacetylase in Prostate Cancer. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 22437–22444, doi:10.1074/jbc.M501379200.
122. Jacobs, C.; Tumati, V.; Kapur, P.; Yan, J.; Xie, X.; Hannan, R.; Hsieh, J.; Kim, D.W.N.; Saha, D. Pretreatment Biopsy Analysis of DAB2IP Identifies Subpopulation of High-risk Prostate Cancer Patients with Worse Survival Following Radiation Therapy. *Cancer Med* **2015**, *4*, 1844–1852, doi:10.1002/cam4.554.
123. Min, J.; Zaslavsky, A.; Fedele, G.; McLaughlin, S.K.; Reczek, E.E.; De Raedt, T.; Guney, I.; Strohlic, D.E.; Macconail, L.E.; Beroukhim, R.; et al. An Oncogene-Tumor Suppressor Cascade Drives Metastatic Prostate Cancer by Coordinately Activating Ras and Nuclear Factor-KappaB. *Nat Med* **2010**, *16*, 286–294, doi:10.1038/nm.2100.
124. Pommier, A.J.C.; Dufour, J.; Alves, G.; Viennois, E.; De Boussac, H.; Trousson, A.; Volle, D.H.; Caira, F.; Val, P.; Arnaud, P.; et al. Liver x Receptors Protect from Development of Prostatic Intra-Epithelial Neoplasia in Mice. *PLoS Genet* **2013**, *9*, e1003483, doi:10.1371/journal.pgen.1003483.
125. Yu, J.; Cao, Q.; Mehra, R.; Laxman, B.; Yu, J.; Tomlins, S.A.; Creighton, C.J.; Dhanasekaran, S.M.; Shen, R.; Chen, G.; et al. Integrative Genomics Analysis Reveals Silencing of Beta-Adrenergic Signaling by Polycomb in Prostate Cancer. *Cancer Cell* **2007**, *12*, 419–431, doi:10.1016/j.ccr.2007.10.016.
126. Kwon, D.H.; Zhang, L.; Quigley, D.A.; Foye, A.; Chen, W.S.; Wong, C.K.; Feng, F.Y.; Bailey, A.; Huang, J.; Stuart, J.M.; et al. Down-Regulation of ADRB2 Expression Is Associated with Small Cell Neuroendocrine Prostate Cancer and Adverse Clinical Outcomes in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Urol Oncol* **2020**, *38*, 931.e9-931.e16, doi:10.1016/j.urolonc.2020.06.002.
127. Fujii, S.; Ito, K.; Ito, Y.; Ochiai, A. Enhancer of Zeste Homologue 2 (EZH2) down-Regulates RUNX3 by Increasing Histone H3 Methylation. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 17324–17332, doi:10.1074/jbc.M800224200.
128. Takayama, K.; Suzuki, T.; Tsutsumi, S.; Fujimura, T.; Urano, T.; Takahashi, S.; Homma, Y.; Aburatani, H.; Inoue, S. RUNX1, an Androgen- and EZH2-Regulated Gene, Has

- Differential Roles in AR-Dependent and -Independent Prostate Cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 2263–2276, doi:10.18632/oncotarget.2949.
129. Yu, J.; Cao, Q.; Yu, J.; Wu, L.; Dallol, A.; Li, J.; Chen, G.; Grasso, C.; Cao, X.; Lonigro, R.J.; et al. The Neuronal Repellent SLIT2 Is a Target for Repression by EZH2 in Prostate Cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 5370–5380, doi:10.1038/onc.2010.269.
 130. Taniguchi, H.; Jacinto, F.V.; Villanueva, A.; Fernandez, A.F.; Yamamoto, H.; Carmona, F.J.; Puertas, S.; Marquez, V.E.; Shinomura, Y.; Imai, K.; et al. Silencing of Kruppel-like Factor 2 by the Histone Methyltransferase EZH2 in Human Cancer. *Oncogene* **2012**, *31*, 1988–1994, doi:10.1038/onc.2011.387.
 131. Xue, P.; Yan, M.; Wang, K.; Gu, J.; Zhong, B.; Tu, C. Up-Regulation of LINC00665 Facilitates the Malignant Progression of Prostate Cancer by Epigenetically Silencing KLF2 Through EZH2 and LSD1. *Front Oncol* **2021**, *11*, 639060, doi:10.3389/fonc.2021.639060.
 132. Ren, G.; Baritaki, S.; Marathe, H.; Feng, J.; Park, S.; Beach, S.; Bazeley, P.S.; Beshir, A.B.; Fenteany, G.; Mehra, R.; et al. Polycomb Protein EZH2 Regulates Tumor Invasion via the Transcriptional Repression of the Metastasis Suppressor RKIP in Breast and Prostate Cancer. *Cancer Res* **2012**, *72*, 3091–3104, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3546.
 133. Wu, L.; Runkle, C.; Jin, H.-J.; Yu, J.; Li, J.; Yang, X.; Kuzel, T.; Lee, C.; Yu, J. CCN3/NOV Gene Expression in Human Prostate Cancer Is Directly Suppressed by the Androgen Receptor. *Oncogene* **2014**, *33*, 504–513, doi:10.1038/onc.2012.602.
 134. Au, S.L.-K.; Wong, C.C.-L.; Lee, J.M.-F.; Wong, C.-M.; Ng, I.O.-L. EZH2-Mediated H3K27me3 Is Involved in Epigenetic Repression of Deleted in Liver Cancer 1 in Human Cancers. *PLoS One* **2013**, *8*, e68226, doi:10.1371/journal.pone.0068226.
 135. Kunderfranco, P.; Mello-Grand, M.; Cangemi, R.; Pellini, S.; Mensah, A.; Albertini, V.; Malek, A.; Chiorino, G.; Catapano, C.V.; Carbone, G.M. ETS Transcription Factors Control Transcription of EZH2 and Epigenetic Silencing of the Tumor Suppressor Gene Nkx3.1 in Prostate Cancer. *PLoS One* **2010**, *5*, e10547, doi:10.1371/journal.pone.0010547.
 136. Daures, M.; Ngollo, M.; Judes, G.; Rifaï, K.; Kemeny, J.-L.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. The JMJD3 Histone Demethylase and the EZH2 Histone Methyltransferase in Prostate Cancer. *OMICS* **2016**, *20*, 123–125, doi:10.1089/omi.2015.0113.
 137. Idrissou, M.; Daures, M.; Jemia, A.B.; Judes, G.; Rifaï, K.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. EZH2 Histone Methyltransferase and JMJD3 Histone Demethylase Implications in Prostate Cancer. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **2017**, *21*, 751–753, doi:10.1089/omi.2017.0106.
 138. Chakravarthi, B.V.S.K.; Pathi, S.S.; Goswami, M.T.; Cieřlik, M.; Zheng, H.; Nallasivam, S.; Arekapudi, S.R.; Jing, X.; Siddiqui, J.; Athanikar, J.; et al. The MiR-124-Prolyl Hydroxylase P4HA1-MMP1 Axis Plays a Critical Role in Prostate Cancer Progression. *Oncotarget* **2014**, *5*, 6654–6669, doi:10.18632/oncotarget.2208.

