



UNIVERSITÉ DE LILLE
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ DE LILLE

THÈSE DE DOCTORAT

présentée par : Abdelfettah Souhila

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Pour obtenir le grade de : Docteur en Biologie

Soutenue le : 19 Décembre 2019

**Conséquences fonctionnelles de la
surexpression de l'isoforme courte de la
protéine Polycomb-like hPCL3, hPCL3S dans
les tumeurs prostatiques**

THÈSE DIRIGÉE PAR

M. Dominique LEPRINCE

Docteur, Institut Biologie de Lille

PRÉSIDENT

M. Pierre-Olivier ANGRAND

Professeur, Université de Lille 1

RAPPORTEURS

Mme. Virginie VLAEMINCK-GUILLEM

Docteur, Université de Lyon

M. Pierre-Antoine DEFOSSEZ

Docteur, Université Paris Diderot

EXAMINATEUR

Mme. Rachel DEPLUS

Docteur, Université Libre de Bruxelles

« Tamusni ur nesnarnay ara yal ass tettenghas koulass »

Proverbe Kabyle

« Le savoir que l'on ne complète pas chaque jour diminue tous les jours »

« Knowledge that is not completed every day decreases each day »

Remerciements

Quand on arrive à cette partie on sent que c'est la fin de la thèse et c'est avec beaucoup d'émotions que je la rédige.

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur Yvan De Launoit de m'avoir accueillie et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de l'UMR 8161 à l'institut Biologie de Lille.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury de thèse pour avoir consacré du temps à examiner mon manuscrit, notamment le Dr Virginie Vlaeminck-Guillem et le Dr Pierre-Antoine Defossez en tant que rapporteur, le Pr. Pierre-Olivier Angrand en tant que Président de ce jury et membre de mes CSI de thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide financière de la Ligue Contre le Cancer.

Je remercie infiniment et tout particulièrement mon tuteur le Dr Dominique Leprince de m'avoir accueillie dans son équipe et pour son encadrement. Je le remercie particulièrement pour son souci de formation, sa disponibilité et ses encouragements. Grâce à lui, cette thèse fût une aventure très enrichissante et je lui en suis très reconnaissante.

Merci beaucoup à toi Nathalie Spruyt de m'avoir enseignée avec une grande patience les techniques de qPCR, du clonage à l'ancienne avec des phénols, et oui comme disait le chef ce n'est pas parce c'est une vieille technique quelle n'est pas bonne. Merci pour ta disponibilité, tes conseils et pour tout ce que j'ai appris avec toi pendant ces 4 années passées. Merci pour les photos de clonogénéicité que tu as prise avec une grande patience.....tu sais de quoi je parle hein.

Je remercie le Dr Vanessa Dehennaut pour ses nombreux conseils, ses suggestions, son écoute et sa sympathie tout ça dans la bonne humeur. Tu as su nous faire rire avec ton humour décalé notamment autour du repas de midi. Enfin, j'espère que tu te sers de la « cave a soucisson » pour tes apéros.

Je te remercie Ingrid Loison pour ton aide, pour les manips que tu as réalisées pour moi. Grace à ta gentillesse et ta bonne humeur, tu as su installer une belle ambiance de travail au sein de l'équipe mais aussi au sein de l'UMR notamment grâce au « Yankee Swap » que tu organises. Merci aussi pour tes nombreux pots de granula, tu prépares le meilleur, je te le témoigne !

Amélie ma voisine de paillasse, l'année prochaine ce sera à ton tour, je te souhaite donc bon courage pour la suite de ta thèse. On a partagé des bons

moments notamment au cancéropôle et aux « after work » qui vont rester à jamais gravés dans ma mémoire.

Je remercie également, tous les membres de l'unité 8161, ses chercheurs, ses ingénieurs, techniciens et ses personnels administratifs pour leur accueil et leur gentillesse.

Mes remerciements s'adressent aussi au Dr Xavier Leroy et la tumorothèque de Lille qui nous ont fournis les échantillons biologiques de la prostate.

Merci à Gaylor Boulay je ne te connais pas certes mais c'est toi qui as initié ce travail, tu as commencé avec HIC-1 et voilà tu as ouvert une porte sur un nouveau projet qui est indépendant de HIC-1. Merci pour ta collaboration et les expériences de RNA-seq que tu as réalisé pour nous depuis les USA.

Marion quand je suis arrivée dans l'équipe en M2 tu préparais déjà ta soutenance de thèse, je garde toujours ton manuscrit que tu m'as dédié en me souhaitant de me lancer dans cette aventure. Voilà c'est à mon tour de te dédier la mienne tout en te remerciant pour les expériences que tu as réalisées pour ce projet.

Merci à toute l'équipe de moniteurs de TP de l'université de Lille pour votre disponibilité et votre énorme gentillesse. Grâce à vous j'ai découvert le monde de l'enseignement et sa passion.

Et bien sûr je ne vais pas oublier tous mes collègues du labo avec qui j'ai passé des moments agréables : Sonia, Erwan, Martine, Marie, Alexandre, Sébastien, Abhishek, Philippe et Antony..... merci pour votre amitié.

Un énorme merci à mes parents pour leur soutien, j'espère que vous êtes fières de votre fille. C'est grâce à vous que je suis arrivée là où j'en suis aujourd'hui. Ces pages vous sont dédiées...

Merci également à tous les membres de ma famille qui de près ou de loin m'ont apporté leur soutien, une pensée particulière pour mes sœurs, mes frères et mes belles sœurs qui ont toujours été là pour moi. Je dédie ces pages aussi à mes nièces et mes neveux, vous êtes une source de bonheurs.

Un merci particulier pour Meline qui m'a beaucoup, beaucoup aidé tout long de la rédaction de cette thèse. Oui ... la rédaction avec le latex et meilleure que le Word je l'admet Merci pour ton soutien.

Enfin, je dédie ses pages à ma meilleure amie Sara et je n'oublierai pas de remercier tous les amis que j'ai pu rencontrer durant ces 5 années passées à Lille, une pensée particulière à Mazari, merci de m'avoir permis de découvrir le Nord-Pas-de-Calais et plein d'autres choses que je ne vais pas évoquer ici...

Table des matières

Objectifs de mon projet de thèse	xi
Publications	xi
Table des figures	xiii
Liste des tableaux	xv
Partie I Introduction	1
Chapitre 1	
Cancer de la prostate	3
1.1 Epidémiologie et facteurs de risque	4
1.1.1 L'âge	5
1.1.2 L'origine ethnique	5
1.1.3 Les antécédents familiaux	6
1.1.4 Autres facteurs risques possibles	6
1.2 Diagnostique et dépistage	7
1.2.1 Examen clinique	7
1.2.2 Examen biologique	7
1.2.3 Le test urinaire	8
1.2.4 Biopsie	8
1.2.5 Le bilan d'extension	9
1.3 Classification du grade tumoral	9
1.3.1 Classification TNM	9
1.3.2 Le score de Gleason	11
1.3.3 Classification d'AMICO	11

1.4	Modèles des cancers de la prostate	12
1.4.1	Hormonosensible	12
1.4.2	Focus sur l'hormonothérapie	13
1.4.2.1	Castration chirurgicale	13
1.4.2.2	Castration chimique	13
1.4.3	Hormono-indépendant	14
1.5	Les mécanismes impliqués dans l'hormono-indépendance tumorale . .	14
1.5.1	Modification dans le récepteur aux androgènes	14
1.5.1.1	Mutations ponctuelles dans le récepteur des androgènes	15
1.5.1.2	Activation indépendante du ligand	15
1.5.1.3	Amplification des récepteurs aux androgènes	15
1.5.1.4	Variants du récepteur aux androgènes	16
1.5.1.5	Modifications de la biosynthèse des androgènes	16
1.5.1.6	Modifications du cofacteur des récepteurs aux androgènes . . .	16
1.5.2	L'adaptation et la sélection clonale	17
1.5.3	La différenciation neuroendocrine	17
1.5.4	Origine des cellules cancéreuses neuroendocrines	18

Chapitre 2

Introduction à l'épigénétique

21

2.1	Définition	22
2.2	La diversité des marques épigénétiques	23
2.2.1	Méthylation de L'ADN	23
2.2.2	Les modifications post-traductionnelles d'histone	24
2.2.3	Les ARNs non-codants et les micro-ARNs	26
2.2.4	Les variants d'histones	26
2.2.5	Les mécanismes de régulation épigénétique : mécanismes dynamiques et coopératifs	26
2.3	Les complexes Polycomb PcG et Trithorax TrxG	27
2.3.1	Découverte	27
2.3.2	Comment la mémoire de transcription survit-elle à la réplication de l'ADN et à la mitose?	29
2.3.2.1	Les éléments de réponse aux Polycomb/Trithorax (PRE/TRE) chez la Drosophile	29

2.3.2.2	Les éléments de réponse aux Polycomb chez les mammifères . . .	30
2.3.3	Les protéines TrxG (Trithorax Group)	30
2.3.4	Les complexes du PcG (Polycomb Group)	31
2.3.4.1	Les PcG de la Drosophile aux mammifères	31
2.3.4.2	Les complexes PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1)	32
2.3.4.2.1	PRC1 canonique	33
2.3.4.2.2	PRC1 non canonique	34
2.3.4.3	Les complexes PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2)	35
2.3.4.3.1	Implication d'EZH2 dans le cancer	36
2.3.4.3.2	La complexité du complexe PRC2 chez les mammifères : un seul ou plusieurs complexes PRC2	38
2.4	Les protéines Polycomb-like	41
2.4.1	Les protéines Polycomb-like chez la Drosophile	41
2.4.2	Les protéines Polycomb-like chez les mammifères	42
2.4.2.1	Structure des protéines Polycombe-like : Une organisation en do- maines conservés	43
2.4.2.2	PCL1 ou PHF1	48
2.4.2.2.1	Rôle au niveau chromatinien	49
2.4.2.2.2	Rôle au niveau non chromatinien	51
2.4.2.2.3	Rôle oncogénique de PHF1 : translocation PHF1	52
2.4.2.3	PCL2 ou MTF2	53
2.4.2.4	PCL3 ou PHF19	54
2.4.2.4.1	hPCL3L versus hPCL3S	56
2.4.2.4.2	Implication des protéines Polycomb-like, hPCL3 dans les can- cers	60
2.4.3	Le recrutement séquentiel des complexes Polycomb	62

Partie II Résultats, discussion et perspectives 67

Chapitre 1	
Résultats	69
1.1	Introduction 69
1.2	Publication 71

Chapitre 2	
Discussion et perspectives	141
2.1 Discussion	141
2.2 Conclusion et perspectives	147
Bibliographie	

Souhila Abdelfettah
**Conséquences fonctionnelles de la
surexpression de l'isoforme courte de la
protéine Polycomb-like hPCL3 et hPCL3S
dans les tumeurs prostatiques**

Résumé :

Le complexe Polycomb PRC2 permet le dépôt de la marque épigénétique répressive H3K27me3 par sa sous-unité catalytique, EZH2. Selon les types de cancers, EZH2 est soit surexprimée (prostate) ou fait l'objet de mutations perte ou gain de fonction, ce qui aboutit à des niveaux aberrants d'H3K27me3. In vitro, un tétramère constitué du « cœur » de PRC2, EZH2, SUZ12, EED et RBBP4 est suffisant pour catalyser la triméthylation d'H3K27. Par contre, in vivo, plusieurs facteurs modulant l'activité enzymatique du complexe PRC2 ou participant à son recrutement et/ou à sa stabilisation au niveau des régions génomiques adéquates ont été identifiés. Parmi ceux-ci, se trouve la protéine PCL3/PHF19, l'une des trois orthologues humains avec PHF1 et PCL2 de l'unique protéine Polycomb-like (PCL) de Drosophile. Ces protéines partagent un domaine N-terminal structuré consistant en l'enchaînement d'un domaine TUDOR, de deux domaines PHD (Plant Homeo Domain) suivi d'un domaine de type « Winged-helix » impliqué dans la fixation à l'ADN. En outre, hPCL3 fixe la marque activatrice H3K36me3 via son domaine TUDOR grâce à une « cage aromatique » constituée par les Acides Aminés W50, Y56, F74 et Y80 et permet ainsi l'intrusion de PRC2 dans l'euchromatine, l'activation d'EZH2 et le dépôt d'H3K27me3. En raison des différents sites de polyadénylation et d'événements d'épissage alternatifs, le locus humain hPCL3 / PHF19 code pour deux isoformes : une protéine de longueur totale hPCL3L/ PHF19L (580 AA) et une courte isoforme, hPCL3S/PHF19S (207 AA) contenant uniquement le domaine TUDOR, le premier des deux domaines PHD, le PHD1 et une région C-terminale spécifique à hPCL3S. Le domaine PHD1 est faiblement conservé parmi les 3 orthologues humains et pourrait être associé à des fonctions spécifiques de chaque orthologue, comme la stabilisation de P53 dans le cas de PHF1.

Des expériences de RT-qPCR sur une cohorte de 25 tumeurs prostatiques ont révélé que hPCL3S est surexprimée dans 75% des cas. De plus, hPCL3S est surexprimée dans les lignées hormono-insensibles DU145 et PC3 mais pas dans la lignée hormono-sensible LNCaP. Dans des tests de blessure sur tapis confluents de cellules « Wound Healing assays », nous avons montré que l'inactivation spécifique par siARN de hPCL3S ralentit la prolifération et la migration des cellules DU145 qui le surexpriment.

Inversement, la transfection stable de hPCL3S dans des LNCaP accroît ces propriétés. Ces effets reposent en partie sur la surexpression de gènes connus pour être importants pour la prolifération et/ou la migration de cellules cancéreuses de la prostate telles que S100A16, PlexinA2 et Spondin1.

La transfection stable d'un mutant ponctuel de hPCL3S, W50A, incapable de fixer H3K36me3 se traduit par une prolifération accrue des LNCaP comme dans le cas de hPCL3S-WT. Ceci suggère que cet effet ne dépend pas de la fixation à la marque épigénétique H3K36me3 du domaine TUDOR.

Par contre, une mutation dans le domaine PHD1 abolit l'effet sur la croissance. Ce domaine PHD1 est un domaine d'interaction protéine-protéine qui est très divergent entre les 3 orthologues Polycomb-like, et pourrait donc avoir des fonctions différentes. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence un rôle de hPCL3S dans la progression tumorale prostatique et suggèrent que hPCL3S soit une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans les cancers de la prostate résistant à la castration.

Mots clés :

Epigénétique, Chromatine, Polycomb, PRC2, Polycomb-like, hPCL3S.

Souhila Abdelfettah
**Conséquences fonctionnelles de la
surexpression de l'isoforme courte de la
protéine Polycomb-like hPCL3 et hPCL3S
dans les tumeurs prostatiques**

Abstract :

The Polycomb PRC2 complex allows the deposition of the repressive epigenetic mark H3K27me3 by its catalytic subunit, EZH2. According to the type of cancers, EZH2 is either overexpressed (prostate) or is subject to loss or gain of function mutations, which lead to aberrant levels of H3K27me3. In vitro, a tetramer consisting of the "core" PRC2 subunits, EZH2, SUZ12, EED and RBBP4 is sufficient to catalyze the trimethylation of H3K27. In vivo, several factors modulating the enzymatic activity of the PRC2 complex or participating in its recruitment and/or its stabilization at the promoters of target genes have been identified. Among them, the three human orthologs of the unique Polycomb-like protein (PCL) of *Drosophila*, PHF1, PCL2 and PCL3/PHF19 have recently gained much attention. These proteins share a structured N-terminal domain consisting of a TUDOR domain and two PHD domains (Plant Homeo Domain) followed by a "Winged-helix" domain involved in DNA binding. In addition, PHF1 and PHF19 bind H3K36me3 via their TUDOR domain through an "aromatic cage" and thus allow the intrusion of PRC2 into euchromatin, the activation of EZH2 and H3K27me3 deposition.

Owing to different polyadenylation sites and alternative splicing events, the human hPCL3/PHF19 locus encodes two isoforms : a full-length protein, hPCL3L/PHF19L and a shorter isoform, hPCL3S/PHF19S, which contains only the domain TUDOR, PHD1 the first of two domains-PHD and a small specific C-terminal region. The PHD1 domain, which is very divergent between the three orthologues, could be associated with specific functions of each orthologue. For example, PHF1 is the only one capable of inducing cell quiescence by interacting with and stabilizing P53 through its PHD1 domain and independently of its TUDOR domain.

Our RT-qPCR experiments on a cohort of 25 prostate tumors revealed that hPCL3S is overexpressed in 75% of the cases. In addition, hPCL3S is overexpressed in the DU145 and PC3 hormone-insensitive cell lines, but not in the hormone-sensitive LNCaP cell line. In Wound-healing and proliferation assays, we have shown that the specific siRNA inactivation of hPCL3S decreases the proliferation and migration of DU145 cells that over-express it.

Conversely, the stable transfection of hPCL3S into LNCaP increases these properties. These effects partially relied on the up-regulation of genes known to be important for the proliferation and/or migration of prostate cancer cells such as S100A16, PlexinA2 and Spondin1.

Stable transfection of a punctual mutant of hPCL3S, W50A, is unable to bind H3K36me3 and results in increased proliferation of LNCaP as in the case of hPCL3S-WT, suggesting that this effect is not dependent on the reading of H3K36me3 by the TUDOR domain.

By contrast, a mutation in the PHD1 domain abolishes the effect on growth. This PHD1 domain is a protein-protein interaction domain that is very divergent between the 3 Polycomb-like orthologs, and could therefore have different functions.

These results allow us to highlight the role of hPCL3S in prostate tumor progression and suggest that hPCL3S is a potential new therapeutic target in castration-resistant prostate cancer.

Keywords :

Epigenetics, Chromatin, Polycomb, PRC2, Polycomb-like, hPCL3S.

Objectifs de mon projet de thèse

1. Préciser la localisation de la protéine hPCL3S endogène dans des cellules prostatiques.
2. Déterminer les conséquences fonctionnelles de l'inactivation de hPCL3S par ARN interférence dans les lignées prostatiques DU145 et PC3 qui la surexpriment.
3. Étudier les effets de la surexpression par transfection stable de hPCL3S dans les cellules prostatiques LnCap qui ne la surexpriment pas.
4. Déterminer le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) dans le processus tumorigénique.

Publications

Cette thèse a fait l'objet de la publication suivante qui est en cours de révision pour le comité éditorial de la revue *Oncotarget* :

[Abdelfettah et al, 2019] Abdelfettah et al. (2019). "hPCL3S promotes proliferation and migration of androgen-independent prostate cancer cells." *Soumis a oncotarget le 19/09/2019; en révision mineure le 26/10/2019.*

Table des figures

1.1	Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate en France métropolitaine selon l'année	5
1.2	Le score de Gleason.	11
1.3	Modèle schématique de la transdifférenciation neuroendocrine dans la progression tumorale de la prostate. Adapté de [TERRY et BELTRAN 2014].	19
2.1	Représentation schématique d'un nucléosome entouré de la fibre d'ADN.	24
2.2	Patron d'expression des gènes homéotiques des loci Antennapedia et Bithorax chez la drosophile.	28
2.3	Composition et fonction des complexes PRC1 chez la Drosophile.	32
2.4	Composition des complexes PRC1 canoniques et non canoniques des mammifères.	33
2.5	Composition du complexe PRC2.1 des mammifères	39
2.6	Composition du complexe PRC2.2 des mammifères.	40
2.7	Le recrutement du complexe PcG au niveau du PRE.	42
2.8	Structure de la protéine Polycomb-like.	43
2.9	Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du domaine PHD1 de PHF1 [BRIEN et BRACKEN 2015].	45
2.10	Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du domaine PHD2 de Polycomb-like.	46

2.11	Alignement multiple des séquences en acides aminées des domaines PHD1 et PHD2 de différents organismes.	46
2.12	Représentation schématique de l'interaction du domaine EH de Polycomb- like et l'ADN [LI et al. 2017].	47
2.13	PHF1 est un lecteur de la marque épigénétique histone H4R3me2. .	51
2.14	L'axe PHF1-p53 favorise la quiescence cellulaire.	52
2.15	PCL2 se lie spécifiquement aux trinuécléotides GpG non méthylés. Adapté de [PERINO et al. 2018]	54
2.16	Modèle de recrutement du PRC2 par PCL3 au niveau de la chromatine.	56
2.17	Représentation schématique du CR-APA et CR-APA.	58
2.18	Représentation schématique de la protéine hPCL3L de pleine lon- gueur, hPCL3L et de l'isoforme courte hPCL3S	59
2.19	Représentation schématique de l'axe hPCL3-SIAH1 et l'impact sur la régulation de la signalisation de la β -caténine.	61
2.20	Le recrutement séquentiel du PRC2 et PRC1	64

Liste des tableaux

1.1	Classification TNM des cancers de la prostate (La classification TNM des cancers de la prostate [<i>La classification TNM des cancers de la prostate</i> 2015; CHENG et al. 2012])	10
1.2	Classification de D’Amico des cancers de la prostate	12
2.1	Tableau récapitulatif des composantes du PRC1 de la Drosophile et leurs homologues chez les mammifères.	33
2.2	Surexpression et mutations d’EZH2 identifiées dans différents types de cancers et gènes cibles affectés [KIM et ROBERTS 2016]	37

Acronymes

Terme	Description
53BP1	The p53-binding protein 1
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AEBP2	Adipocyte Enhancer-Binding Protein 2
APA	Alternative Poly Adenylation
AR	Androgne receptor
AR-V7	Androgne receptor-variant 7
ARID	A-T Rich Interaction Domain
ARN	Acide Ribonucléique
ARNInc	ARN Long Non-Codant
ARNm	Acide Ribonucléiquemessenger
Bcl-2	B-cell lymphoma
BER	Base Excision Repair
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
BRD8	Bromodomain Containing 8
C10ORF12	Chromosome 10 Open Reading Frame 12

Acronymes

Terme	Description
CBP	CREB Binding Protein
CBX	Proteine à domaine Chromobox
CD56	Cluster de Différenciation 56
ChIP	Chromatine Immunoprecipitation
CPRC	Cancer de la Prostate Résistant à la Castration
CYP17A1	Cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1
DHT	Dihydrotestostérone
DNMT	DNA methyltransferase
Dnmt	ADN Méthyl-Transférases
dPCL	Drosophile Polycomb-like
DUB	Enzymes de Désubiquitination
EED	Embryonic Ectoderm Development
EFNA1	Ephrin A1
EGF	Facteur de Croissance épidermique
EH	Extended-Homology
EPOP	Elongin BC And Polycomb Repressive Complex 2 Associated Protein
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ES	Cellules Souches Embryonnaires
ESC	Extra sex Combs
ETS	E Twenty-Six or E26 Transformation-Specific
EZ	Enhancer of Zeste
GBM	Glioblastome

Terme	Description
HCC	Carcinome Hépatocellulaire
HDAC	Histones Deacetylase
HIC1	Hypermethylated in cancer 1 protein
HP1	Heterochromatin Protein
IGF1	Insulin-like Growth Factor
IL-6	Interleukin-6
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
JARID2	Jumonji, AT Rich Interactive Domain 2
KDM2B	Lysine (K)-specific demethylase 2B
LH-RH	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MBD	Methyl CpG binding domain protein
MEAF6	MYST/Esa1 Associated Factor 6
MTF2	Metal response element binding transcription factor 2
NE	Neuroendocrine
NSE	Neuron Specific Enolase
PARP1	La poly(ADP-ribose) polymérase 1
PCa	Prostate Cancer
PCA3	Prostate Cancer Antigen 3

Acronymes

Terme	Description
PcG	Polycomb Group
PCL	Polycomb-like
PHD	Plant Homeodomain
PHO	Pleiohomeotic
PhoRC	Pleiohomeotic Repressive complexe
PlexinA2	Plexin-A2 precursor
PSA	Prostate-specific Antigen 3
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
Rb	Retinoblastoma
RbAp46/48	Retinoblastoma protein associated protein 46/48
RISC	RNA-induced silencing complex
RYBP	RING1 And YY1 Binding Protein
SIAH1	Siah E3 ubiquitin protein ligase 1
siARN	Small interfering ARN
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator-1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SUZ12	Suppressor of Zeste 12
TET	Ten Eleven Translocation
TMPRSS2	Transmembrane Protease Serine 2
TrxG	Trithorax Group
UTR	Untranslated region

Première partie

Introduction

1

Cancer de la prostate

Sommaire

1.1	Epidémiologie et facteurs de risque	4
1.1.1	L'âge	5
1.1.2	L'origine ethnique	5
1.1.3	Les antécédents familiaux	6
1.1.4	Autres facteurs risques possibles	6
1.2	Diagnostic et dépistage	7
1.2.1	Examen clinique	7
1.2.2	Examen biologique	7
1.2.3	Le test urinaire	8
1.2.4	Biopsie	8
1.2.5	Le bilan d'extension	9
1.3	Classification du grade tumoral	9
1.3.1	Classification TNM	9
1.3.2	Le score de Gleason	11
1.3.3	Classification d'AMICO	11
1.4	Modèles des cancers de la prostate	12
1.4.1	Hormonosensible	12

1.4.2	Focus sur l'hormonothérapie	13
1.4.2.1	Castration chirurgicale	13
1.4.2.2	Castration chimique	13
1.4.3	Hormono-indépendant	14
1.5	Les mécanismes impliqués dans l'hormono-indépendance tumorale .	14
1.5.1	Modification dans le récepteur aux androgènes	14
1.5.1.1	Mutations ponctuelles dans le récepteur des androgènes . . .	15
1.5.1.2	Activation indépendante du ligand	15
1.5.1.3	Amplification des récepteurs aux androgènes	15
1.5.1.4	Variants du récepteur aux androgènes	16
1.5.1.5	Modifications de la biosynthèse des androgènes	16
1.5.1.6	Modifications du cofacteur des récepteurs aux androgènes .	16
1.5.2	L'adaptation et la sélection clonale	17
1.5.3	La différenciation neuroendocrine	17
1.5.4	Origine des cellules cancéreuses neuroendocrines	18

1.1 Epidémiologie et facteurs de risque

Avec plus de 50 000 nouveaux cas estimés en France en 2015, le cancer de la prostate (PCa) se place au premier rang des cancers les plus incidents chez l'homme devant le cancer du poumon et le cancer côlon-rectum. En termes de mortalité, le cancer de la prostate se situe au 3e rang chez l'homme avec plus de 22 000 décès en France en 2018 (source : Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018). Près de 79% des décès concernent des hommes de 75 ans et plus. Toutefois, la mortalité est en baisse régulière depuis 1990 (-3,7% par an entre 2010 et 2015) ainsi que l'incidence (-3,5% par an entre 2010 et 2015) (source santé publique France). Cela s'explique en partie par l'amélioration des traitements et par l'accès au dépistage du cancer de la prostate offrant un diagnostic à un stade précoce permettant une meilleure prise en charge.

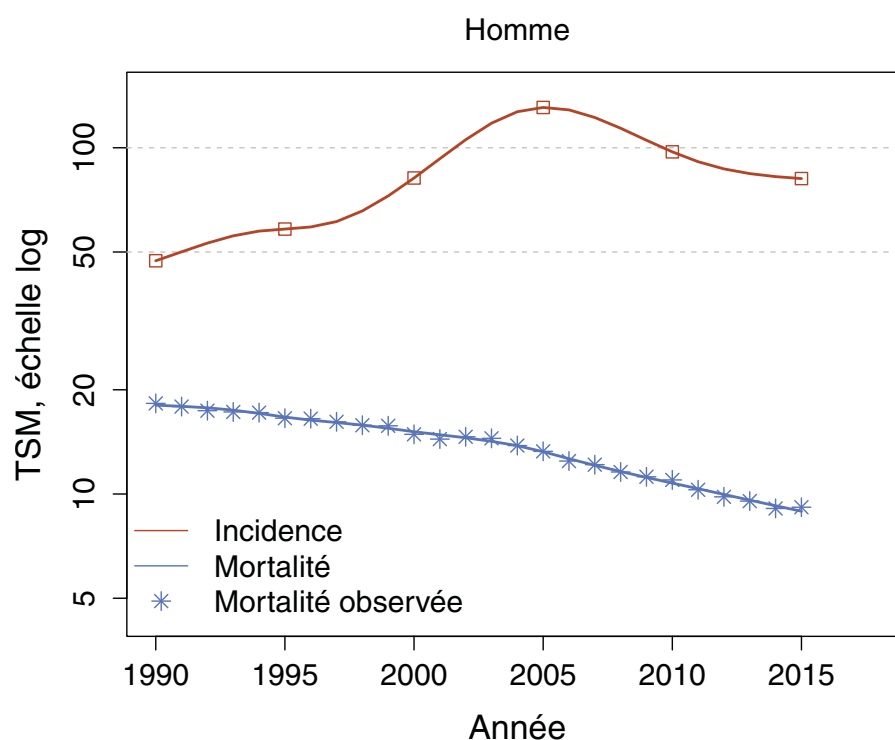


Figure 1.1 – Taux d’incidence et de mortalité du cancer de la prostate en France métropolitaine selon l’année

Les causes du cancer de la prostate ne sont pas encore totalement appréhendées. Cependant, plusieurs études ont démontré l’existence de certains facteurs de risque favorisant son développement. En particulier :

1.1.1 L’âge

Le cancer de la prostate est un cancer qui touche surtout les personnes âgées ; il reste rare chez les personnes de moins de 50 ans et sa prévalence augmente significativement avec l’âge et notamment chez les personnes de plus de 70 ans.

1.1.2 L’origine ethnique

Le taux du cancer de la prostate varie considérablement en fonction des caractéristiques ethno-géographiques. Il est par exemple plus fréquent chez les populations Noires Américaines ; moins fréquent chez les populations Caucasiennes et Asiatiques.

Au sein de la population française, l'incidence de la maladie apparaît plus élevée chez les personnes d'origine antillaise. Cette disparité est liée à des facteurs génétiques, épi-génétiques et environnementaux [LYNCH et al. 2016].

1.1.3 Les antécédents familiaux

Les antécédents familiaux de cancer de la prostate sont également un facteur de risque reconnu. On estime qu'environ 20% des cas de cancer de la prostate sont liés aux antécédents familiaux, notamment à cause des gènes partagés, mais également à cause d'une exposition similaire à certains agents cancérogènes présents dans l'environnement et aux habitudes de vie.

Les hommes ayant des parents du premier ou deuxième degré atteints de cancer de la prostate ont plus de risque d'en développer un. Plus le nombre de parents cancéreux est important et l'âge de leur diagnostic est précoce, plus le risque du cancer de la prostate est élevé. Les gènes en cause sont le plus souvent BRCA1, BRCA2 et HOXB13 [PAULO et al. 2018].

L'apparition d'autres cancers (cancers du sein, tumeurs cérébrales, etc) chez certaines familles est susceptible d'augmenter le risque du cancer de la prostate. Cela nous laisse supposer l'existence de gènes de prédisposition communs. Par exemple, le risque est 1.4 fois plus important pour un homme apparenté au premier ou deuxième degré à une femme présentant un cancer du sein [LYNCH et al. 2016].

1.1.4 Autres facteurs risques possibles

L'obésité, le tabagisme ainsi que certaines habitudes alimentaires sont suspectés d'être des facteurs de risque de cancer de la prostate. L'exposition à certains polluants environnementaux (le Cadmium) et les perturbateurs endocriniens pourraient également accroître ce risque.

Certains facteurs endogènes comme un taux élevé d'androgène, d'IGF1 (insulin-like growth factor) ou de vitamine D circulante sont aussi suspectés d'être des facteurs de

risque. Ce risque est encore plus élevé chez les hommes possédant des antécédents familiaux de cancer de la prostate.

1.2 Diagnostique et dépistage

La première étape du diagnostic consiste à faire un interrogatoire dans le but de rechercher les éventuels facteurs de risque, connaître l'histoire familiale et détecter les signes cliniques évocateurs (signes fonctionnels urinaires, troubles de l'érection, hématurie, hémospérmié). La deuxième étape se présente sous la forme d'un examen clinique reposant sur le toucher rectal et le dosage du PSA.

1.2.1 Examen clinique

L'examen clinique repose sur le toucher rectal qui consiste à palper la prostate à travers la paroi du rectum. L'objectif est d'évaluer la taille de la prostate, sa consistance, ainsi que de détecter d'éventuelles anomalies perceptibles au toucher. La présence d'une masse ou de plusieurs irrégularités pourra faire suspecter fortement un cancer de la prostate.

1.2.2 Examen biologique

Le dosage du PSA sérique total (prostate specific antigen ou antigène spécifique de la prostate) est recommandé puisque le PSA est une enzyme produite exclusivement par les cellules épithéliales de la prostate. Cependant, le PSA seul n'est pas un paramètre suffisant pour évaluer le risque du cancer. En effet, son augmentation n'est pas spécifique du cancer de la prostate, il est également augmenté en cas d'hypertrophie bénigne de la prostate, de prostatite ou d'infection urinaire. Il doit être dosé indépendamment du toucher rectal et de la biopsie prostatique.

D'autres tests basés sur le pourcentage du PSA libre, sa vélocité, sa densité et son adaptation par rapport à l'âge, ont permis d'affiner le dosage du PSA de manière à diminuer

le nombre de biopsies prostatiques réalisées. Cependant, ces paramètres restent insuffisants et souffrent également d'un manque de spécificité.