139. Zhang, Q.; Padi, S.K.R.; Tindall, D.J.; Guo, B. Polycomb Protein EZH2 Suppresses Apoptosis by Silencing the Proapoptotic MiR-31. *Cell Death Dis* **2014**, *5*, e1486, doi:10.1038/cddis.2014.454.
140. Kuser-Abali, G.; Alptekin, A.; Cinar, B. Overexpression of MYC and EZH2 Cooperates to Epigenetically Silence MST1 Expression. *Epigenetics* **2014**, *9*, 634–643, doi:10.4161/epi.27957.
141. Zhang, Y.; Tong, T. FOXA1 Antagonizes EZH2-Mediated CDKN2A Repression in Carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **2014**, *453*, 172–178, doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.092.
142. Wee, Z.N.; Li, Z.; Lee, P.L.; Lee, S.T.; Lim, Y.P.; Yu, Q. EZH2-Mediated Inactivation of IFN- γ -JAK-STAT1 Signaling Is an Effective Therapeutic Target in MYC-Driven Prostate Cancer. *Cell Rep* **2014**, *8*, 204–216, doi:10.1016/j.celrep.2014.05.045.
143. Shin, Y.J.; Kim, J.-H. The Role of EZH2 in the Regulation of the Activity of Matrix Metalloproteinases in Prostate Cancer Cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e30393, doi:10.1371/journal.pone.0030393.
144. Jia, J.; Li, F.; Tang, X.-S.; Xu, S.; Gao, Y.; Shi, Q.; Guo, W.; Wang, X.; He, D.; Guo, P. Long Noncoding RNA DANCR Promotes Invasion of Prostate Cancer through Epigenetically Silencing Expression of TIMP2/3. *Oncotarget* **2016**, *7*, 37868–37881, doi:10.18632/oncotarget.9350.
145. Zhang, Y.; Zheng, D.; Zhou, T.; Song, H.; Hulsurkar, M.; Su, N.; Liu, Y.; Wang, Z.; Shao, L.; Ittmann, M.; et al. Androgen Deprivation Promotes Neuroendocrine Differentiation and Angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 Pathway in Prostate Cancers. *Nat Commun* **2018**, *9*, 4080, doi:10.1038/s41467-018-06177-2.
146. Zhou, H.; Wu, G.; Ma, X.; Xiao, J.; Yu, G.; Yang, C.; Xu, N.; Zhang, B.; Zhou, J.; Ye, Z.; et al. Attenuation of TGFBR2 Expression and Tumour Progression in Prostate Cancer Involve Diverse Hypoxia-Regulated Pathways. *J Exp Clin Cancer Res* **2018**, *37*, 89, doi:10.1186/s13046-018-0764-9.
147. El Ouardi, D.; Idrissou, M.; Sanchez, A.; Penault-LLorca, F.; Guy, L.; Bignon, Y.-J.; Bernard-Gallon, D. The Inhibition of the Histone Methyltransferase EZH2 by DZNEP or SiRNA Demonstrates Its Involvement in MGMT, TRA2A, RPS6KA2, and U2AF1 Gene Regulation in Prostate Cancer. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **2020**, *24*, 116–118, doi:10.1089/omi.2019.0162.
148. Wang, J.; He, C.; Gao, P.; Wang, S.; Lv, R.; Zhou, H.; Zhou, Q.; Zhang, K.; Sun, J.; Fan, C.; et al. HNF1B-Mediated Repression of SLUG Is Suppressed by EZH2 in Aggressive Prostate Cancer. *Oncogene* **2020**, *39*, 1335–1346, doi:10.1038/s41388-019-1065-2.
149. Shan, J.; Al-Muftah, M.A.; Al-Kowari, M.K.; Abuqaqel, S.W.J.; Al-Rumaihi, K.; Al-Bozom, I.; Li, P.; Chouchane, L. Targeting Wnt/EZH2/MicroRNA-708 Signaling Pathway Inhibits Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer. *Cell Death Discov* **2019**, *5*, 139, doi:10.1038/s41420-019-0218-y.