1.2.3 Le test urinaire

Le test urinaire fait actuellement l'objet d'un développement commercial dans le diagnostic de PCa. Parmi les marqueurs les plus proposés : le PCA3 et le gène de fusion TMPRSS2 : ERG [KOHAAAR et al. 2019].

Le PCA3, l'antigène 3 du cancer de la prostate est un long ARN non codant ARNlnc spécifiquement et hautement exprimé chez les patients atteints de PCa.

La fusion TMPRSS2-ERG (T2 : ERG) est la fusion la plus fréquente dans le PCa est la fusion du gène codant pour la sérine protéase transmembranaire TMPRSS2 (gène régulé par les androgènes) avec un gène de la famille des facteurs de transcription ETS (ERG) [DEPLUS et al. 2016].

Ce test consiste à détecter les ARN messagers (ARNm) de ces marqueurs dans les urines en le normalisant par rapport à l'ARNm du PSA [PAULO et al. 2018]. La combinaison des scores PCA3 et T2 : ERG a montré une amélioration relativement bonne des performances du diagnostic [VLAEMINCK-GUILLEM et al. 2015].

1.2.4 Biopsie

La biopsie succède au diagnostic clinique et biologique. Elle consiste à introduire une fine aiguille dans la prostate et de prélever une douzaine de fragments prostatiques à différents endroits de la glande [EL-HAKIM et MOUSSA 2010]. Les échantillons sont ensuite analysés par microscopie afin de rechercher la présence de cellules cancéreuses. La détermination du stade selon la classification TNM et le score de Gleason permettent d'établir un indice pronostique de l'agressivité de la tumeur. Si la biopsie met en évidence la présence de cellules cancéreuses, le diagnostic de cancer est confirmé. Des examens complémentaires peuvent alors être prescrits (Association Française d'Urologie).

1.2.5 Le bilan d'extension

Le bilan d'extension a pour but de détecter la propagation du cancer au niveau des ganglions et d'autres organes. Ce bilan comporte :

- Une imagerie par résonance magnétique (IRM) et/ou un scanner de la prostate et de la région pelvienne pour visualiser la prostate et ses contours. Cela permet d'évaluer une éventuelle extension dans le pelvis et l'atteinte des ganglions.
- Une scintigraphie afin d'examiner la présence de métastases au niveau osseux.

1.3 Classification du grade tumoral

Après chirurgie, les résultats anatomopathologiques conduisent à une révision du stade de la maladie selon les classifications suivantes :

1.3.1 Classification TNM

Le TNM est un système international de classification des tumeurs solides. Il est très utilisé en oncologie et offre aux médecins un langage universel de description du cancer. Cette classification a été proposée par le chirurgien français Pierre Denoix de l'Institut Gustave-Roussy entre 1943 et 1952.

La classification TNM repose sur l'évaluation de trois paramètres le T cote la taille de la tumeur, le N l'atteinte ganglionnaire et le M la présence ou non de métastases (voir tableau 1.1).

Tableau 1.1 – Classification TNM des cancers de la prostate (La classification TNM des cancers de la prostate [La classification TNM des cancers de la prostate 2015 ; CHENG et al. 2012])

T : taille de la tumeur	
T	Tumeur primitive (taille dans le plus grand diamètre)
TX	Tumeur primitive non évaluée
T0	Tumeur primitive non retrouvée
T1	Tumeur non détectable par toucher ou par imagerie : • T1a : Tumeur occupant moins de 5% du tissu réséqué (la découverte est réalisée au cours d'une ablation d'adénome) • T1b : Tumeur occupant plus de 5% du tissu réséqué • T1c : Tumeur découverte sur une biopsie prostatique en raison d'une élévation du taux de PSA
T2	Tumeur limitée à la prostate : • T2a : Tumeur atteignant la moitié d'un lobe ou moins • T2b : Tumeur atteignant plus de la moitié d'un lobe mais sans atteindre l'intégralité des 2 lobes • T2c : Tumeur atteignant les 2 lobes
T3	T3 Tumeur étendue au-delà de la capsule prostatique : • T3a : Extension extra capsulaire uni ou bilatérale, incluant l'extension au col vésical • T3b : Extension aux vésicules séminales uni ou bilatérale
T4	Tumeur fixée ou atteignant d'autres structures que les vésicules séminales : Vessie, sphincter, rectum, muscles releveurs de l'anus ou paroi pelvienne
N : atteinte ganglionnaire	
Nx	Pas d'évaluation du statut ganglionnaire
N0	Aucun ganglion métastatique des aires de voisinage mis en évidence
N1	Atteinte ganglionnaire pelvienne
N1 mi	Métastase ganglionnaire < 0,2 cm (optionnel)
M : présence ou non de métastases	
Mx	Pas d'évaluation du statut des métastases
M0	En cas d'absence de métastases
M1	Présence de métastases à distance, quelles qu'en soient les localisations ou la taille, avec : • M1a : Atteinte des ganglions non régionaux • M1b : Atteinte osseuse • M1c : Autres sites (foie, poumon, ...)

1.3.2 Le score de Gleason

Le score de Gleason est un score histopronostique essentiel, utilisé pour décrire l'agressivité d'un cancer de la prostate et dont le principe repose sur l'observation microscopique du tissu prostatique obtenu par biopsie. L'anatomopathologiste évalue le tissu de la tumeur et établit son degré de différenciation.

Le score de Gleason s'établit en additionnant le grade le plus représenté et le grade le plus élevé de la tumeur. Le premier chiffre représente le score le plus représenté. Ainsi 4+3 est plus péjoratif que 3+4. Si la somme est de 6 ou moins, le cancer est dit bien différencié, donc de meilleur pronostic ; Si la somme est 7 : le cancer est moyennement différencié ; 8 ou plus : le cancer est peu différencié, donc de moins bon pronostic [EPSTEIN et al. 2016]



Figure 1.2 – Le score de Gleason.

1.3.3 Classification d'AMICO

Ce système de classification est conçu pour évaluer le risque de récurrence après un traitement localisé du cancer de la prostate. Les travaux D'Amico [D'Amico et al. 1998] ont classé les patients en trois groupes de récurrence : Risque faible, intermédiaire et élevé. En se basant sur le toucher rectal, la valeur du dosage de PSA préopératoire et le stade de Gleason. Cette classification pourrait aider les médecins à prendre une

décision plus éclairée en ce qui concerne le bilan d'extension. Trois niveaux de risque sont proposés (voir tableau 1.2) :

Tableau 1.2 – Classification de D'Amico des cancers de la prostate

Risque de progression	PSA ng/ml	Gleason	Stade clinique
Faible	< 10	≤ 6	≤ T2a
Intermédiaire	> 10 et < 20	7	2b
Elevé	> 20	≥ 8	2c-T3

1.4 Modèles des cancers de la prostate

1.4.1 Hormonosensible

La prostate est une glande androgéno-dépendante. Son développement est régulé principalement par les androgènes : testostérone et dihydrotestostérone (DHT). La synthèse des androgènes est soumise à la régulation physiologique de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire, avec une contribution des glandes surrénales. Un niveau approprié de testostérone circulante est nécessaire pour maintenir la croissance, le développement, la différenciation et la fonction de la glande prostatique [DAI et al. 2017].

Huggins et Hodges démontrent pour la première fois l'androgène-dépendance du cancer de la prostate. Leur étude met en évidence l'influence du changement de la concentration sérique en testostérone sur la variation de la croissance du cancer de la prostate. Ils ont démontré que la diminution de la testostérone circulante causait la régression du cancer, et que l'administration de testostérone provoquait sa progression [HUGGINS et HODGES 1941].

1.4.2 Focus sur l'hormonothérapie

Le traitement hormonal est basé donc sur le fait que le cancer de la prostate est androgène-dépendant dans 80% des cas et cliniquement sensible au sevrage androgénique. L'hormonothérapie est souvent utilisée comme traitement palliatif du cancer de prostate de stade avancé, de forte agressivité, ou métastatiques. Elle permet de stopper la prolifération des cellules cancéreuses. Les différents types d'hormonothérapie utilisés dans le cancer de prostate sont :

1.4.2.1 Castration chirurgicale

Cette technique permet d'arrêter la production de testostérone par les testicules et ce, de façon définitive. Elle est soit totale et conduit à une ablation complète de la prostate, soit partielle (Pulpectomie) et entraîne dans ce cas une ablation partielle du testicule qui secrète la testostérone.

1.4.2.2 Castration chimique

L'hormonothérapie peut être réalisée à l'aide de médicaments agissant sur la LH-RH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone). La LH-RH stimule la sécrétion de la lutéinostimuline qui elle-même active la production de testostérone [CHANDRASEKAR et al. 2015; CRAWFORD et al. 2019].

Les analogues et les antagonistes de la LH-RH (Dégarélix) agissent sur la sécrétion de la lutéinostimuline par l'hypophyse afin de bloquer la production de la testostérone par les testicules.

Les anti-androgènes : (Flutamide) agissent sur les récepteurs androgéniques et les empêchent d'utiliser la testostérone circulant dans le sang.

Les inhibiteurs de la voie de biosynthèse des androgènes : l'acétate d'abiratérone bloque la synthèse des androgènes fabriqués aux niveaux testiculaire, surrénalien et intratumoral.

Les inhibiteurs des récepteurs aux androgènes (l'enzalutamide) : Ils présentent une affinité accrue pour les récepteurs aux androgènes et inhibent la voie de signalisation des récepteurs aux androgènes [CHANDRASEKAR et al. 2015 ; CRAWFORD et al. 2019].

1.4.3 Hormono-indépendant

Après une réponse initiale à l'hormonothérapie, la majorité des cancers hormono-sensibles deviennent réfractaires au traitement hormonal par privation et deviennent résistants à la castration [So et al. 2005].

Ce cancer de la prostate résistant à la castration (CPRC) est défini par une progression de la maladie alors que le patient est castré chimiquement ou chirurgicalement. On observe alors une augmentation continue du PSA au-dessus de la valeur antérieure de référence (5 ng/ml) ainsi que l'apparition de nouvelles métastases.

Le CPRC constitue un défi clinique important et la recherche sur ses mécanismes biologiques de résistance présente un intérêt majeur.

1.5 Les mécanismes impliqués dans l'hormono-indépendance tumorale

1.5.1 Modification dans le récepteur aux androgènes

Le récepteur d'androgène (AR) est un récepteur nucléaire de la famille des récepteurs stéroïdiens de la testostérone et de la dihydrotestostérone (DHT) .

Les androgènes jouent un rôle important dans la croissance des cellules de la prostate normales et malignes via AR. En absence de testostérone ou de DHT, AR lié à des protéines chaperonnes de choc thermique (HSP) est inactif dans le cytoplasme. Après liaison au ligand, le récepteur subit un changement conformationnel (allostérique), se dimérise puis est transloqué dans le noyau. A ce niveau, AR se fixe à l'ADN et induit la transcription de ses gènes cibles dont le PSA [TAN et al. 2015 ; DAI et al. 2017].

Dans le mode d'action non-génomique, une fois activé dans le cytoplasme suite à la liaison du ligand, AR active des cascades de signalisations cytoplasmiques convergeant vers la voie ERK et l'activation en aval de facteurs de transcription [CHANDRASEKAR et al. 2015].

La signalisation AR a été largement étudiée dans l'initiation et la progression du PCa dont les mécanismes sous-jacents impliqueraient :

1.5.1.1 Mutations ponctuelles dans le récepteur des androgènes

Le gène AR est le plus souvent (62,7%) aberrant dans les CPRC. Ces altérations se manifestent par : Un AR hypersensible ou hyperactivé (la capacité de réponse du AR à des concentrations minimales d'androgènes), une perte de spécificité (une spécificité du AR élargie pour inclure les non-androgènes) [CHANDRASEKAR et al. 2015]. La mutation T878A du AR confère une résistance à l'enzalutamide, un anti-androgénique de deuxième génération [PREKOVIC et al. 2016; "Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist"].

1.5.1.2 Activation indépendante du ligand

Une large variété de facteurs de croissance et de cytokines était impliquée dans la stimulation d'AR en l'absence d'androgènes, ou dans la sensibilisation du AR à des concentrations sous-physiologiques d'androgènes [TUCCI et al. 2018].

L'interleukine-6 (IL-6) est fortement exprimée dans les CPRC. Elle permet l'activation d'AR indépendamment de son ligand via la voie MAPK [UEDA et al. 2002].

1.5.1.3 Amplification des récepteurs aux androgènes

Une amplification du gène AR a été observée chez 30 à 50% des patients atteints de CPRC. Elle se traduit par une surexpression d'AR favorisant la progression vers le CPRC.

1.5.1.4 Variants du récepteur aux androgènes

Plus de 20 variants d'AR ont été identifiés. Ils se caractérisent par l'absence de la région carboxy-terminale, une région déterminante pour le contrôle des activités transcriptionnelles d'AR. Ces variants sont constitutionnellement actifs en absence d'androgènes [WATSON et al. 2015; TUCCI et al. 2018].

Le AR-V7 est le variant le plus abondant, avec une expression 20 fois plus élevée dans le CPRC par rapport au cancer de la prostate hormono-naïf [FUJITA et NONOMURA 2019].

1.5.1.5 Modifications de la biosynthèse des androgènes

La synthèse d'androgènes par des mécanismes altérés peut également contribuer à l'activation aberrante de l'AR. En effet, des études ont démontré que les tumeurs (CPRC) contiennent des enzymes stéroïdogènes clés susceptibles de stimuler la biosynthèse intratumorale de stéroïdes de novo.

Le traitement médical de castration inhibe la production de testostérone testiculaire, mais n'a pas d'impact sur la production d'androgènes surrenaliens ou intratumoraux, qui régit la CPRC. Les tumeurs de patients atteints de CPRC présentent une régulation positive des enzymes stéroïdogènes (CYP17A1 et CYP19A1), enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes à partir du cholestérol ou d'autres précurseurs surrenaliens. Le CYP17A1 est actuellement une cible pour le blocage total des androgènes chez les patients atteints de CPRC [PELTOLA et al. 2018].

1.5.1.6 Modifications du cofacteur des récepteurs aux androgènes

L'AR est un facteur de transcription, il interagit directement ou indirectement avec la machinerie transcriptionnelle pour induire l'expression du gène cible. Les interactions du récepteur avec ses éléments de réponse et la machinerie transcriptionnelle sont régulées par des co-facteurs (co-répresseur, co-activateur) qui inhibent ou augmentent l'activité du récepteur.

Les co-activateurs SRC-1 et TIF2 d'AR sont quelques fois surexprimés dans le CPRC

par rapport au PCa hormono-naïf. Cette surexpression risque de sensibiliser les cellules à un environnement hormonal faible ou de convertir les antagonistes en agonistes. De même, la perte de la fonction des corépresseurs d'AR peut aussi augmenter son activité [CHANDRASEKAR et al. 2015].

1.5.2 L'adaptation et la sélection clonale

Deux premiers modèles ont été proposés pour expliquer la résistance à la castration hormonale : le modèle dit d'« adaptation » et le modèle dit de « sélection clonale ».

Dans le modèle d'adaptation, le cancer primitif de la prostate est composé par des cellules homogènes androgéno-dépendantes. La résistance à la castration émerge suite à l'acquisition de modifications génétiques et épigénétiques de certaines de ces cellules. Ces dernières, en acquérant des conditions favorables à la croissance et à la survie s'adaptent à un environnement hormonal altéré [AHMED et LI 2013 ; So et al. 2005].

Dans le modèle de sélection clonale, les cellules du cancer primitif de la prostate sont hétérogènes en termes de leurs besoins en androgènes. Une minorité d'entre elles sont androgéno-indépendantes. Lors de la privation en androgènes, les cellules résistantes à la castration sont sélectionnées par leur avantage prolifératif [AHMED et LI 2013 ; So et al. 2005].

Ces deux modèles ne s'excluent pas mutuellement. Certaines de ces altérations sont considérées comme des modifications adaptatives de la réponse à la castration, tandis que d'autres sont des événements précoces qui facilitent l'initiation de la tumeur et sa progression [AHMED et LI 2013].

1.5.3 La différenciation neuroendocrine

La prostate normale comprend une variété de cellules épithéliales et stromales. Les cellules épithéliales comprennent les cellules sécrétoires, basales et neuroendocrines (NE). Ces dernières sont une petite population de cellules paracrines situées sur la couche de cellules basales. Elles jouent un rôle dans la régulation de la croissance et

de la différenciation de l'épithélium normal de la prostate [YUAN et al. 2007].

Dans les lésions tumorales de la prostate, la population de cellules de type NE (présentant des phénotypes de NE et exprimant des marqueurs NE) est corrélée à un mauvais pronostic et à un état indépendant des androgènes.

Selon la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) de 2004, les cellules NE du cancer de la prostate se caractérisent par des cellules très atypiques positives aux marqueurs de la différenciation neuroendocrine. Nous citerons à titre d'exemple : La chromogranine, la synaptophysine, le CD56 et l'énolase spécifique du neurone (NSE). Ces cellules neuroendocrines n'expriment pas le PSA et l'AR et ont souvent perdu les gènes suppresseur de tumeurs Rb, p53 et PTEN. Elles présentent des réarrangements de gène ERG et expriment l'oncoprotéine anti-apoptotique Bcl-2 [ZHU et al. 2019].

1.5.4 Origine des cellules cancéreuses neuroendocrines

A ce jour, l'origine de ce cancer neuroendocrine reste incertaine. Une première hypothèse suppose que les cellules PCa de type NE dérivent des cellules NE normales et se différencient des cellules souches prostatiques. Leur processus de différenciation peut être régulé de manière aberrante sous l'effet de certaines conditions pathologiques (exemple : la déplétion en androgènes), entraînant une augmentation anormale des cellules NE [YUAN et al. 2007 ; TERRY et BELTRAN 2014].

Une deuxième hypothèse plus favorisée, est celle de la « transdifférenciation neuroendocrine ». Elle considère que les cellules d'adénocarcinome peuvent subir un processus de transdifférenciation pour acquérir un phénotype similaire à celui des cellules NE normales tout en exprimant plusieurs marqueurs NE. Ces cellules conservent tout de même certaines caractéristiques épithéliales.

Ce concept est étayé par les observations que des cellules du carcinome de la prostate à petites cellules expriment K8 et K18 deux marqueurs de cellules épithéliales luminales, mais pas K5 et K14 des marqueurs de cellules basales. De plus, une expression

de Bcl-2 a été retrouvée dans l'adénocarcinome et le carcinome de la prostate à petites cellules. Mais aucune expression n'a été observée dans les cellules NE normales. En outre, une différenciation NE peut être observée dans la lésion métastatique osseuse mais pas dans les foyers de tumeur primaire, suggérant la survenue d'un processus de transdifférenciation des cellules PCa métastatiques [YUAN et al. 2007 ; TERRY et BELTRAN 2014]. Enfin, les travaux de recherche de [BURCHARDT TATJANA et al. 1999] ont montré pour la première fois que les cellules d'adénocarcinome de la prostate LNCaP en culture, peuvent être directement induites à subir un processus de transdifférenciation de NE in vitro dans des conditions de privation androgénique. Les mécanismes initiant ce processus de transdifférenciation neuro-endocrine sont encore mal compris mais la privation hormonale ainsi que les facteurs du micro-environnement tumoral semblent être impliqués.

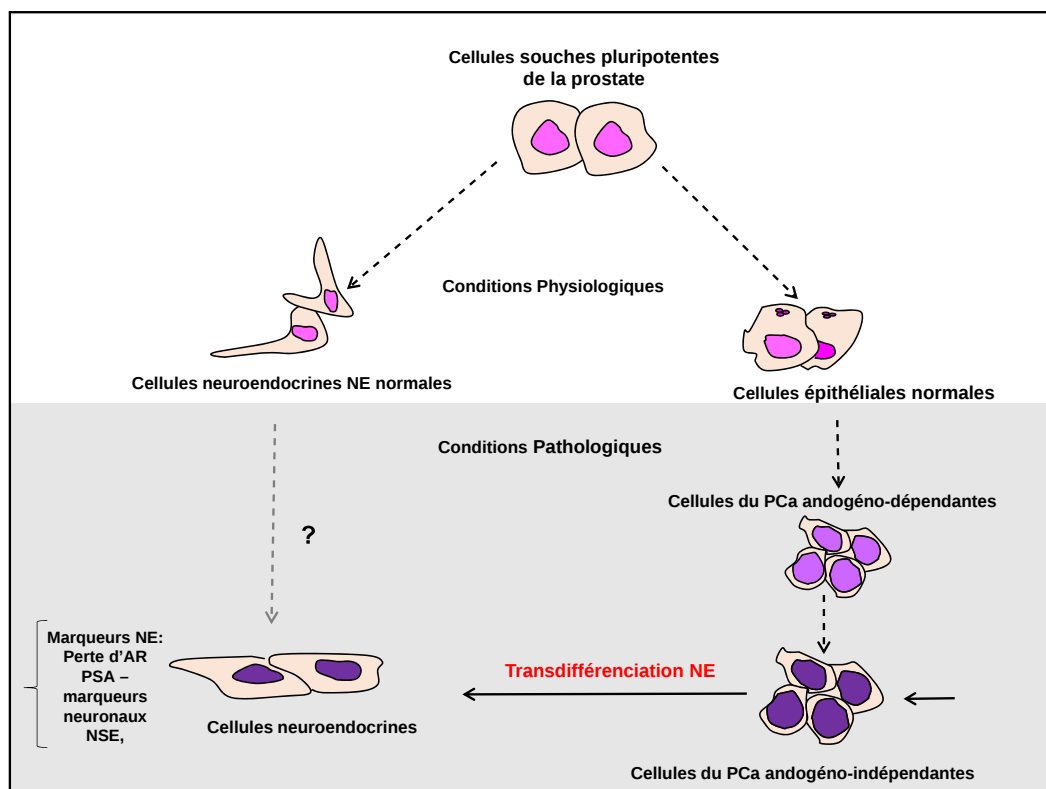


Figure 1.3 – Modèle schématisé de la transdifférenciation neuroendocrine dans la progression tumorale de la prostate. Adapté de [TERRY et BELTRAN 2014].

2

Introduction à l'épigénétique

Sommaire

2.1	Définition	22
2.2	La diversité des marques épigénétiques	23
2.2.1	Méthylation de L'ADN	23
2.2.2	Les modifications post-traductionnelles d'histone	24
2.2.3	Les ARNs non-codants et les micro-ARNs	26
2.2.4	Les variants d'histones	26
2.2.5	Les mécanismes de régulation épigénétique : mécanismes dynamiques et coopératifs	26
2.3	Les complexes Polycomb PcG et Trithorax TrxG	27
2.3.1	Découverte	27
2.3.2	Comment la mémoire de transcription survit-elle à la réplication de l'ADN et à la mitose?	29
2.3.2.1	Les éléments de réponse aux Polycomb/Trithorax (PRE/TRE) chez la Drosophile	29
2.3.2.2	Les éléments de réponse aux Polycomb chez les mammifères	30
2.3.3	Les protéines TrxG (Trithorax Group)	30
2.3.4	Les complexes du PcG (Polycomb Group)	31
2.3.4.1	Les PcG de la Drosophile aux mammifères	31

2.3.4.2	Les complexes PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) . . .	32
2.3.4.3	Les complexes PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) . . .	35
2.4	Les protéines Polycomb-like	41
2.4.1	Les protéines Polycomb-like chez la Drosophile	41
2.4.2	Les protéines Polycomb-like chez les mammifères	42
2.4.2.1	Structure des protéines Polycombe-like : Une organisation en domaines conservés	43
2.4.2.2	PCL1 ou PHF1	48
2.4.2.3	PCL2 ou MTF2	53
2.4.2.4	PCL3 ou PHF19	54
2.4.3	Le recrutement séquentiel des complexes Polycomb	62

2.1 Définition

Bien que toutes les cellules d'un organisme possèdent la même information génétique, elles n'expriment pas toutes leurs gènes de la même façon. Chaque type cellulaire possède donc un programme d'expression génique qui prend en compte l'information épigénétique. La moindre perturbation de ce programme peut conduire à de graves conséquences et notamment au développement de cancers. En effet, en altérant l'expression des gènes impliqués dans la régulation cellulaire, les modifications épigénétiques jouent un rôle fondamental dans l'initiation et la progression tumorale (Plass et al., 2013).

L'épigénétique est définie comme étant l'ensemble des modifications héritables de l'expression des gènes, sans toutefois altérer la séquence nucléotidique de l'ADN.

Comme l'information génétique portée par l'ADN, l'information épigénétique est transmissible lors de la réplication du génome et au cours des divisions cellulaires. Les marques épigénétiques sont scindées en deux grandes classes : les marques épigénétiques activatrices ou répressives de la transcription.

Il existe trois classes majeures d'information épigénétique : la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les ARN non-codants (Gomez et al., 2013).

2.2 La diversité des marques épigénétiques

2.2.1 Méthylation de L'ADN

La modification épigénétique la plus étudiée chez l'homme est la méthylation de la cytosine. Souvent regroupée dans des régions appelées îlots CpG, elle consiste à la fixation covalente d'un groupement méthyle à la position C5 des résidus cytosine. Cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes : les ADN méthyl-transférases (Dnmt). Les Dnmt3a et Dnmt3b sont les Dnmt de novo, alors que la Dnmt1 est la Dnmt qui maintient le profil de méthylation de l'ADN pendant sa réplication [MOORE et al. 2013; BOGDANOVIĆ et LISTER 2017].

La méthylation de l'ADN est principalement associée à la répression transcriptionnelle en particulier lorsqu'elle est associée aux îlots CpG au niveau des promoteurs des gènes. Elle induit la répression transcriptionnelle soit en empêchant directement la fixation des facteurs de transcription sur leurs séquences consensus, soit en permettant la fixation des protéines à domaine MBD (Methyl-CPG-Binding proteins) qui peuvent recruter des co-facteurs pour réprimer la transcription (Brenner et al., 2005; Plass et al., 2013).

La déméthylation de l'ADN peut se produire passivement par dilution de 5mC pendant la réplication. Une déméthylation active de l'ADN se produit par une série de réactions de désamination et/ou d'oxydation. Les protéines TET peuvent médier l'oxydation répétée de 5mC en une base modifiée reconnue et remplacé par une cytosine nue via la voie de la réparation par excision de base (BER) [WU et ZHANG 2017]

2.2.2 Les modifications post-traductionnelles d'histone

Dans les cellules eucaryotes l'ADN est associé à des protéines appelées « histone » pour former une structure organisée nommée la chromatine. Le nucléosome est l'unité élémentaire de la chromatine, composé d'un cœur protéique de huit protéines histones (2 copies de chacune des histones : H2A, H2B, H3 et H4) autour duquel s'enroulent environ 146 paires de bases d'ADN.

La chromatine peut se trouver en plusieurs états de compaction permettant ou non l'accessibilité à la machinerie transcriptionnelle. Un état extrêmement compact appelé hétérochromatine est souvent associé à des parties de la chromatine transcriptionnellement inactives. À l'opposé, l'euchromatine consiste en une organisation plus relâchée et transcriptionnellement active.

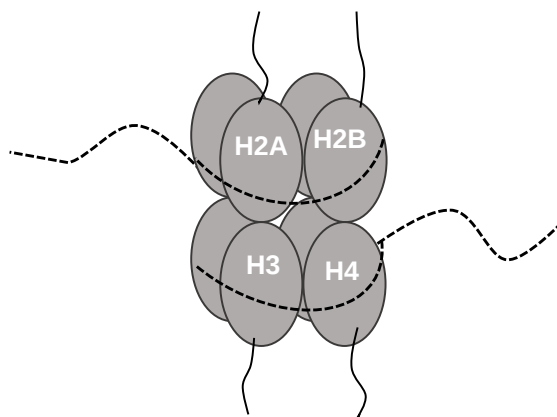


Figure 2.1 – Représentation schématique d'un nucléosome entouré de la fibre d'ADN.

Les queues N-terminales des histones dépassent de la structure globulaire du nucléosome. Elles constituent une cible privilégiée des modifications épigénétiques. Les modifications post-traductionnelles des histones constituent un « code » qui dicte l'état transcriptionnel de la chromatine et la régulation de l'expression génique. Ainsi, ce code va marquer épigénétiquement un locus soit d'une manière transitoire ponctuelle, soit d'une façon stable et étalée sur de grandes régions.

De nombreuses modifications post-traductionnelles ont été mises en évidence dont : l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitinylation et la phosphorylation.

L'acétylation des histones, au niveau des Lysines, est réalisée par des histones acétyltransférases (HATs). Elles sont généralement activatrices et associées à un état ouvert de la chromatine. Ces modifications covalentes sont facilement réversibles grâce à l'action des histones désacétylases (HDAC).

La méthylation quant à elle est réalisée par des enzymes appelées histone méthyltransferases sur des résidus Arginine ou Lysine. Selon le type du résidu méthylé, elle peut être une marque d'activation (ex : H3K4me3) ou de répression génique comme la méthylation de la Lysine 27 de l'Histone H3 (H3K27me3). Il existe des protéines qui peuvent effacer ces modifications : les histone déméthylases.

L'ubiquitination des résidus Lysine en position 119 sur H2A et 120 sur H2B sont les plus abondantes. La marque H2A119ub1 par exemple, est associée à la répression transcriptionnelle. Comme d'autres modifications des histones, la mono-ubiquitination des histones H2A et H2B est réversible par des peptidases spécifiques de l'ubiquitine connues sous le nom d'enzymes de désubiquitination (DUB) [CAO et YAN 2012].

La phosphorylation peut concerner un nombre important de résidus d'histones (résidus Sérine, Thréonine ou encore Tyrosine). La phosphorylation des Sérine 10 et 28 de H3 et de la Sérine 32 de H2B a été associée à la régulation de la transcription des gènes en réponse au facteur de croissance épidermique (EGF), alors que la phosphorylation sur le résidu Sérine 139 du variant d'histone H2AX est par exemple un marqueur des cassures double brin de l'ADN et joue un rôle majeur dans la réponse aux dommages de l'ADN. Cette modification peut être éliminée par l'action de phosphatase [ROSSETTO et al. 2012].

Ces modifications post-traductionnelles d'histones sont exécutées par l'action combinée de complexes enzymatiques (Swygert et Peterson, 2014).

2.2.3 Les ARNs non-codants et les micro-ARNs

Environ 2% seulement du génome humain code pour des protéines et une grande partie des ARN transcrits constitue les ARN non-codant (ARNnc). Plusieurs types d'ARNnc ont été reliés à la régulation de l'expression génique comme par exemple les micro ARNs (miARNs) qui sont des petits ARNnc simple brin d'environ 22 pb. Chez les métazoaires, ils régulent négativement l'expression de centaines de gènes en se liant à la région complémentaire dans le 3' UTR de l'ARNm cible. Ils peuvent ainsi entraîner leur dégradation par le complexe RISC (Yu et al., 2015).

2.2.4 Les variants d'histones

Les variants d'histones remplacent les histones canoniques pour remplir divers rôles dans la réplication, la transcription et la formation d'hétérochromatine qui sont tous médiés par l'activité des chaperones, des « remodelateurs » de la chromatine et des enzymes modifiant l'histone. L'utilisation d'histones alternatives offre un autre moyen de modifier la chromatine. Par exemple, le variant d'histone H3.3 muté conduit à des perturbations dans les fonctions épigénétiques et contribue à la formation de cancers chez l'homme [YUEN et KNOEPFLER 2013].

2.2.5 Les mécanismes de régulation épigénétique : mécanismes dynamiques et coopératifs

Les mécanismes de régulation épigénétique modifiant le compactage de la chromatine sont des événements dynamiques et coopératifs dans le temps et dans l'espace. Chacune des modifications pouvant influencer l'autre, non seulement lorsqu'elles sont présentes sur le même site, mais également en *trans*.

Par exemple, Il a été démontré que l'ubiquitination de H2B est également nécessaire pour la méthylation de la Lysine 79 de l'histone H3 (H3K79). La modification se produit en *trans* et loin du résidu d'histone H3.

D'autres études ont préalablement établi une conversation épigénétique très étroite entre les modifications covalentes des histones et celles de l'ADN, selon un modèle de boucle de répression qui permettrait de renforcer le verrouillage des locus concernés. En effet, le modèle suggère qu'une ADN méthyltransférase (DNMT) se lie à une protéine adaptatrice (HP1) sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) préalablement méthylée. La méthylation de l'ADN permettrait la liaison des protéines contenant un domaine MBD (methyl-CpG-binding domain). Ces protéines recrutent à leur tour des d'histones désacétylases (HDAC) en plus des H3K9 méthyltransférases (H3K9 HMT). Ainsi, la désacétylation de H3K9 serait suivie de sa méthylation. Ces modifications ne sont donc pas mutuellement exclusives et coopèrent pour réguler la structure de la chromatine et l'accessibilité à l'ADN [FUKS 2005].