150. Ma, L.; Yan, Y.; Bai, Y.; Yang, Y.; Pan, Y.; Gang, X.; Karnes, R.J.; Zhang, J.; Lv, Q.; Wu, Q.; et al. Overcoming EZH2 Inhibitor Resistance by Taxane in PTEN-Mutated Cancer. *Theranostics* **2019**, *9*, 5020–5034, doi:10.7150/thno.34700.
151. Liu, Q.; Wang, G.; Li, Q.; Jiang, W.; Kim, J.-S.; Wang, R.; Zhu, S.; Wang, X.; Yan, L.; Yi, Y.; et al. Polycomb Group Proteins EZH2 and EED Directly Regulate Androgen Receptor in Advanced Prostate Cancer. *Int J Cancer* **2019**, *145*, 415–426, doi:10.1002/ijc.32118.
152. Ruan, Y.; Xu, H.; Ji, X.; Zhao, J. BLM Interaction with EZH2 Regulates MDM2 Expression and Is a Poor Prognostic Biomarker for Prostate Cancer. *Am J Cancer Res* **2021**, *11*, 1347–1368.
153. Sun, D.; Layer, R.; Mueller, A.C.; Cichewicz, M.A.; Negishi, M.; Paschal, B.M.; Dutta, A. Regulation of Several Androgen-Induced Genes through the Repression of the MiR-99a/Let-7c/MiR-125b-2 MiRNA Cluster in Prostate Cancer Cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 1448–1457, doi:10.1038/onc.2013.77.
154. Foster, C.S.; Falconer, A.; Dodson, A.R.; Norman, A.R.; Dennis, N.; Fletcher, A.; Southgate, C.; Dowe, A.; Dearnaley, D.; Jhavar, S.; et al. Transcription Factor E2F3 Overexpressed in Prostate Cancer Independently Predicts Clinical Outcome. *Oncogene* **2004**, *23*, 5871–5879, doi:10.1038/sj.onc.1207800.
155. Yu, J.; Yu, J.; Mani, R.-S.; Cao, Q.; Brenner, C.J.; Cao, X.; Wang, X.; Wu, L.; Li, J.; Hu, M.; et al. An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 443–454, doi:10.1016/j.ccr.2010.03.018.
156. Zhu, J.; Yang, D.-R.; Sun, Y.; Qiu, X.; Chang, H.-C.; Li, G.; Shan, Y.; Chang, C. TR4 Nuclear Receptor Alters the Prostate Cancer CD133+ Stem/Progenitor Cell Invasion via Modulating the EZH2-Related Metastasis Gene Expression. *Mol Cancer Ther* **2015**, *14*, 1445–1453, doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0971.
157. Lu, W.; Liu, S.; Li, B.; Xie, Y.; Izban, M.G.; Ballard, B.R.; Sathyanarayana, S.A.; Adunyah, S.E.; Matusik, R.J.; Chen, Z. SKP2 Loss Destabilizes EZH2 by Promoting TRAF6-Mediated Ubiquitination to Suppress Prostate Cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 1364–1373, doi:10.1038/onc.2016.300.
158. Park, J.M.; Lee, J.E.; Park, C.M.; Kim, J.H. USP44 Promotes the Tumorigenesis of Prostate Cancer Cells through EZH2 Protein Stabilization. *Mol Cells* **2019**, *42*, 17–27, doi:10.14348/molcells.2018.0329.
159. Lee, J.E.; Park, C.M.; Kim, J.H. USP7 Deubiquitinates and Stabilizes EZH2 in Prostate Cancer Cells. *Genet Mol Biol* **2020**, *43*, e20190338, doi:10.1590/1678-4685-GMB-2019-0338.
160. Mulholland, D.J.; Tran, L.M.; Li, Y.; Cai, H.; Morim, A.; Wang, S.; Plaisier, S.; Garraway, I.P.; Huang, J.; Graeber, T.G.; et al. Cell Autonomous Role of PTEN in Regulating Castration-Resistant Prostate Cancer Growth. *Cancer Cell* **2011**, *19*, 792–804, doi:10.1016/j.ccr.2011.05.006.

161. Wang, D.; Ding, L.; Wang, L.; Zhao, Y.; Sun, Z.; Karnes, R.J.; Zhang, J.; Huang, H. LncRNA MALAT1 Enhances Oncogenic Activities of EZH2 in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 41045–41055, doi:10.18632/oncotarget.5728.
162. Cao, P.; Deng, Z.; Wan, M.; Huang, W.; Cramer, S.D.; Xu, J.; Lei, M.; Sui, G. MicroRNA-101 Negatively Regulates Ezh2 and Its Expression Is Modulated by Androgen Receptor and HIF-1alpha/HIF-1beta. *Mol Cancer* **2010**, *9*, 108, doi:10.1186/1476-4598-9-108.
163. Varambally, S.; Cao, Q.; Mani, R.-S.; Shankar, S.; Wang, X.; Ateeq, B.; Laxman, B.; Cao, X.; Jing, X.; Ramnarayanan, K.; et al. Genomic Loss of MicroRNA-101 Leads to Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2 in Cancer. *Science* **2008**, *322*, 1695–1699, doi:10.1126/science.1165395.
164. Gandellini, P.; Folini, M.; Longoni, N.; Pennati, M.; Binda, M.; Colecchia, M.; Salvioni, R.; Supino, R.; Moretti, R.; Limonta, P.; et al. MiR-205 Exerts Tumor-Suppressive Functions in Human Prostate through down-Regulation of Protein Kinase Cepsilon. *Cancer Res* **2009**, *69*, 2287–2295, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2894.
165. Kong, D.; Heath, E.; Chen, W.; Cher, M.L.; Powell, I.; Heilbrun, L.; Li, Y.; Ali, S.; Sethi, S.; Hassan, O.; et al. Loss of Let-7 up-Regulates EZH2 in Prostate Cancer Consistent with the Acquisition of Cancer Stem Cell Signatures That Are Attenuated by BR-DIM. *PLoS One* **2012**, *7*, e33729, doi:10.1371/journal.pone.0033729.
166. Liu, C.; Liu, R.; Zhang, D.; Deng, Q.; Liu, B.; Chao, H.-P.; Rycaj, K.; Takata, Y.; Lin, K.; Lu, Y.; et al. MicroRNA-141 Suppresses Prostate Cancer Stem Cells and Metastasis by Targeting a Cohort of pro-Metastasis Genes. *Nat Commun* **2017**, *8*, 14270, doi:10.1038/ncomms14270.
167. Chen, Y.; Gu, M.; Liu, C.; Wan, X.; Shi, Q.; Chen, Q.; Wang, Z. Long Noncoding RNA FOXC2-AS1 Facilitates the Proliferation and Progression of Prostate Cancer via Targeting MiR-1253/EZH2. *Gene* **2019**, *686*, 37–42, doi:10.1016/j.gene.2018.10.085.
168. Erdmann, K.; Kaulke, K.; Thomae, C.; Huebner, D.; Serгон, M.; Froehner, M.; Wirth, M.P.; Fuessel, S. Elevated Expression of Prostate Cancer-Associated Genes Is Linked to down-Regulation of MicroRNAs. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 82, doi:10.1186/1471-2407-14-82.
169. Koh, C.M.; Iwata, T.; Zheng, Q.; Bethel, C.; Yegnasubramanian, S.; De Marzo, A.M. Myc Enforces Overexpression of EZH2 in Early Prostatic Neoplasia via Transcriptional and Post-Transcriptional Mechanisms. *Oncotarget* **2011**, *2*, 669–683, doi:10.18632/oncotarget.327.
170. Dardenne, E.; Beltran, H.; Benelli, M.; Gayvert, K.; Berger, A.; Puca, L.; Cyrta, J.; Sboner, A.; Noorzad, Z.; MacDonald, T.; et al. N-Myc Induces an EZH2-Mediated Transcriptional Program Driving Neuroendocrine Prostate Cancer. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 563–577, doi:10.1016/j.ccell.2016.09.005.
171. Bohrer, L.R.; Chen, S.; Hallstrom, T.C.; Huang, H. Androgens Suppress EZH2 Expression via Retinoblastoma (RB) and P130-Dependent Pathways: A Potential