2.3 Les complexes Polycomb PcG et Trithorax TrxG

2.3.1 Découverte

Du stade embryonnaire jusqu'au stade adulte, le corps de la *Drosophile* est divisé en segments le long de l'axe antéro-postérieur. Les gènes homéotiques (HOX) spécifient les identités des segments durant tous les stades du développement et leur perte de fonction ou leur expression ectopique peut altérer l'identité segmentaire. Les gènes HOX codent pour des facteurs de transcription et se divisent en deux clusters distincts : les complexes Antennapedia et Bithorax (Figure 2.2). Leur patron d'expression est très précis pour une mise en place correcte des organes. Il existe une corrélation entre l'ordre physique des gènes homéotiques et leur profil d'expression le long de l'axe antéro-postérieur, connu sous le principe de colinéarité [STEFFEN et RINGROSE 2014].

Il y a plus de soixante-dix ans, le premier gène Polycomb a été découvert chez *Drosophile Melanogaster* par P. Lewis. Plus tard, Ed Lewis a déterminé que les mutations Polycomb transforment les segments antéro-embryonnaires en segments postérieurs en raison de l'expression ectopique des gènes Hox (Lewis, 1978). Des analyses gé-

nétiqes ultérieures ont identifié d'autres gènes dont les mutations ont entraîné des phénotypes similaires aux mutants perte de fonction des gènes Pc, conduisant à la définition des protéines du groupe Polycomb (PcG) en tant que répresseurs des gènes Hox [SCHUETTENGROBER et al. 2017].

Quelques années plus tard, des gènes appartenant au groupe Trithorax (trxG) ont été identifiés en tant que régulateur de l'expression du gène Hox. Les mutants perte de fonction *trxG* présentent des transformations homéotiques similaires à celles observées chez les mutants perte de fonction des gènes homéotiques de la drosophile. De plus, les mutations *trxG* avait un effet neutralisant sur les mutations PcG. Par exemple, une mutation perte de fonction *trxG* corrige l'apparition de peignes sexuels supplémentaires causée par une mutation perte de fonction du gène Pc chez des drosophile mâles hétérozygotes [GRUBER et ZAVOLAN 2019 ; SCHUETTENGROBER et al. 2017].

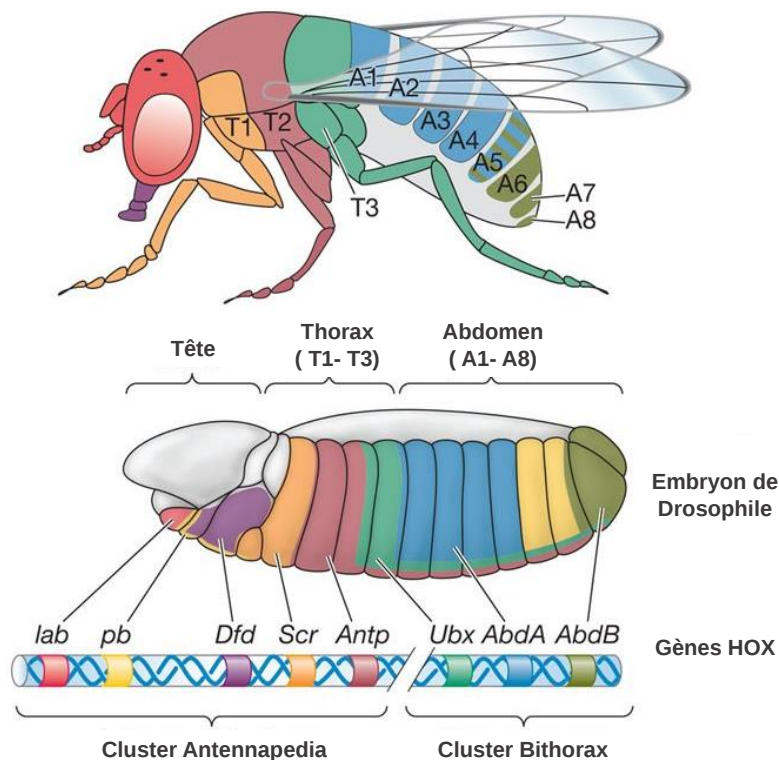


Figure 2.2 – Patron d'expression des gènes homéotiques des loci Antennapedia et Bithorax chez la drosophile.

Les gènes HOX déterminent l'identité segmentaire chez la Drosophile. Adaptée de [GRUBB 2006].

Bien que ces protéines puissent maintenir une mémoire cellulaire à long terme, l'expression de leurs gènes cibles est extrêmement dynamique au cours du développement. Ainsi, pour comprendre comment les protéines PcG et TrxG interviennent dans la mémoire épigénétique, différentes études ont examiné comment le système PcG - TrxG influe sur la flexibilité des états d'expression des gènes.

2.3.2 Comment la mémoire de transcription survit-elle à la réplication de l'ADN et à la mitose?

2.3.2.1 Les éléments de réponse aux Polycomb/Trithorax (PRE/TRE) chez la Drosophile

Les protéines PcG et TrxG agissent comme un système de mémoire cellulaire des états d'expression génique réprimés et activés respectivement et ce, sur de nombreuses générations cellulaires. Chez la Drosophile, ces complexes sont recrutés à la chromatine grâce aux éléments de réponse aux Polycomb (PRE) et Trithorax (TRE) [SCHUETTENGROBER et al. 2017].

Les PREs et les TREs sont des séquences d'ADN de taille variable. Leur position par rapport au gène régulé est aussi très variable pouvant se situer en amont ou en aval, proche, chevauchant ou loin du promoteur. Les PREs contiennent généralement des sites de fixation pour les protéines Pleiohomeotic PHO et les facteurs GAGA, qui servent de sites d'ancrage pour d'autres protéines PcG [KASSIS et BROWN 2013].

La double fonction des séquences PRE dans la répression et l'activation complique la compréhension de la complexité du recrutement des PcG [ERCEG et al. 2017]. En effet, l'activité du PRE dépend fortement du contexte génomique.

Une étude récente a montré que les séquences PREs sont proches ou se chevauchent avec les séquences activatrices de la transcription. Plus précisément, les PREs guident également l'action des protéines du groupe Trithorax, qui jouent un rôle dans l'activation de la transcription [JAENSCH et al. 2017].

Les TREs ne sont pas aussi bien définis mais semblent se chevaucher ou se rapprocher des PREs. Des expériences de ChIP ont montré que TrxG se liaient également aux PREs. Cependant, la relation entre les TREs et les PREs n'est pas encore parfaitement comprise [ERCEG et al. 2017; KASSIS et al. 2017].

2.3.2.2 Les éléments de réponse aux Polycomb chez les mammifères

Contrairement à la *Drosophile*, peu de données existent sur les séquences PREs chez les mammifères. Néanmoins, des séquences analogues à des PREs de *drosophile* ont été identifiées chez les mammifères. Les îlots CpG, des facteurs de liaison à l'ADN ainsi que les ARN non-codants sont considérés comme composants potentiels des PREs chez les mammifères [KASSIS et BROWN 2013].

Un PRE de 1,8 kb située entre les gènes HOXD11 et HOXD12 humains forme une région régulatrice dépendante de PcG présentant des similitudes avec les PRE de *Drosophile* [Woo et al. 2010]. Un autre PRE potentiel a été identifié dans les cellules T-humaines en aval du gène SLCA17. Cette séquence comporte des caractéristiques semblables aux PREs *Drosophile*, indiquant la conservation des mécanismes qui ciblent les PcG [CUDDAPAH et al. 2012].

2.3.3 Les protéines TrxG (Trithorax Group)

Les protéines TrxG sont un groupe de protéines, le plus souvent liées à l'activation de la transcription. Elles activent la transcription via une grande variété de mécanismes, notamment la modification covalente des histones et le remodelage de la chromatine ATP-dépendant. Les actions des protéines TrxG sont souvent décrites comme étant « antagonistes » de la fonction des protéines PcG [KASSIS et al. 2017]. Des études biochimiques ont révélé que les protéines trxG existent dans des complexes multiprotéiques distincts qui se lient à la chromatine. Une première classe de membres trxG est composée de facteurs contenant un domaine SET tels que les sous unités Ash1 et Ash2, impliquées dans la méthylation de H3K4 et H3K36, respectivement [KASSIS et al.

2017; SCHUETTENGROBER et al. 2017].

Le domaine SET (Suppressor of variegation 3-9, Enhancer of zeste and Trithorax) est un domaine protéique abritant une activité d'histone méthyltransférase (HMT) et très conservé entre les différentes histones lysines méthyltransférases [DILLON et al. 2005].

La protéine CBP est une acétyltransférase de l'H3K27 faisant partie du complexe d'acétylation Trithorax [KASSIS et al. 2017]. Un exemple de la conservation des protéines trxG est illustré par la protéine associée à la leucémie de lignée mixte (MLL). L'histone méthyltransférase MLL est l'orthologue humain de la protéine trithorax (trx) de *Drosophile* [HANSON et al. 1999].

Une deuxième classe de protéines trxG comprend les composantes de complexes de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP tels que le complexe SWI/SNF. Ce complexe peut réguler la liaison des facteurs de transcription à l'ADN.

Outre le maintien de la mémoire cellulaire, les protéines TrxG sont également impliquées dans d'autres processus, notamment : l'apoptose, le cancer, les réponses au stress, le contrôle du cycle cellulaire et le renouvellement des cellules souches.

2.3.4 Les complexes du PcG (Polycomb Group)

2.3.4.1 Les PcG de la *Drosophile* aux mammifères

Les protéines du groupe Polycomb (PcG) sont des facteurs épigénétiques répressors de la transcription. Ils agissent au niveau de leurs gènes cibles sous forme de grands complexes multimériques pour maintenir les profils d'expression des gènes établis durant le développement embryonnaire et ce, en régulant la structure de la chromatine.

Initialement, deux complexes protéiques majeurs ont été décrits chez la *Drosophile* : PRC1 et PRC2. Ces complexes sont extrêmement conservés parmi tous les organismes multicellulaires avec une complexification au cours de l'évolution [SIMON et KINGSTON 2013]. Ils agissent tous les deux en tant que modificateurs d'histones au niveau post-

traductionnel.

2.3.4.2 Les complexes PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1)

Le premier complexe Polycomb isolé de la Drosophile a été le complexe PRC1. Trois sous-unités principales forment le complexe PRC1 chez la drosophile : Polyhomeotic (Ph), Posterior Sex Comb (Psc) et dRing (Sex Comb extra, Sce) (Figure 2.3) [MOZGOVA et HENNIG 2015].

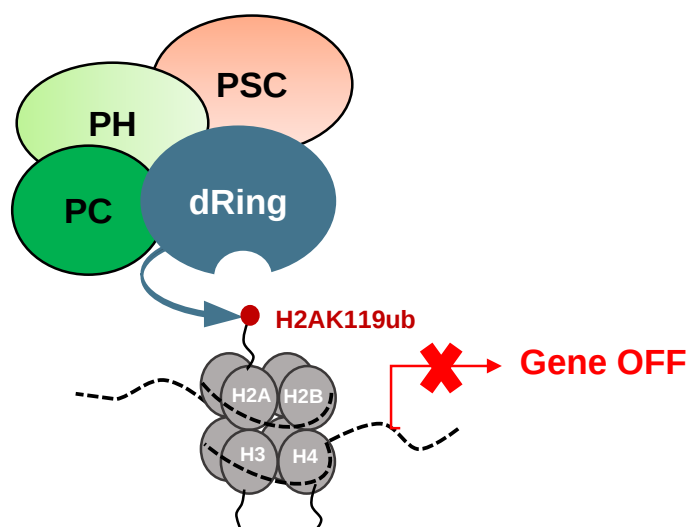


Figure 2.3 – Composition et fonction des complexes PRC1 chez la Drosophile.

Chez les mammifères, PRC1 est beaucoup plus diversifié, il existe plusieurs homologues pour chacune de ses protéines et chacune d'entre elles peut avoir plusieurs paralogues (Tableau 2.1). Les différentes combinaisons de ces paralogues génèrent une grande diversité du complexe. Il peut être subdivisé en deux complexes principaux, à savoir, PRC1 canonique (cPRC1) et PRC1 non-canonique (ncPRC1). Les deux complexes incluent toujours une composante centrale ayant une activité catalytique basale in vitro, la E3 ubiquitine ligase (Ring1A ou Ring1B). Elle catalyse la mono-ubiquitination de l'histone H2A au niveau de la lysine 119 (H2AK119ub1) [VANDAMME et al. 2011 ; LE FAOU et al. 2011 ; MOUSSA et al. 2019].

Tableau 2.1 – Tableau récapitulatif des composantes du PRC1 de la Drosophile et leurs homologues chez les mammifères.

PRC1 chez la Drosophile	PRC1 chez les mammifères
Polyhomeotic (Ph)	PHC 1 à 3
Posterior Sex Comb (Psc)	PCGF1, 2, 3, 4, 5, 6
dRing (Sex Comb extra, Sce)	RING1A et RING1B
Polycomb (Pc)	CBX 2, 4, 6, 7, 8

La présence des différentes sous-unités paralogues PRC1 augmente la complexité des mécanismes répresseurs possibles chez les mammifères. Des complexes légèrement différents avec une stoechiométrie similaire expliquent probablement l'existence de réactions plus dynamiques et spécifiques aux tissus.

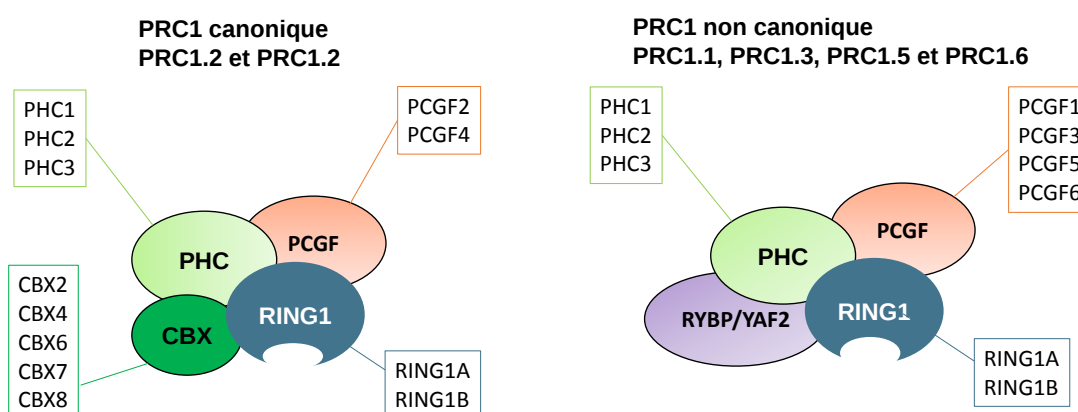


Figure 2.4 – Composition des complexes PRC1 canoniques et non canoniques des mammifères.

Les complexes canoniques contiennent les sous-unités CBX, les complexes non canoniques peuvent contenir RYBP ou YAF2. Adaptée de [CONNELLY et DYKHUIZEN 2017].

2.3.4.2.1 PRC1 canonique

Les complexes PRC1 canoniques (cPRC1) sont assemblés autour de PCGF2 ou PCGF4 et d'une protéine homologue polyhoméotique (Ph) (PHC1 - PHC3) pour former

les complexes PRC1.1 et PRC1.4. Ils sont spécifiés par la présence d'une des protéines CBX (CBX2, CBX4 et CBX6 - CBX8) qui se lie à H3K27me3 via son domaine « chromobox » favorisant ainsi le recrutement et la stabilisation de PRC1 dans des régions spécifiques de la chromatine (Figure 2.4) [VÖLKELE et al. 2012; MIERLO et al. 2019].

Comme dans les cellules ES, CBX7 est également requis pour l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques de souris (HSC), tandis que CBX2, CBX4 et CBX8 sont requis pour leur différenciation.

Les protéines CBX, grâce à leur chromodomaine, peuvent reconnaître et se lier à H3K27me3, une marque épigénétique déposée préalablement par l'autre complexe PcG (PRC2), facilitant ainsi le recrutement du complexe cPRC1. L'E3 ligase Ring du complexe cPRC1 catalyse le dépôt d'H2AK119ub1 qui contribue à la compaction de la chromatine [VANDAMME et al. 2011].

Cependant, ce modèle hiérarchique de recrutement séquentiel de PRC1 dépendant de PRC2 et d'H3K27 a été récemment remis en cause par la caractérisation biochimique de complexes PRC1 non canoniques, qui ne nécessitent pas de protéines CBX pour médier le dépôt d'H2AK119ub1 [VIDAL et STAROWICZ 2017; KASSIS et al. 2017].

2.3.4.2.2 PRC1 non canonique

En plus de la sous unité catalytique RING1, les complexes non canoniques PRC1 (ncPRC1) des mammifères contiennent une sous-unité RYBP ou YAF2 qui s'associe à PCGF1 PCGF3, PCGF5 ou PCGF6 pour assembler les complexes PRC1.1, PRC1.3, PRC1.5 et PRC1.6, respectivement (Figure 2.4) [VIDAL et STAROWICZ 2017; KASSIS et al. 2017]. Ces complexes ont été identifiés par leur capacité à réprimer la transcription indépendamment de leur liaison à H3K27me3 et en l'absence de protéine CBX. En effet, lors de la perte de PRC2 l'association de Ring1B à la chromatine et les niveaux de H2AK119Ub1 sont préservés [MARGUERON et al. 2009].