- Mechanism of Androgen-Refractory Progression of Prostate Cancer. *Endocrinology* **2010**, *151*, 5136–5145, doi:10.1210/en.2010-0436.
172. Zhao, J.C.; Yu, J.; Runkle, C.; Wu, L.; Hu, M.; Wu, D.; Liu, J.S.; Wang, Q.; Qin, Z.S.; Yu, J. Cooperation between Polycomb and Androgen Receptor during Oncogenic Transformation. *Genome Res* **2012**, *22*, 322–331, doi:10.1101/gr.131508.111.
 173. De Santa, F.; Totaro, M.G.; Prosperini, E.; Notarbartolo, S.; Testa, G.; Natoli, G. The Histone H3 Lysine-27 Demethylase Jmjd3 Links Inflammation to Inhibition of Polycomb-Mediated Gene Silencing. *Cell* **2007**, *130*, 1083–1094, doi:10.1016/j.cell.2007.08.019.
 174. Agger, K.; Cloos, P.A.C.; Christensen, J.; Pasini, D.; Rose, S.; Rappsilber, J.; Issaeva, I.; Canaani, E.; Salcini, A.E.; Helin, K. UTX and JMJD3 Are Histone H3K27 Demethylases Involved in HOX Gene Regulation and Development. *Nature* **2007**, *449*, 731–734, doi:10.1038/nature06145.
 175. Gao, Y.; Hyttel, P.; Hall, V.J. Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during Early Porcine Embryonic Development. *Mol Reprod Dev* **2010**, *77*, 540–549, doi:10.1002/mrd.21180.
 176. Hong, S.; Cho, Y.-W.; Yu, L.-R.; Yu, H.; Veenstra, T.D.; Ge, K. Identification of JmjC Domain-Containing UTX and JMJD3 as Histone H3 Lysine 27 Demethylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 18439–18444, doi:10.1073/pnas.0707292104.
 177. Lan, F.; Bayliss, P.E.; Rinn, J.L.; Whetstine, J.R.; Wang, J.K.; Chen, S.; Iwase, S.; Alpatov, R.; Issaeva, I.; Canaani, E.; et al. A Histone H3 Lysine 27 Demethylase Regulates Animal Posterior Development. *Nature* **2007**, *449*, 689–694, doi:10.1038/nature06192.
 178. Lee, M.G.; Villa, R.; Trojer, P.; Norman, J.; Yan, K.-P.; Reinberg, D.; Di Croce, L.; Shiekhattar, R. Demethylation of H3K27 Regulates Polycomb Recruitment and H2A Ubiquitination. *Science* **2007**, *318*, 447–450, doi:10.1126/science.1149042.
 179. Herz, H.-M.; Mohan, M.; Garruss, A.S.; Liang, K.; Takahashi, Y.-H.; Mickey, K.; Voets, O.; Verrijzer, C.P.; Shilatifard, A. Enhancer-Associated H3K4 Monomethylation by Trithorax-Related, the Drosophila Homolog of Mammalian Mll3/Mll4. *Genes Dev* **2012**, *26*, 2604–2620, doi:10.1101/gad.201327.112.
 180. Kim, E.; Song, J.-J. Diverse Ways to Be Specific: A Novel Zn-Binding Domain Confers Substrate Specificity to UTX/KDM6A Histone H3 Lys 27 Demethylase. *Genes Dev* **2011**, *25*, 2223–2226, doi:10.1101/gad.179473.111.
 181. Sengoku, T.; Yokoyama, S. Structural Basis for Histone H3 Lys 27 Demethylation by UTX/KDM6A. *Genes Dev* **2011**, *25*, 2266–2277, doi:10.1101/gad.172296.111.
 182. Terashima, M.; Ishimura, A.; Yoshida, M.; Suzuki, Y.; Sugano, S.; Suzuki, T. The Tumor Suppressor Rb and Its Related Rbl2 Genes Are Regulated by Utx Histone Demethylase. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *399*, 238–244, doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.061.

183. Wang, J.K.; Tsai, M.-C.; Poulin, G.; Adler, A.S.; Chen, S.; Liu, H.; Shi, Y.; Chang, H.Y. The Histone Demethylase UTX Enables RB-Dependent Cell Fate Control. *Genes Dev* **2010**, *24*, 327–332, doi:10.1101/gad.1882610.
184. Shen, Y.; Guo, X.; Wang, Y.; Qiu, W.; Chang, Y.; Zhang, A.; Duan, X. Expression and Significance of Histone H3K27 Demethylases in Renal Cell Carcinoma. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 470, doi:10.1186/1471-2407-12-470.
185. Lederer, D.; Grisart, B.; Digilio, M.C.; Benoit, V.; Crespin, M.; Ghariani, S.C.; Maystadt, I.; Dallapiccola, B.; Verellen-Dumoulin, C. Deletion of KDM6A, a Histone Demethylase Interacting with MLL2, in Three Patients with Kabuki Syndrome. *Am J Hum Genet* **2012**, *90*, 119–124, doi:10.1016/j.ajhg.2011.11.021.
186. Miller, S.A.; Mohn, S.E.; Weinmann, A.S. Jmjd3 and UTX Play a Demethylase-Independent Role in Chromatin Remodeling to Regulate T-Box Family Member-Dependent Gene Expression. *Molecular Cell* **2010**, *40*, 594–605, doi:10.1016/j.molcel.2010.10.028.
187. Wang, C.; Lee, J.-E.; Cho, Y.-W.; Xiao, Y.; Jin, Q.; Liu, C.; Ge, K. UTX Regulates Mesoderm Differentiation of Embryonic Stem Cells Independent of H3K27 Demethylase Activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 15324–15329, doi:10.1073/pnas.1204166109.
188. van Haaften, G.; Dalgliesh, G.L.; Davies, H.; Chen, L.; Bignell, G.; Greenman, C.; Edkins, S.; Hardy, C.; O’Meara, S.; Teague, J.; et al. Somatic Mutations of the Histone H3K27 Demethylase Gene UTX in Human Cancer. *Nat Genet* **2009**, *41*, 521–523, doi:10.1038/ng.349.
189. Grasso, C.S.; Wu, Y.-M.; Robinson, D.R.; Cao, X.; Dhanasekaran, S.M.; Khan, A.P.; Quist, M.J.; Jing, X.; Lonigro, R.J.; Brenner, J.C.; et al. The Mutational Landscape of Lethal Castration-Resistant Prostate Cancer. *Nature* **2012**, *487*, 239–243, doi:10.1038/nature11125.
190. Tamgue, O.; Lei, M. Triptolide Promotes Senescence of Prostate Cancer Cells Through Histone Methylation and Heterochromatin Formation. *Asian Pac J Cancer Prev* **2017**, *18*, 2519–2526, doi:10.22034/APJCP.2017.18.9.2519.
191. Rotili, D.; Tomassi, S.; Conte, M.; Benedetti, R.; Tortorici, M.; Ciossani, G.; Valente, S.; Marrocco, B.; Labella, D.; Novellino, E.; et al. Pan-Histone Demethylase Inhibitors Simultaneously Targeting Jumonji C and Lysine-Specific Demethylases Display High Anticancer Activities. *J Med Chem* **2014**, *57*, 42–55, doi:10.1021/jm4012802.
192. Giordano, A.; Del Gaudio, F.; Johansson, C.; Riccio, R.; Oppermann, U.; Di Micco, S. Virtual Fragment Screening Identification of a Quinoline-5,8-Dicarboxylic Acid Derivative as a Selective JMJD3 Inhibitor. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1160–1164, doi:10.1002/cmdc.201800198.
193. Giordano, A.; Forte, G.; Terracciano, S.; Russo, A.; Sala, M.; Scala, M.C.; Johansson, C.; Oppermann, U.; Riccio, R.; Bruno, I.; et al. Identification of the 2-Benzoxazol-2-Yl-Phenol Scaffold as New Hit for JMJD3 Inhibition. *ACS Med Chem Lett* **2019**, *10*, 601–605, doi:10.1021/acsmchemlett.8b00589.