Le complexe PRC1.1 contient une l'histone déméthylase KDM2B spécifique de H3K36. Il a été proposé qu'elle soit importante pour le ciblage de PRC1 aux îlots CpG via son

domaine CXXC. Par conséquent, KDM2B permet un recrutement de novo de PRC1 et une perte du domaine CXXC de KDM2B entraîne une perte de l'occupation de ncPRC1 et un phénotype de transformation homéotique [BOOM et al. 2016 ; COOPER et al. 2016].

Le complexe PRC1.5 est capable d'interagir avec l'ARN non codant Xist ciblant PRC1 sur le chromosome X inactif de manière indépendante de H3K27me3 [BAJUSZ et al. 2018].

2.3.4.3 Les complexes PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2)

PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) est le deuxième complexe de la famille des PcG décrit dans ce manuscrit. Chez les mammifères, le complexe PRC2 canonique comprend 4 sous-unités centrales qui constituent le cœur du complexe : Enhancer of zeste homolog (Ezh), Embryonic ectoderm development (EED), Suppressor of zeste 12 (SUZ12) et RbAp46/48 qui possède un domaine de liaison aux histones. In vitro, ce tétramère est suffisant pour catalyser la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27) [LAUGESEN et al. 2019].

La triméthylation sur H3K27 médiée par PRC2 est une marque histone répressive de la transcription. Elle est nécessaire pour contrôler les programmes de répression des gènes impliqués dans le développement, la régulation de l'homéostasie tissulaire, le maintien de l'identité cellulaire et l'autorenouvellement des cellules souches [VÖLKELE et al. 2019].

Chez la Drosophile, la fonction catalytique de PRC2 est assurée par la protéine E(z), tandis que chez les mammifères, elle est remplie par deux protéines : Ezh1 et Ezh2 [VÖLKELE et al. 2019]. Les deux paralogues Ezh1 et Ezh2 sont les sous-unités catalytiques de PRC2 qui hébergent une activité histone méthyltransférase dans leur domaine SET qui catalyse la mono-, la di- et la triméthylation d'H3K27 (H3K27me1, H3K27me2 et H3K27me3, respectivement). Ezh1 et Ezh2 sont mutuellement exclusives dans le complexe PRC2 et fonctionnellement redondantes. Elles présentent des profils d'expression différents ; Ezh1 est plus abondant dans les organes adultes non

prolifératifs, tandis que l'expression de Ezh2 est étroitement associée à la prolifération [WASSEF et al. 2019].

Les sous-unités EED et SUZ12 servent principalement de stabilisateurs pour le complexe PRC2. RBBP4 est nécessaire à la fois pour la liaison du PRC2 aux nucléosomes non modifiés mais aussi pour une activité optimale de la méthyltransférase [VÖLKELE et al. 2019; LAUGESEN et al. 2019].

2.3.4.3.1 Implication d'EZH2 dans le cancer

L'essor récent des études génomiques à haut débit a souligné l'importance du rôle des régulateurs épigénétiques dans le développement du cancer. Parmi ceux-ci, l'histone méthyltransférase EZH2, qui joue un rôle essentiel puisqu'elle intervient dans le maintien d'un état inactivé de la chromatine au niveau de ses gènes cibles via des modifications post-traductionnelles des histones.

Selon les types de cancer, EZH2 est soit surexprimée, soit fait l'objet de mutations perte ou gain de fonction, ce qui aboutit à des niveaux aberrants d'H3K27me3. EZH2 a été trouvée surexprimée dans de nombreuses tumeurs solides (Tableau 2.2) et a été associée à des tumeurs particulièrement agressives et de mauvais pronostic. De plus, des mutations activatrices dans le domaine catalytique d'EZH2 ont été aussi détectées dans les lymphomes diffus à grandes cellules B. Par opposition à son rôle d'oncogène, des mutations inactivatrices d'EZH2 ont été également observées dans des leucémies myéloïdes lui suggérant un rôle de suppresseur de tumeurs. Par conséquent, l'activité d'EZH2 et le dépôt de la marque H3K27me3 sont perturbés par des mécanismes divers et variés dans de nombreux cancers [VÖLKELE et al. 2015].

Tableau 2.2 – Surexpression et mutations d'EZH2 identifiées dans différents types de cancers et gènes cibles affectés [KIM et ROBERTS 2016]

EZH2	Type de cancer associé	Les voies de régulation et les gènes cibles affectés
Surexpression d'EZH2	Prostate	DAB2IP, p16, CDK4, MSMB, ADRB2, E-cadherin, Ras, NF-kappaB, SLIT2, TIMP-2/3, régulateurs d'EMT
	Sein	CK5/6. P-cadherine, paralogues de RAD51, RUNX3, CDKN1C, FOXC1, la voie RAF1- β -catenine, RKIP, CIITA, KLF2
	Endomètre	p16, E-cadherin, sFRP1, DKK3, β -catenine
	Mélanome	p21/CDKN1A, DCK, AMD1, WDR19
	Vessie	inconnus
	Glioblastome	BMPR1B
	Foie	inconnus
	Poumons	Dkk-1
	Lymphome	Cyclin D1
	Ovaire	VASH1
Mutation d'EZH2 (gain de fonction)	Lymphome non-Hodgkinien Mélanome	Cdkn2a, Cdkn1a/p21, BLIMP1/PRDM1
Mutation EZH2 (perte de fonction)	Leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T Syndrome myélodysplasique Néoplasme myéloprolifératif	NOTCH / JAK-STAT, NOTCH1

En plus de son rôle dépendant de PRC2 en tant que modificateur d'histone, EZH2 peut agir aussi seule indépendamment du PRC2 dans le cancer. Par exemple, EZH2 interagit et méthyle la protéine non histone STAT3 dans le glioblastome et dans le cancer de la prostate [KIM et al. 2013]. EZH2 peut également méthyliser le récepteur aux androgènes (AR) ou participer dans des complexes associés aux récepteurs AR en tant que co-activateur dans le cancer de la prostate résistant à la castration (CPRC) [GAN et al. 2018].

2.3.4.3.2 La complexité du complexe PRC2 chez les mammifères : un seul ou plusieurs complexes PRC2

Plusieurs sous-unités facultatives associées de manière non stoechiométrique au « cœur » de PRC2 modulent son activité enzymatique ou participent à son recrutement et/ou à sa stabilisation au niveau des régions génomiques adéquates. Le complexe PRC2 des mammifères consiste en deux sous-complexes : PRC2.1 et PRC2.2, dans lesquels le « cœur » de PRC2 est associé à des co-facteurs distincts [MIERLO et al. 2019; HEALY et al. 2019]. Ces facteurs font actuellement l'objet de nombreuses études.

(A) PRC2.1

Les complexes PRC2.1 incluent l'un des trois homologues de la protéine Polycomb-like ainsi que l'une des deux protéines récemment découvertes : EPOP (Elongin and Polycomb-associated Protein) et C10ORF12 (Figure 2.5) [HOLOCH et MARGUERON 2017]. Les protéines Polycomb-like seront abordés en détail dans la partie *Polycomb-like* (section 2.4).

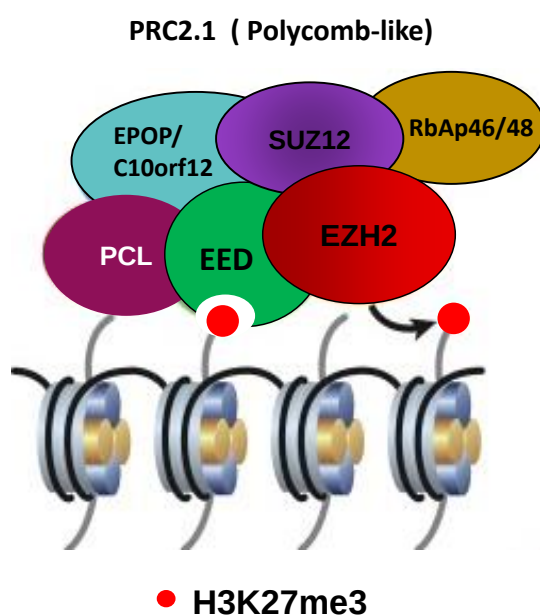


Figure 2.5 – Composition du complexe PRC2.1 des mammifères

Les complexes PRC2.1 contiennent les protéines Polycomb-Like et l’une des deux protéines EPOP ou C10ORF12 (Adaptée de [HOLOCH et MARGUERON 2017]).

EPOP (C17orf96) est une protéine généralement non structurée et dépourvue de domaines conservés connus. Elle est fortement exprimée dans les cellules ES de souris et dans les deux lignées cellulaires humaines HeLa et HEK293T [ZHANG et al. 2011].

Les données de spectrométrie de masse montrent que EPOP interagit avec PRC2 dans les cellules ES de souris. EPOP semble améliorer aussi l’activité catalytique de PRC2 *in vitro*. Cependant, une inactivation d’EPOP entraîne l’augmentation de la liaison de PRC2, ce qui laisse penser que EPOP peut servir à restreindre l’occupation et l’activité de PRC2, permettant ainsi aux gènes cibles de maintenir un niveau basal de transcription [LIEFKE et SHI 2015 ; MIERLO et al. 2019 ; HOLOCH et MARGUERON 2017].

La protéine C10orf12 (Gm340 chez la souris) fait partie des sous-unités secondaires PRC2. Sa présence dans PRC2.1 est mutuellement exclusive avec celle de EPOP. Une étude récente a montré que C10ORF12 augmente de manière significative l’activité d’histone méthyltransférase de PRC2 *in vitro* dans les cellules HeLa et augmente considérablement les niveaux totaux d’H3K27me3 [SHI et al. 2019 ; HEALY et al. 2019].

Il est suggéré que des complexes contenant uniquement une sous-unité PCL ou uniquement une sous-unité EPOP/C10orf12 se forment également.

(B) PRC2.2

Au sein des complexes PRC2.2, les sous-unités de base de PRC2 s'associent à AEBP2 et à JARID2 (Figure 2.6). Ces dernières renforcent de manière synergique l'activité catalytique de EZH2.

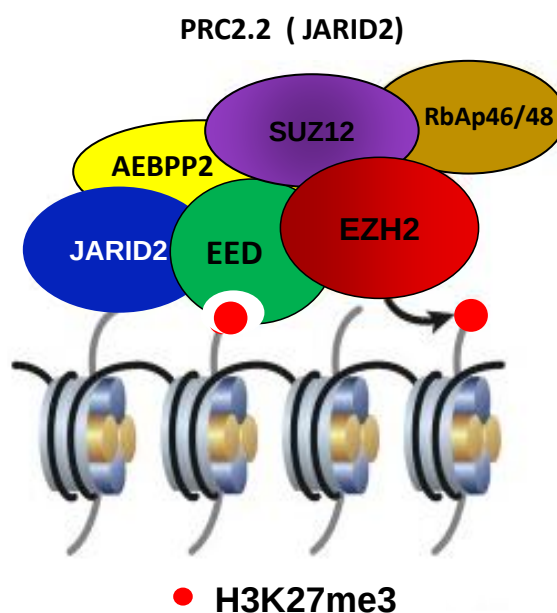


Figure 2.6 – Composition du complexe PRC2.2 des mammifères. Le complexe PRC2.2 contient les deux protéines AEBP2 et JARID2 (Adaptée de [HOLOCH et MARGUERON 2017]).

AEBP2 est une protéine à doigts de zinc qui interagit de manière extensive avec plusieurs sous-unités principales de PRC2 et stabilise fortement la structure du complexe. La base de la stimulation du PRC2 par AEBP2 n'est pas bien comprise, mais il a été proposé qu'elle résulte d'une capacité à verrouiller le complexe dans une conformation enzymatiquement active [MIERLO et al. 2019; HOLOCH et MARGUERON 2017].

JARID2 est un membre de la famille des protéines Jumonji. La stimulation de PRC2 par JARID2 est clairement liée à la capacité de son domaine ARID à se fixer à l'ADN et de sa région N-terminale d'interagir avec les nucléosomes facilitant ainsi le ciblage de

PRC2 [SANULLI et al. 2015; HEALY et al. 2019].

Un autre moyen par lequel JARID2 augmente l'activité méthyltransférase du PRC2 consiste à lui servir de substrat. PRC2 méthyle JARID2 sur la lysine 116 (JARID2-K116me) à la fois in vitro et in vivo. Une étude a montré que JARID2-K116me³ peut promouvoir l'activation allostérique du PRC2 par le même mécanisme décrit pour H3K27me³. Cette découverte soulève aussi la possibilité que d'autres substrats non-histones du PRC2 restent à identifier [SANULLI et al. 2015; ZHANG et al. 2011]. JARID2 se lie à l'histone H2A monoubiquitinylé sur la Lysine 119, faisant ainsi le lien avec le complexe PRC1 (voir plus loin).

2.4 Les protéines Polycomb-like

2.4.1 Les protéines Polycomb-like chez la Drosophile

Polycomb-like (PCL) est le deuxième gène du groupe Polycomb qui a été mis en évidence grâce à des mutants de la Drosophile. Son phénotype est similaire à celui des mutants Polycomb, avec des défauts de développement et de segmentation, d'où son nom de Polycomb-like. Comme les protéines PcG, les PCL sont elles aussi essentielles pour une expression spatiale correcte des gènes HOX. Les mutants PCL chez la drosophile sont sévèrement affectés.

Les homozygotes meurent au cours de l'embryogenèse et la plupart des hétérozygotes meurent ou présentent des défauts de développement et de segmentation à l'âge adulte [DUNCAN 1982].

En plus du complexe PRC2 majoritaire de 600 KD bien connu chez la Drosophile, un autre complexe PCL-PRC2 de plus haut poids moléculaire (1-MDa), contenant l'histone désacétylase RPD3 ainsi qu'une protéine Polycomb-like a été caractérisé [TIE et al. 2003].

Les PcGs ne possédant pas de domaines de liaison à l'ADN connus. Chez la drosophile, le Pho Repressive Complex (PhoRC) est un complexe de protéines de liaison à l'ADN,

impliqué dans le recrutement des PcGs. PhoRC s'associe aux PREs, ce qui permet l'interaction avec Polycomb-like PCL, suivi du recrutement de PRC2 (séquence A de la figure 2.7) [SAVLA et al. 2008].

Dans d'autre cas, PhoRC s'associe aux PREs et aux promoteurs proximaux et interagit directement avec les sous-unités ESC et E(Z) pour recruter PRC2 au niveau des PREs (séquence B de la figure 2.7) [KAHN et al. 2014].

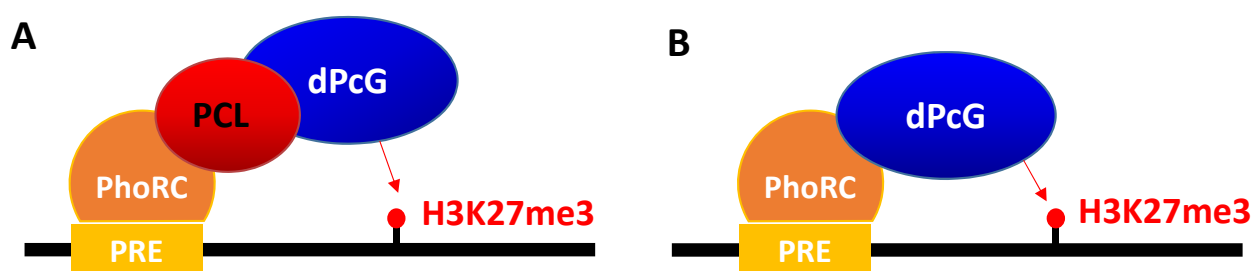


Figure 2.7 – Le recrutement du complexe PcG au niveau du PRE.

(A) La fixation du complexe PhoRC sur le PRE est suivie de l'arrivée de Polycomb-like puis du PRC2 qui met en place la marque épigénétique répressive H3K27me3. (B) La fixation du complexe PhoRC sur le PRE permet le recrutement direct du PRC2 puis la mise en place d'H3K27me3.

2.4.2 Les protéines Polycomb-like chez les mammifères

Il existe trois orthologues humains de l'unique protéine Polycomb-Like de la *Drosophile* (Figure 2.8) : hPCL1 (ou PHF1 : PHD Finger protein1), hPCL2 (ou MTF2 : Metal response element binding transcription factor 2) et hPCL3 (ou PHF19 : PHD finger protein 19) [WANG et al. 2004b].