194. Miranda, T.B.; Cortez, C.C.; Yoo, C.B.; Liang, G.; Abe, M.; Kelly, T.K.; Marquez, V.E.; Jones, P.A. DZNep Is a Global Histone Methylation Inhibitor That Reactivates Developmental Genes Not Silenced by DNA Methylation. *Mol Cancer Ther* **2009**, *8*, 1579–1588, doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0013.
195. Crea, F.; Hurt, E.M.; Mathews, L.A.; Cabarcas, S.M.; Sun, L.; Marquez, V.E.; Danesi, R.; Farrar, W.L. Pharmacologic Disruption of Polycomb Repressive Complex 2 Inhibits Tumorigenicity and Tumor Progression in Prostate Cancer. *Mol Cancer* **2011**, *10*, 40, doi:10.1186/1476-4598-10-40.
196. Kirk, J.S.; Schaarschuch, K.; Dalimov, Z.; Lasorsa, E.; Ku, S.; Ramakrishnan, S.; Hu, Q.; Azabdaftari, G.; Wang, J.; Pili, R.; et al. Top2a Identifies and Provides Epigenetic Rationale for Novel Combination Therapeutic Strategies for Aggressive Prostate Cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 3136–3146, doi:10.18632/oncotarget.3077.
197. Tan, J.; Yan, Y.; Wang, X.; Jiang, Y.; Xu, H.E. EZH2: Biology, Disease, and Structure-Based Drug Discovery. *Acta Pharmacol Sin* **2014**, *35*, 161–174, doi:10.1038/aps.2013.161.
198. Knutson, S.K.; Kawano, S.; Minoshima, Y.; Warholic, N.M.; Huang, K.-C.; Xiao, Y.; Kadowaki, T.; Uesugi, M.; Kuznetsov, G.; Kumar, N.; et al. Selective Inhibition of EZH2 by EPZ-6438 Leads to Potent Antitumor Activity in EZH2-Mutant Non-Hodgkin Lymphoma. *Mol Cancer Ther* **2014**, *13*, 842–854, doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0773.
199. Italiano, A.; Soria, J.-C.; Toulmonde, M.; Michot, J.-M.; Lucchesi, C.; Varga, A.; Coindre, J.-M.; Blakemore, S.J.; Clawson, A.; Suttle, B.; et al. Tazemetostat, an EZH2 Inhibitor, in Relapsed or Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma and Advanced Solid Tumours: A First-in-Human, Open-Label, Phase 1 Study. *Lancet Oncol* **2018**, *19*, 649–659, doi:10.1016/S1470-2045(18)30145-1.
200. Hoy, S.M. Tazemetostat: First Approval. *Drugs* **2020**, *80*, 513–521, doi:10.1007/s40265-020-01288-x.
201. Kim, W.; Bird, G.H.; Neff, T.; Guo, G.; Kerenyi, M.A.; Walensky, L.D.; Orkin, S.H. Targeted Disruption of the EZH2-EED Complex Inhibits EZH2-Dependent Cancer. *Nat Chem Biol* **2013**, *9*, 643–650, doi:10.1038/nchembio.1331.
202. Wan, L.; Xu, K.; Wei, Y.; Zhang, J.; Han, T.; Fry, C.; Zhang, Z.; Wang, Y.V.; Huang, L.; Yuan, M.; et al. Phosphorylation of EZH2 by AMPK Suppresses PRC2 Methyltransferase Activity and Oncogenic Function. *Mol Cell* **2018**, *69*, 279–291.e5, doi:10.1016/j.molcel.2017.12.024.
203. Sanchez, A.; El Ouardi, D.; Houfah Khoufah, F.Z.; Idrissou, M.; Boisnier, T.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. Role of JMJD3 Demethylase and Its Inhibitor GSK-J4 in Regulation of MGMT, TRA2A, RPS6KA2, and U2AF1 Genes in Prostate Cancer Cell Lines. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **2020**, *24*, 505–507, doi:10.1089/omi.2020.0054.
204. Cunningham, D.; You, Z. In Vitro and in Vivo Model Systems Used in Prostate Cancer Research. *J Biol Methods* **2015**, *2*, e17, doi:10.14440/jbm.2015.63.