Ces trois protéines sont impliquées dans le recrutement et la stabilisation du PRC2 au niveau des gènes cibles et font partie du sous-complexe PRC2.1 dépourvu de JARID2 (voir section PRC2.1) [MIERLO et al. 2019].

Les trois orthologues PCL présentent une expression différentielle dans de nombreux tissus adultes et embryonnaires [WANG et al. 2004b ; BOULAY et al. 2010]. En effet, PHF1

est plutôt exprimée dans les tissus adultes, PCL2 au cours du développement et dans les cellules souches [WALKER et al. 2010] tandis que hPCL3 est surexprimée dans de nombreux cancers [WANG et al. 2004a].

2.4.2.1 Structure des protéines Polycombe-like : Une organisation en domaines conservés

Toutes les protéines PCL présentent une organisation en modules fonctionnels très conservée qui consiste en un module N-terminal composé de trois domaines fonctionnels bien définis : Un domaine TUDOR suivi de deux domaines PHD (Plant Homeo Domain) et un domaine appelé EH pour (Extended-Homology) et qui sont conservés dans les protéines Polycomb-Like chez la Drosophile. Leur extrémité C-terminale est très divergente sauf pour un domaine appelé « chromo-like Domaine » ou « Reverse Chromo-Domaine » faiblement homologue au chromo-domaine présent dans de nombreuses protéines associées à la chromatine (Figure 2.8) [BRIEN et BRACKEN 2015].

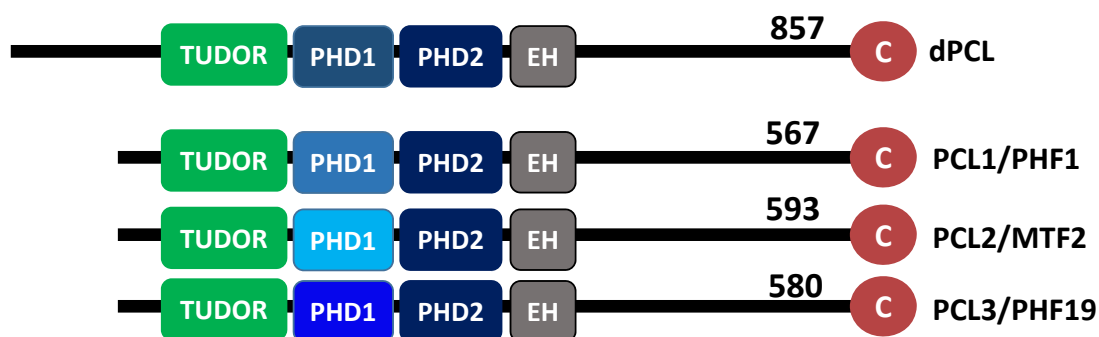


Figure 2.8 – Structure de la protéine Polycomb-like.

La présentation schématique des PCL de la Drosophila dPCL et des trois orthologues humains PCL1, PCL2 et PCL3 avec les domaines conservés TUDOR, PHD1 et PHD2, le domaine de liaison à l'ADN (EH) et le domaine « Chromo-like » (C) adaptée de [CHOI et al. 2017].

(a) Le domaine TUDOR

Le domaine TUDOR est un motif structural protéique d'une cinquantaine acides aminés très conservés, identifié à l'origine chez la Drosophile comme étant impliqué

dans la liaison à l'ARN. Ensuite il a été identifié en tant qu'un module d'interaction protéine-protéine. Leur premier rôle dans la transcription des gènes est attribué à la reconnaissance des modifications post-traductionnelles d'histones [ARKOV et al. 2006; LU et WANG 2013].

En effet, il a été démontré que plusieurs protéines à domaine TUDOR interagissaient avec des histones modifiées. A titre d'exemple, 53BP1 possède des domaines TUDOR répétés en tandem qui lient la Lysine 20 de l'histone H4 diméthylée (H4K20me2), alors que les domaines TUDOR de JMJD2A lient la Lysine 4 de l'histone H3 et la Lysine 20 de l'histone H4 triméthylée (H3K4me3 et H4K20me3, respectivement)[ARKOV et al. 2006; MUSSELMAN et al. 2012].

Dans le cas des protéines Polycomb-like humaines, le domaine TUDOR contient une « cage aromatique » constituée par les Acides Aminés W50, Y56, F74 et Y80, qui fixe avec très haute affinité la marque épigénétique activatrice H3K36me3 [BALLARÉ et al. 2012; BRIEN et al. 2012; CAI et al. 2013], tandis que chez la Drosophile, le domaine TUDOR du Polycomb-like possède une « cage aromatique » incomplète, auquel il manque deux résidus aromatiques, ne lui permettant pas d'interagir avec les résidus méthylés [FRIBERG et al. 2010]. L'importance des résidus aromatiques dans le domaine TUDOR a été soulignée par le fait que la substitution des W50, Y56, F74, Y80 et W41 ou Y47 par une Alanine a perturbé la liaison à H3K36me3 alors même que la structure de la protéine restait intacte [MUSSELMAN et al. 2012; BALLARÉ et al. 2012].

Un modèle de souris inactivant partiellement PCL2 et exprimant la protéine PCL2 délétée de son domaine TUDOR présente des altérations axiales du squelette, similaires aux transformations observées chez les mutants Polycomb [LI et al. 2011]. Ce phénotype est corrélé avec l'expression ectopique de gènes homéotiques; le domaine TUDOR paraît donc nécessaire à la mise en place de l'axe antéro-postérieur chez les mammifères.

(b) Les domaines PHD

Le domaine PHD est un motif protéique d'environ 60 acides aminés caractérisé par le motif Cys4-His-Cys3 : deux atomes de zinc stabilisent le domaine par des cystéines et une histidine. Le domaine PHD forme un domaine globulaire à 2 brins β et une hélice α . Il se trouve dans plusieurs protéines eucaryotes impliquées dans la régulation de l'expression génique, y compris les protéines KAP-1/TIF1 β , et CBP/p300 [CAPILI et al. 2001]. Les domaines PHD des protéines Polycomb-Like sont essentiellement impliqués dans les interactions protéine-protéine [SANCHEZ et ZHOU 2011 ; O'CONNELL et al. 2001].

- Le domaine PHD1 : est faiblement conservé parmi les 3 orthologues humains et serait donc associé à des fonctions spécifiques de chaque orthologue. Le domaine PHD1 de PHF1 a été impliqué dans les interactions protéine-protéine spécifique avec P53 [BRIEN et al. 2015] et H4R3me2s [LIU et al. 2018a].

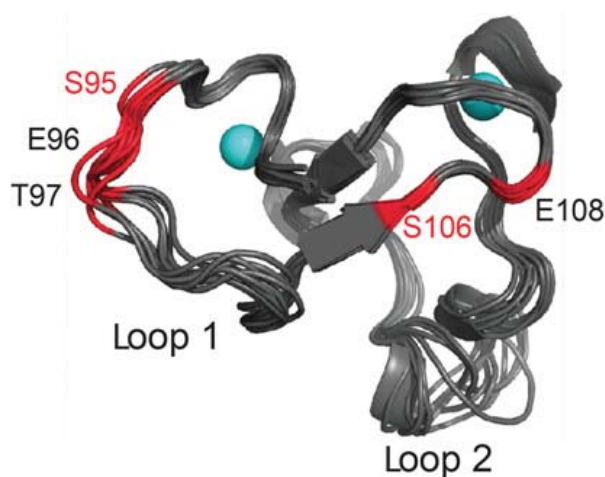


Figure 2.9 – Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du domaine PHD1 de PHF1 [BRIEN et BRACKEN 2015].

- Le domaine PHD2 : est très conservé et impliqué dans l'interaction avec les composants du PRC2 cœur, en particulier avec EZH2 et SuZ12. PHD2 intervient aussi dans la fixation à l'ADN [PERINO et al. 2018].

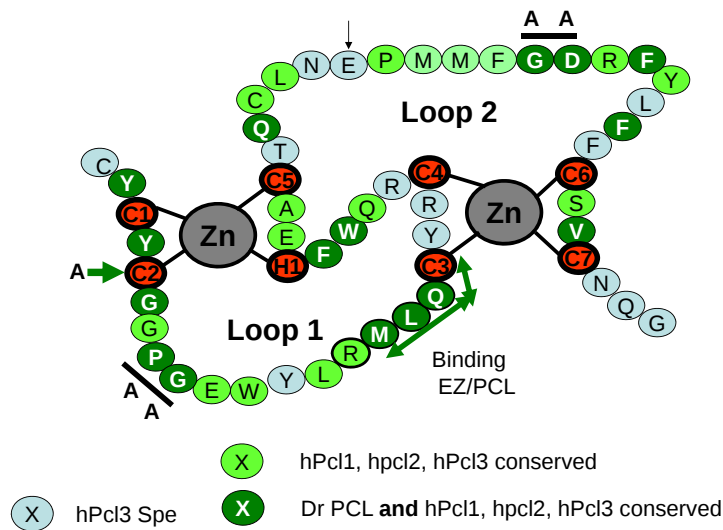


Figure 2.10 – Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du domaine PHD2 de Polycomb-like.

Chez la Drosophile, les deux domaines PHD, PHD1 et PHD2, interagissent avec la protéine EZ [O'CONNELL et al. 2001]. Dans les cellules ES, la protéine PCL2 déletée de ses deux domaines PHD1 et PHD2 n'est plus détectée sur ses gènes cibles endogènes [CASANOVA et al. 2011].

PHD1 Domain									
C4HC3	1	2	3	4	5	6	7	8	
Human	EPK	CNI	CLGKTSGPLNEILI	-CGKC	GGLGY	HQQ	CHIPIAGSADQPLLTPWF	CRR	CIFA 56
Bos	EPK	CNI	CLGKTSGPLNEILI	-CGKC	GGLGY	HQQ	CHIPIAGSADRPLLTPWF	CRR	CIFA 56
Mus	EPK	CDV	CMGKTSGPMNEILI	-CGKC	GGLGY	HQQ	CHIPIAVDANWPLLTHWF	CRR	CIFA 56
Rat	EPK	CDV	CMGKTSGPMNEILI	-CGKC	GGLGY	HQQ	CHIPIAVDANWPLLTHWF	CRR	CIFA 56
Xen	QPK	CNV	CTGKSSLPLNEILI	-CGKC	GGLGY	HQK	CHIPVVDSENGPLEPWF	CRR	CIFV 56
Drome	GPM	CVA	CKRSD---	IEDVVEI	CER	CGRGY	HRC	TVEIVTGSG----	IWSC
Cons	*	*	*	.	:::	*	:	***:	* : : . . * *: **

PHD2 Domain									
C4HC3	1	2	3	4	5	6	7	8	
Human	QQCY	CYC	GGPGEWYLRMLQ	CYRC	RQWF	HEACT	QCLNEPMMFGDRFYLF	FC	SVCN 54
Bos	QQCY	CYC	GGPGEWYLRMLQ	CYRC	RQWF	HEACT	QCLNEPMMFGDRFYLF	FC	SVCN 54
Mus	QQCY	CYC	GGPGEWYLRMLQ	CYRC	RQWF	HEACT	QCLSEPMVFGDRFYLF	FC	SVCN 54
Rat	QQCY	CYC	GGPGEWYLRMLQ	CYRC	RQWF	HEACT	QCLSEPMVFGDRFYLF	FC	SVCN 54
Xen	QQCY	CYC	GGPGEWYLRMLQ	CYRC	RQWF	HEACT	QCLNEPMMFGDRFYAFL	FC	SVCN 54
Drome	EQIY	CYC	CGKPGKFDHNMMLQ	CCK	CRNWF	HTQ	CMQNFKKLLRGDMFFV	FC	CTVCN 54
Cons	*	*****	**::	.*: **	: ** : **	*	* : . . : : **	*	: * : **

Figure 2.11 – Alignement multiple des séquences en acides aminés des domaines PHD1 et PHD2 de différents organismes.

(c) Le domaine EH « Extended Homology »

Le domaine EH a été d'abord caractérisé comme un domaine d'homologie étendue avec PCL chez la drosophile [CASANOVA et al. 2011]. Récemment il a été impliqué dans la fixation à L'ADN au niveau des séquences riches en GC [PERINO et al. 2018; LI et al. 2017].

Le domaine EH de PHF1 se replie en un domaine contenant trois hélices α et trois feuillets β . Une recherche d'homologie basée sur la structure a montré qu'il ressemble à une série de motifs de type « hélice ailée » impliqués dans de liaison à l'ADN. En effet, il permet de fixer des régions spécifiques de l'ADN par le biais de son motif hélice ailée dans la région EH-Winged Helix (EHWH). Ce motif EHWH se lie préférentiellement au ilots CpG faiblement ou non méthylés [LI et al. 2017].

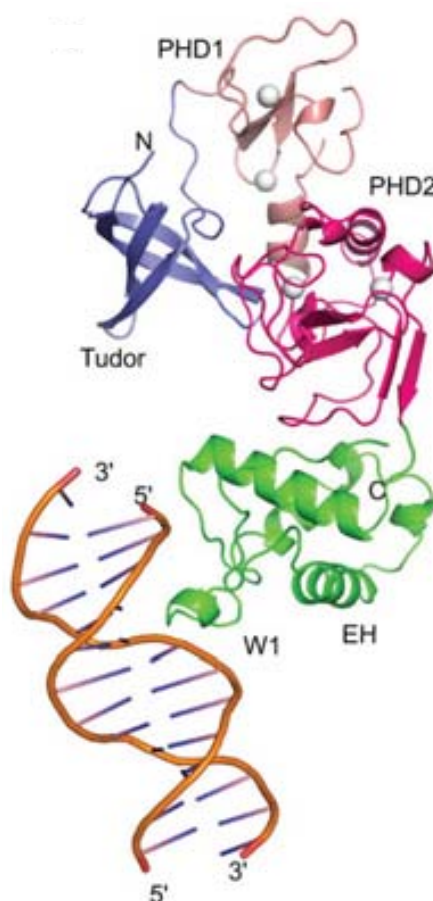


Figure 2.12 – Représentation schématique de l'interaction du domaine EH de Polycomb-like et l'ADN [LI et al. 2017].

Les alignements de séquence montrent que les résidus dans le motif EHWH permettant la liaison à l'ADN sont conservés dans les domaines EH des protéines Polycomb-like des vertébrés et absents dans les autres motifs de type « hélice ailée » suggérant que le mécanisme de reconnaissance des CpG par le domaine EH est spécifique pour les protéines Polycomb-like [PERINO et al. 2018].

(d) Le chromo-like domaine (C)

Enfin, le domaine COOH-terminal des protéines Polycomb-like présente une faible homologie avec le chromodomaine, identifiée dans de nombreuses protéines associées à la chromatine [WANG et al. 2004b].

Ce *chromo-like* domaine montre une structure partiellement homologue aux chromodomaines identifiés pour la première fois dans les protéines HP1. De plus, la prédiction de la structure secondaire par bioinformatique a montré que à l'inverse des chromodomaines, l'hélice α de hPCL3 est N-terminale par rapport aux feuilles β , d'où l'appellation « chromodomaine inversé ». Cette hélice α semble être conservée dans PCL2, PCL3 et l'homologue PCL de la Drosophile, mais elle n'a pas été prédite pour PCL1 [BALLARÉ et al. 2012].

Des expériences de co-immunoprécipitation semi-endogène avec les différentes parties de hPCL3 ont permis de démontrer que l'extrémité C-terminale de PCL3 est nécessaire et suffisante pour co-immunoprécipiter la protéine SUZ12 endogène. Ce qui indique que cette région participe au recrutement de PRC2 à la chromatine [BALLARÉ et al. 2012].

2.4.2.2 PCL1 ou PHF1

La protéine PHF1 a été identifiée pour la première fois chez l'homme sur la base de la similarité de séquence avec PCL de la Drosophile [O'CONNELL et al. 2001]. PHF1 est associée à divers rôles fonctionnels au niveau chromatinien et non chromatinien :

2.4.2.2.1 Rôle au niveau chromatinien

(A) Dans la fixation de la marque H3K36me3

L'orthologue humain PHF1 a été co-purifié avec un sous-ensemble de PRC2 [O'CONNELL et al. 2001], celui-ci renforce l'activité catalytique du PRC2 dans la lignée des cellules humaines HEK293T. En effet, le domaine TUDOR de PHF1 fixe avec une forte affinité la Lysine 36 triméthylée de l'histone H3 (H3K36me3) et s'appuie sur cette interaction pour recruter le complexe PRC2 à la chromatine [LI et al. 2017].