205. Lee, J.T.; Steelman, L.S.; Chappell, W.H.; McCubrey, J.A. Akt Inactivates ERK Causing Decreased Response to Chemotherapeutic Drugs in Advanced CaP Cells. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 631–636, doi:10.4161/cc.7.5.5416.
206. Sharma, S.; Salehi, F.; Scheithauer, B.W.; Rotondo, F.; Syro, L.V.; Kovacs, K. Role of MGMT in Tumor Development, Progression, Diagnosis, Treatment and Prognosis. *Anticancer Res* **2009**, *29*, 3759–3768.
207. Feng, J.; Wang, Q.; Li, G.; Zeng, X.; Kuang, S.; Li, X.; Yue, Y. TET1-Mediated Different Transcriptional Regulation in Prostate Cancer. *Int J Clin Exp Med* **2015**, *8*, 203–211.
208. Kondo, Y.; Shen, L.; Issa, J.-P.J. Critical Role of Histone Methylation in Tumor Suppressor Gene Silencing in Colorectal Cancer. *Mol Cell Biol* **2003**, *23*, 206–215, doi:10.1128/MCB.23.1.206-215.2003.
209. Esteller, M.; Herman, J.G. Generating Mutations but Providing Chemosensitivity: The Role of O6-Methylguanine DNA Methyltransferase in Human Cancer. *Oncogene* **2004**, *23*, 1–8, doi:10.1038/sj.onc.1207316.
210. Demircan Tan, B.; Turan, T.; Yucel, B.; Altundag Kara, S.; Salman Yilmaz, S.; Yildirim, A. Aberrant SOCS3 Promoter Methylation as a Noninvasive Diagnostic Biomarker for Locally Advanced Prostate Cancer. *Medeni Med J* **2020**, *35*, 99–105, doi:10.5222/MMJ.2020.58708.
211. Bánfi, G.; Teleki, I.; Nyirády, P.; Keszthelyi, A.; Romics, I.; Fintha, A.; Krenács, T.; Szende, B. Changes of Protein Expression in Prostate Cancer Having Lost Its Androgen Sensitivity. *Int Urol Nephrol* **2015**, *47*, 1149–1154, doi:10.1007/s11255-015-0985-1.
212. Mishra, D.K.; Chen, Z.; Wu, Y.; Sarkissyan, M.; Koeffler, H.P.; Vadgama, J.V. Global Methylation Pattern of Genes in Androgen-Sensitive and Androgen-Independent Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* **2010**, *9*, 33–45, doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0486.
213. Palangat, M.; Anastasakis, D.G.; Fei, D.L.; Lindblad, K.E.; Bradley, R.; Hourigan, C.S.; Hafner, M.; Larson, D.R. The Splicing Factor U2AF1 Contributes to Cancer Progression through a Noncanonical Role in Translation Regulation. *Genes Dev.* **2019**, *33*, 482–497, doi:10.1101/gad.319590.118.
214. Cao, H.; Wang, D.; Gao, R.; Chen, L.; Feng, Y. Down Regulation of U2AF1 Promotes ARV7 Splicing and Prostate Cancer Progression. *Biochem Biophys Res Commun* **2021**, *541*, 56–62, doi:10.1016/j.bbrc.2020.12.111.
215. Zhao, X.; Chen, Q.; Cai, Y.; Chen, D.; Bei, M.; Dong, H.; Xu, J. TRA2A Binds With LncRNA MALAT1 To Promote Esophageal Cancer Progression By Regulating EZH2/ β -Catenin Pathway. *J Cancer* **2021**, *12*, 4883–4890, doi:10.7150/jca.55661.
216. Tan, Y.; Hu, X.; Deng, Y.; Yuan, P.; Xie, Y.; Wang, J. TRA2A Promotes Proliferation, Migration, Invasion and Epithelial Mesenchymal Transition of Glioma Cells. *Brain Res Bull* **2018**, *143*, 138–144, doi:10.1016/j.brainresbull.2018.10.006.

217. Pérez-Ramírez, M.; Hernández-Jiménez, A.J.; Guerrero-Guerrero, A.; Siordia-Reyes, A.G.; Hernández-Caballero, M.E.; García-Méndez, A.; Chico-Ponce de León, F.; Salamanca-Gómez, F.A.; García-Hernández, N. Pediatric Pineal Germinomas: Epigenetic and Genomic Approach. *Clin Neurol Neurosurg* **2017**, *152*, 45–51, doi:10.1016/j.clineuro.2016.11.012.
218. Liu, T.; Sun, H.; Zhu, D.; Dong, X.; Liu, F.; Liang, X.; Chen, C.; Shao, B.; Wang, M.; Wang, Y.; et al. TRA2A Promoted Paclitaxel Resistance and Tumor Progression in Triple-Negative Breast Cancers via Regulating Alternative Splicing. *Mol Cancer Ther* **2017**, *16*, 1377–1388, doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0026.
219. Katsuta, E.; Huyser, M.; Yan, L.; Takabe, K. A Prognostic Score Based on Long-Term Survivor Unique Transcriptomic Signatures Predicts Patient Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Am J Cancer Res* **2021**, *11*, 4294–4307.
220. Anjum, R.; Blenis, J. The RSK Family of Kinases: Emerging Roles in Cellular Signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9*, 747–758, doi:10.1038/nrm2509.
221. Clark, D.E.; Errington, T.M.; Smith, J.A.; Frierson, H.F.; Weber, M.J.; Lannigan, D.A. The Serine/Threonine Protein Kinase, P90 Ribosomal S6 Kinase, Is an Important Regulator of Prostate Cancer Cell Proliferation. *Cancer Res* **2005**, *65*, 3108–3116, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3151.
222. Serra, V.; Eichhorn, P.J.A.; García-García, C.; Ibrahim, Y.H.; Prudkin, L.; Sánchez, G.; Rodríguez, O.; Antón, P.; Parra, J.-L.; Marlow, S.; et al. RSK3/4 Mediate Resistance to PI3K Pathway Inhibitors in Breast Cancer. *J Clin Invest* **2013**, *123*, 2551–2563, doi:10.1172/JCI66343.
223. Slattery, M.L.; Lundgreen, A.; Herrick, J.S.; Wolff, R.K. Genetic Variation in RPS6KA1, RPS6KA2, RPS6KB1, RPS6KB2, and PDK1 and Risk of Colon or Rectal Cancer. *Mutat Res* **2011**, *706*, 13–20, doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.10.005.
224. Bignone, P.A.; Lee, K.Y.; Liu, Y.; Emilion, G.; Finch, J.; Soosay, A.E.R.; Charnock, F.M.L.; Beck, S.; Dunham, I.; Mungall, A.J.; et al. RPS6KA2, a Putative Tumour Suppressor Gene at 6q27 in Sporadic Epithelial Ovarian Cancer. *Oncogene* **2007**, *26*, 683–700, doi:10.1038/sj.onc.1209827.
225. Duan, Z.; Zou, J.X.; Yang, P.; Wang, Y.; Borowsky, A.D.; Gao, A.C.; Chen, H.-W. Developmental and Androgenic Regulation of Chromatin Regulators EZH2 and ANCCA/ATAD2 in the Prostate Via MLL Histone Methylase Complex. *Prostate* **2013**, *73*, 455–466, doi:10.1002/pros.22587.
226. Shankar, E.; Franco, D.; Iqbal, O.; Moreton, S.; Kanwal, R.; Gupta, S. Dual Targeting of EZH2 and Androgen Receptor as a Novel Therapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* **2020**, *404*, 115200, doi:10.1016/j.taap.2020.115200.
227. Yildirim-Buharalioglu, G. KDM6B Regulates Prostate Cancer Cell Proliferation by Controlling C-MYC Expression. *Mol Pharmacol* **2021**, MOLPHARM-AR-2021-000372, doi:10.1124/molpharm.121.000372.

228. De Santa, F.; Narang, V.; Yap, Z.H.; Tusi, B.K.; Burgold, T.; Austenaa, L.; Bucci, G.; Caganova, M.; Notarbartolo, S.; Casola, S.; et al. Jmjd3 Contributes to the Control of Gene Expression in LPS-Activated Macrophages. *EMBO J* **2009**, *28*, 3341–3352, doi:10.1038/emboj.2009.271.
229. Zhao, W.; Li, Q.; Ayers, S.; Gu, Y.; Shi, Z.; Zhu, Q.; Chen, Y.; Wang, H.Y.; Wang, R.-F. Jmjd3 Inhibits Reprogramming by Upregulating Expression of INK4a/Arf and Targeting PHF20 for Ubiquitination. *Cell* **2013**, *152*, 1037–1050, doi:10.1016/j.cell.2013.02.006.
230. Houfaf Khoufaf, F.Z.; Sanchez, A.; Idrissou, M.; Boisnier, T.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. Role of UTX Histone Demethylase in Regulation of MGMT, TRA2A, U2AF1, and RPS6KA2 Genes in Prostate Cancer Cell Lines. *OMICS* **2021**, *25*, 129–131, doi:10.1089/omi.2020.0183.
231. Sanchez, A.; Houfaf Khoufaf, F.Z.; Idrissou, M.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. The Functions of the Demethylase JMJD3 in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 968, doi:10.3390/ijms22020968.
232. Hashizume, R.; Andor, N.; Ihara, Y.; Lerner, R.; Gan, H.; Chen, X.; Fang, D.; Huang, X.; Tom, M.W.; Ngo, V.; et al. Pharmacologic Inhibition of Histone Demethylation as a Therapy for Pediatric Brainstem Glioma. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1394–1396, doi:10.1038/nm.3716.
233. Ramaswamy, V.; Remke, M.; Taylor, M.D. An Epigenetic Therapy for Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1378–1379, doi:10.1038/nm.3769.
234. Lochmann, T.L.; Powell, K.M.; Ham, J.; Floros, K.V.; Heisey, D.A.R.; Kurupi, R.I.J.; Calbert, M.L.; Ghotra, M.S.; Greninger, P.; Dozmorov, M.; et al. Targeted Inhibition of Histone H3K27 Demethylation Is Effective in High-Risk Neuroblastoma. *Sci Transl Med* **2018**, *10*, eaao4680, doi:10.1126/scitranslmed.aao4680.
235. Illiano, M.; Conte, M.; Sapio, L.; Nebbioso, A.; Spina, A.; Altucci, L.; Naviglio, S. Forskolin Sensitizes Human Acute Myeloid Leukemia Cells to H3K27me2/3 Demethylases GSKJ4 Inhibitor via Protein Kinase A. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 792, doi:10.3389/fphar.2018.00792.
236. Yan, N.; Xu, L.; Wu, X.; Zhang, L.; Fei, X.; Cao, Y.; Zhang, F. GSKJ4, an H3K27me3 Demethylase Inhibitor, Effectively Suppresses the Breast Cancer Stem Cells. *Exp. Cell Res.* **2017**, *359*, 405–414, doi:10.1016/j.yexcr.2017.08.024.
237. Nagarsheth, N.; Peng, D.; Kryczek, I.; Wu, K.; Li, W.; Zhao, E.; Zhao, L.; Wei, S.; Frankel, T.; Vatan, L.; et al. PRC2 Epigenetically Silences Th1-Type Chemokines to Suppress Effector T-Cell Trafficking in Colon Cancer. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 275–282, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1938.
238. Gad, S.C.; Cassidy, C.D.; Aubert, N.; Spainhour, B.; Robbe, H. Nonclinical Vehicle Use in Studies by Multiple Routes in Multiple Species. *Int J Toxicol* **2006**, *25*, 499–521, doi:10.1080/10915810600961531.

239. Galvao, J.; Davis, B.; Tilley, M.; Normando, E.; Duchon, M.R.; Cordeiro, M.F. Unexpected Low-Dose Toxicity of the Universal Solvent DMSO. *The FASEB Journal* **2014**, *28*, 1317–1330, doi:10.1096/fj.13-235440.
240. Coffey, K.; Rogerson, L.; Ryan-Munden, C.; Alkharaf, D.; Stockley, J.; Heer, R.; Sahadevan, K.; O'Neill, D.; Jones, D.; Darby, S.; et al. The Lysine Demethylase, KDM4B, Is a Key Molecule in Androgen Receptor Signalling and Turnover. *Nucleic Acids Research* **2013**, *41*, 4433–4446, doi:10.1093/nar/gkt106.
241. Svtelisl, A.; Bianco, S.; Madore, J.; Huppé, G.; Nordell-Markovits, A.; Mes-Masson, A.-M.; Gévry, N. H3K27 Demethylation by JMJD3 at a Poised Enhancer of Anti-Apoptotic Gene BCL2 Determines ER α Ligand Dependency. *EMBO J* **2011**, *30*, 3947–3961, doi:10.1038/emboj.2011.284.
242. Vlietstra, R.J.; Alewijk, D.C.J.G. van; Hermans, K.G.L.; Steenbrugge, G.J. van; Trapman, J. Frequent Inactivation of PTEN in Prostate Cancer Cell Lines and Xenografts. *Cancer Res* **1998**, *58*, 2720–2723.
243. Chen, C.-Y.; Chen, J.; He, L.; Stiles, B.L. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2018**, *9*, 338, doi:10.3389/fendo.2018.00338.
244. Wang, S.; Garcia, A.J.; Wu, M.; Lawson, D.A.; Witte, O.N.; Wu, H. Pten Deletion Leads to the Expansion of a Prostatic Stem/Progenitor Cell Subpopulation and Tumor Initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 1480–1485, doi:10.1073/pnas.0510652103.
245. Ha, S.-D.; Cho, W.; Kim, S.O. HDAC8 Prevents Anthrax Lethal Toxin-Induced Cell Cycle Arrest through Silencing PTEN in Human Monocytic THP-1 Cells. *Toxins* **2017**, *9*, 162, doi:10.3390/toxins9050162.
246. Yu, C.; Xiong, C.; Tang, J.; Hou, X.; Liu, N.; Bayliss, G.; Zhuang, S. Histone Demethylase JMJD3 Protects against Renal Fibrosis by Suppressing TGF β and Notch Signaling and Preserving PTEN Expression. *Theranostics* **2021**, *11*, 2706–2721, doi:10.7150/thno.48679.
247. Chantal Dreyer; Eric Raymond; Sandrine Faivre La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. *Cancérodig*. **2009**, *1*, 187, doi:10.4267/2042/28434.
248. Ayala, G.; Thompson, T.; Yang, G.; Frolov, A.; Li, R.; Scardino, P.; Otori, M.; Wheeler, T.; Harper, W. High Levels of Phosphorylated Form of Akt-1 in Prostate Cancer and Non-Neoplastic Prostate Tissues Are Strong Predictors of Biochemical Recurrence. *Clin Cancer Res* **2004**, *10*, 6572–6578, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0477.
249. Whiteside, T. The Tumor Microenvironment and Its Role in Promoting Tumor Growth. *Oncogene* **2008**, *27*, 5904–5912, doi:10.1038/onc.2008.271.
250. Jun, J.C.; Rathore, A.; Younas, H.; Gilkes, D.; Polotsky, V.Y. Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. *Curr Sleep Med Rep* **2017**, *3*, 1–10, doi:10.1007/s40675-017-0062-7.
251. Zhong, H.; Agani, F.; Baccala, A.A.; Laughner, E.; Rioseco-Camacho, N.; Isaacs, W.B.; Simons, J.W.; Semenza, G.L. Increased Expression of Hypoxia Inducible Factor-1 α in Rat and Human Prostate Cancer. *Cancer Res* **1998**, *58*, 5280–5284.

WEBOGRAPHIE

<https://www.has-sante.fr/> (29/09/2021)

<https://www.urofrance.org/>

<https://www.cancer-de-la-prostate.fr/>

<https://www.urologie-sante.fr/>

<https://www.e-cancer.fr/> (03/10/2021)

<https://www.santepubliquefrance.fr/> (04/10/2021)

<https://gco.iarc.fr/> (05/10/2021)

<https://www.hifu-prostate.fr/>

<https://www.cancer.net/>

<http://cancer.ca/fr>

<https://clincancerres.aacrjournals.org/>

<https://www.urotoday.com/>

<https://www.anses.fr/fr> (le 29/10/2021)

Résumé

Le cancer de la prostate est le deuxième cancer le plus fréquent chez l'homme dans le monde. Les changements épigénétiques en réponse à des événements externes (alimentation, activités sportives, etc.) et internes sont de plus en plus impliqués dans l'initiation et la progression des tumeurs. La dérégulation des mécanismes épigénétiques conduit à une modification de la compaction de la chromatine et par conséquent, de l'expression de gènes ayant potentiellement un pouvoir oncogène ou suppresseur de tumeur. Cette thèse s'intéresse aux modifications post-traductionnelles des histones et, plus particulièrement, à la tri méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) dans le cancer de la prostate. H3K27me3 est une marque épigénétique répressive souvent sous- ou surexprimée dans un large éventail de cancers. Trois acteurs régulent la méthylation de H3K27: La méthyltransférase EZH2 et les déméthylases JMJD3 et UTX. Premièrement, grâce à l'utilisation d'épidrogues et de siARNs dirigés spécifiquement contre ces trois acteurs, nous avons montré *in vitro* qu'EZH2, JMJD3 et UTX étaient impliquées dans la régulation des gènes *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* et *RPS6KA2*, précédemment établis comme étant une signature génique du cancer de la prostate. Cette étude *in vitro* a également permis de mettre en évidence un possible lien entre EZH2, JMJD3 et le récepteur aux androgènes. Ensuite, H3K27me3 et EZH2 étant largement étudiées, notre étude s'est focalisée sur JMJD3. Après inhibition de JMJD3 *in vivo* par son inhibiteur chimique, GSK-J4, nous avons obtenu une augmentation de la croissance tumorale dans les xénogreffes RA- et à une diminution dans les xénogreffes RA+, ajoutant une preuve d'un possible lien entre le récepteur aux androgènes et JMJD3. La caractérisation des altérations épigénétiques comme l'expression aberrante de H3K27me3 dans le cancer de la prostate est indispensable pour identifier de nouveaux marqueurs de diagnostic. La compréhension du rôle de H3K27me3, EZH2, JMJD3 et UTX dans la progression tumorale prostatique reste importante en vue de l'utilisation d'épidrogues qui pourrait prochainement devenir une nouvelle stratégie thérapeutique.

Mots clés: Epigénétique, Cancer de la prostate, JMJD3, EZH2, H3K27me3, Épidrogues

Abstract

Prostate cancer is the second most common cancer among men in the world. Epigenetic changes in response to external (diet, sports activities, etc.) and internal events are increasingly implicated in tumor initiation and progression. The deregulation of epigenetic mechanisms leads to a modification of chromatin compaction and, consequently, of gene expression with oncogenic or tumor suppressor potential. In this thesis, we focused on post-translational changes in histones and, more particularly, the tri methylation of lysine from histone 3 (H3K27me3) mark, a repressive epigenetic mark often under- or overexpressed in a wide range of cancers. Three actors regulate H3K27 methylation: EZH2 methyltransferase and JMJD3 and UTX demethylases. First, using epidrugs and siRNAs specifically directed against these three actors, we showed *in vitro* that EZH2, JMJD3 and UTX were involved in the regulation of *MGMT*, *TRA2A*, *U2AF1* and *RPS6KA2* genes, previously established as a gene signature in prostate cancer. This *in vitro* study also revealed a possible link between EZH2, JMJD3 and the androgen receptor. Then, H3K27me3 and EZH2 being widely studied, our study focused on JMJD3. JMJD3 inhibition *in vivo* contributed to an increase in tumor growth in AR- xenografts and a decrease in AR+, providing further evidence of a possible link between the androgen receptor and JMJD3. Characterization of epigenetic alterations such as aberrant H3K27me3 expression in prostate cancer is essential to identify new diagnostic markers. Understanding the role of H3K27me3, EZH2, JMJD3 and UTX on prostate tumor progression is important because the use of epidrugs may soon become a new therapeutic strategy.

Keywords: Epigenetics, Prostate cancer JMJD3, EZH2, H3K27me3, Epidrugs