Des études cristallographiques et fonctionnelles ont révélé aussi que la fixation du domaine EH de PHF1 à l'ADN lui permet de stabiliser PRC2 sur la chromatine et de stimuler son activité [CHOI et al. 2017]. L'inactivation d'Ezh2 tout comme PHF1 a entraîné une réduction des niveaux globaux de H3K27me3. En conséquence, l'ajout de PHF1 a spécifiquement stimulé la capacité de Ezh2 à catalyser la modification H3K27me3 mais pas H3K27me1/H3K27me2 in vitro [SARMA et al. 2008]. Ainsi, PHF1 module l'activité de Ezh2 en faveur de la marque répressive H3K27me3 [HEALY et al. 2019].

Dans certains cas, le recrutement de PRC2 pourrait impliquer d'autres co-facteurs en plus des Polycomb-like. En effet, dans les fibroblastes WI38 normaux, il a été démontré que la protéine HIC1 recrute PHF1 et le complexe PRC2 pour certains gènes cibles de HIC1 tels que ATOH1, les promoteurs EFNA1 et CXCR7, confirmé par la détection des taux élevés de triméthylation d'H3K27 par EZH2 [BOULAY et al. 2010]. Cependant, le modèle de recrutement des PcG à la chromatine uniquement par le biais des facteurs de transcription est remis en cause.

(B) En réponse aux dommages à l'ADN

PHF1 s'est également avéré former des complexes avec des protéines impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN. Les interactions TUDOR-H3K36me3 et EH-ADN stabilisent PHF1 au niveau des cassures double brin de l'ADN conjointement avec les complexes de réparation de l'ADN PARP1 et Ku70-Ku80 [CHOI et al. 2017;

LI et al. 2017]. La liaison du domaine TUDOR-PHF1 à H3K36me3 stabilise le nucléosome dans une conformation dans laquelle l'ADN est plus accessible aux protéines de réparation. De plus, l'inactivation de PHF1 conduit à une sensibilité aux rayons X et augmente la fréquence de recombinaison homologue dans les cellules HeLa, ce qui laisse supposer que PHF1 favoriserait le processus de réparation par le mécanisme de jonction d'extrémités non-homologues (NHJ) et participe ainsi au maintien de la stabilité génomique [HONG et al. 2008 ; MUSSELMAN et al. 2012].

(C) Dans la fixation de la marque H4R3me2

Bien que des progrès significatifs aient permis de bien caractériser la fonction du domaine TUDOR, le rôle des domaines PHD reste mal définis. Une étude récente a montré que le domaine PHD1 de PHF1 reconnaît la diméthylation symétrique d'arginine 3 de l'histone H4 (H4R3me2s), un substrat du complexe PRMT5-WDR77 (séquence A de la figure 2.13), tandis que le domaine PHD2 interagit directement avec DDB1, une composante principale du complexe DDB1-CUL4B-Ring E3 ligase (CRL4B), responsable de la mono-ubiquitination d'H2AK119 (séquence B de la figure 2.13). Ce modèle de dépôt de marque H2AK119ub1 par le complexe CRL4B reproduit le modèle de recrutement de PRC2 par l'intermédiaire d'H2AK119ub1 (voir la section 2.4.3).

PHF1 facilite le dépôt coordonné des marques épigénétiques répressives H4R3me2s et H2AK119ub1 par le complexe PRMT5-WDR77/CRL4B permettant la répression transcriptionnelle de plusieurs gènes cibles. Parmi ceux-ci la E-cadhérine et FBXW7, qui jouent un rôle essentiel dans la croissance et la migration tumorale. De plus, la surexpression de PHF1 est négativement corrélée avec l'expression l'E-cadhérine et FBXW7. Cette surexpression de PHF1 favorise la prolifération cellulaire et l'invasion des lignées cancéreuses mammaires in vitro et in vivo[Liu et al. 2018b].

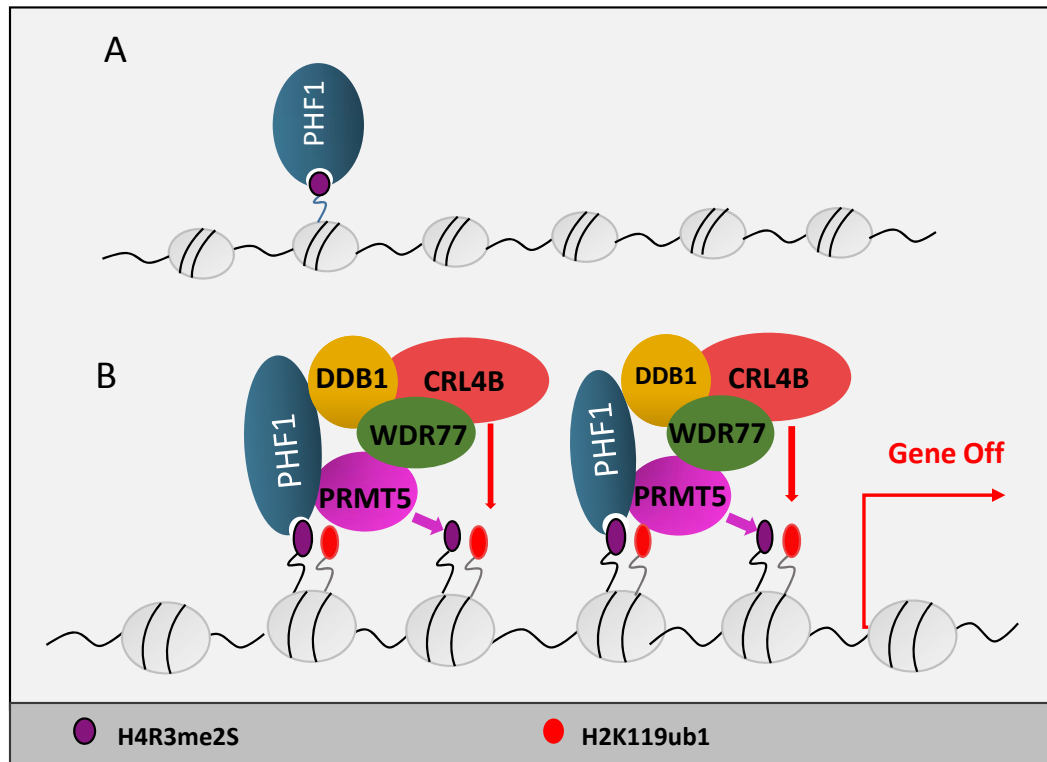


Figure 2.13 – PHF1 est un lecteur de la marque épigénétique histone H4R3me2. (A) PHF1 reconnaît la marque épigénétique H4R3me2s (B) les complexes PRMT5/WDR77 et DDB1-CRL4B sont recrutés par PHF1 pour le dépôt des modifications histone H4R3me2s et H2AK119ub1 pour maintenir la répression des gènes cibles. Adapté de [Liu et al. 2018b].

2.4.2.2.2 Rôle au niveau non chromatinien

D'autres travaux plus récents ont identifié un rôle indépendant de la chromatine de PHF1. Ce dernier est fortement exprimé dans des cellules quiescentes, interagit avec p53 et permet sa stabilisation pour induire la quiescence cellulaire [YANG et al. 2013; BRIEN et al. 2015; BRIEN et BRACKEN 2015]. Selon une boucle de régulation positive, PHF1 stabilise P53 et empêche sa dégradation alors que le promoteur du gène PHF1 est à son tour, une cible directe de transcription par p53 (Figure 2.14). De plus, la déplétion de PHF1 dans les cellules quiescentes reproduit les effets observés par la perte de p53, conduisant à une incapacité à maintenir la quiescence cellulaire. Ces résultats dévoilent que PHF1 a évolué vers une nouvelle fonction indépendante du PRC2 et de

la chromatine dans la régulation de la voie p53 et de la quiescence cellulaire [BRIEN et BRACKEN 2015].

Cette nouvelle fonction est obtenue par la liaison du domaine PHD1 du PHF1 au domaine C-terminal de p53 par le biais de deux résidus sérines spécifique à PHF1 (S95 et S106). Le domaine PHD1 de PCL1 a ainsi divergé fonctionnellement de celui du PCL2 et PCL3 via ces deux résidus acquis au cours de l'évolution [BRIEN et BRACKEN 2015].

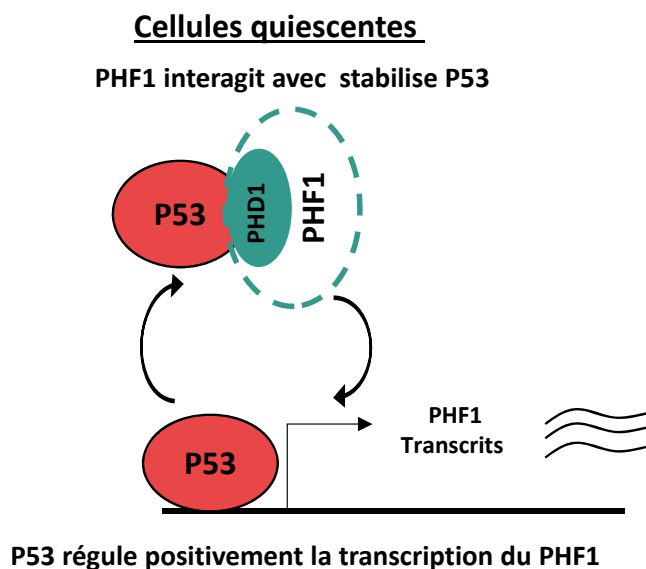


Figure 2.14 – L'axe PHF1-p53 favorise la quiescence cellulaire.

Au niveau non chromatinien, PHF1 interagit avec P53 et augmente sa stabilisation. La protéine p53 transactive à son tour le gène PHF1. Adapté de [BRIEN et BRACKEN 2015].

2.4.2.2.3 Rôle oncogénique de PHF1 : translocation PHF1

Le gène PHF1 est fréquemment transloqué dans les sarcomes du stroma endométrial. En effet, les fusions JAZF1-PHF1, EPC1-PHF1 et BRD8-PHF1 ont été mis en évidence [MICCI et al. 2006; DICKSON et al. 2018]. Des fusions similaires dans différents types de cancers ont été décrites. Notamment, dans les tumeurs fibromyxoïdes ossifiantes (MEAF6-PHF1 et EPC1-PHF1) et les sarcomes du stroma non-endométriaux (JAZF1-PHF1) [SCHOOLMEESTER et al. 2013; ANTONESCU et al. 2014; GRAHAM et al. 2013].

Tous les partenaires de fusion PHF1, JAZF1, EPC1, MEAF6 et BRD8 fonctionnent comme des régulateurs de la transcription, soit par la formation de motifs en doigts de zinc, soit en modifiant l'acétylation des histones [MICCI et al. 2017].

Cependant, les mécanismes par lesquels les produits du gène de fusion PHF1 pourraient contribuer à l'oncogenèse restent encore inexplorés. Bien que ces transcrits chimeriques conservent la totalité de la région codante de PHF1, sa région promotrice est perdue dans la translocation, ce qui implique que la régulation de la transcription de PHF1 est altérée, ce qui pourrait contribuer à la tumorigenèse par un recrutement erroné du complexe PRC2 au niveau de ses gènes cibles, conduisant potentiellement à une induction de répression [BRIEN et al. 2015].

2.4.2.3 PCL2 ou MTF2

PCL2 a été principalement étudié dans le modèle des cellules ES. Il est exprimé à des niveaux élevés au cours de l'embryogenèse précoce et dans les cellules souches embryonnaires (ES). Lors de la suppression du PCL2, l'état des cellules ES reste inchangé, accompagné d'une incapacité à se différencier [WALKER et al. 2011].

Les analyses fonctionnelles par inactivation de PCL2 dans des cellules ES montre que Pcl2 facilite le recrutement du PRC2 sur ses gènes cibles, notamment sur le chromosome X inactif, bien que la présence de PCL2 ne soit pas requise pour l'établissement de l'inactivation du chromosome X. La perte de PCL2 n'abolit pas les niveaux globaux d'H3K27me3 mais a entraîné une diminution de d'H3K27me3 au niveau de ses gènes cibles spécifiques [CASANOVA et al. 2011]. Cependant, seuls les domaines TUDOR de PHF1 et PCL3 mais pas celui de PCL2 fixent la marque épigénétique H3K36me3 pour recruter PRC2 à la chromatine [LI et al. 2017].

Des études structurales ont montré que les protéines PCL interagissent avec l'ADN. Particulièrement, le rôle de PCL2 dans le ciblage du PRC2 à la chromatine dépend de manière cruciale de son domaine de fixation à l'ADN EH (Figure 2.15). Ce domaine confère à PCL2 une capacité de lier sélectivement des régions riches en CG faiblement

méthylés, qui distinguent des îlots CpG méthylés non-ciblés.

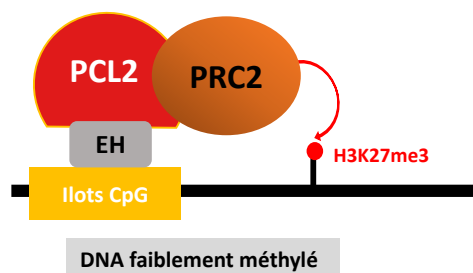


Figure 2.15 – PCL2 se lie spécifiquement aux trinuéclotides GpG non méthylés. Adapté de [PERINO et al. 2018]

Des travaux de recherche récents ont démontré que dans le contexte d'un rôle des PcG tissu spécifique, PCL2 est un régulateur épigénétique essentiel de la voie Wnt/ β -catenine au cours de l'érythropoïèse. En effet, les progéniteurs érythroïdes dans des mutants homozygotes de souris, PCL2 $-/-$ présentent des taux de PRC2 nettement réduits et une perte globale d'H3K27me3 au niveau des régions proximales des promoteurs de gènes. La voie Wnt/ β -catenine activée dans les érythroblastes déficients en PCL2 bloque le développement définitif des cellules érythroïdes, aboutissant au décès des embryons PCL2 $-/-$ au stade e15.5 suite à une anémie sévère. Dans les érythroblastes, PCL2 réprime directement la voie de signalisation Wnt dans les érythroblastes, conduisant à la signalisation Wnt/ β -catenine canonique et régule la maturation érythroïde en contrôlant les gènes de différenciation, notamment Gata2, Fli1 et Myb [ROTHBERG et al. 2018].

2.4.2.4 PCL3 ou PHF19

Dans plusieurs études, hPCL3 a été décrite en tant que composante du complexe PRC2. hPCL3 a fait actuellement l'objet de nombreuses études soulignant son importance dans le contexte de recrutement du PRC2 et la répression génique [BALLARÉ et al. 2012; HUNKAPILLER et al. 2012].

D'abord, PCL3 a été rapporté en tant que partenaire de Suz12 dont l'inhibition a entraîné une réduction globale des niveaux d'H3K27me3 et a altéré l'occupation

de Suz12 au niveau de ses gènes cibles dans les cellules ES [BALLARÉ et al. 2012; HUNKAPILLER et al. 2012]. De plus, l'inactivation de PCL3 entraîne la perte de pluripotence et des défauts de différenciation indiquant le rôle de PCL3 dans l'auto-renouvellement des cellules ES.

Les cellules ES (PCL3 $-/-$) ré-exprimant d'une manière ectopique un variant de PCL3 portant une mutation ponctuelle (W50A) dans son domaine TUDOR présentent une réduction globale d'H3K27me3 et une perturbation à l'échelle génomique du recrutement du PRC2 [BALLARÉ et al. 2012].

Par la suite, plusieurs études ont montré que le domaine TUDOR de PCL3 se lie avec une forte affinité à H3K36me3 via une « cage aromatique » conservée, une caractéristique commune avec PHF1 [HUNKAPILLER et al. 2012; CAI et al. 2013].

Des données structurales ont révélé une spécificité du domaine TUDOR pour la marque histone H3K36me3. En effet, le domaine TUDOR contient cinq feuillets β antiparallèles qui forment le tonneau β caractéristique. H3K36me3 est logée dans une poche hydrophobe, formée par plusieurs résidus de la « cage aromatique » dans le domaine TUDOR. Ainsi, les mutants au niveau de ces résidus, notamment W50A, Y56A, et Y80A sont incapables de se lier au peptide H3K36me3 [BALLARÉ et al. 2012]. Enfin, tout comme PHF1 et PCL2, PCL3 se lie préférentiellement aux îlots CpG par son domaine EH [HUNKAPILLER et al. 2012].

Prises ensemble, ces études ont permis d'établir un modèle de recrutement du PRC2 à la chromatine dans lequel PCL3 et PRC2 coopèrent pour réprimer la transcription des gènes cibles. Dans ce modèle, le domaine TUDOR de PHF1 et hPCL3 fixe avec une très haute affinité la marque épigénétique activatrice H3K36me3 alors que le domaine PHD2 interagit avec le cœur de PRC2, permettant ainsi l'intrusion du PRC2 dans la chromatine active. Les PCL contiennent un domaine de liaison à l'ADN, EH qui renforce et stabilise la liaison du PRC2 à la chromatine au niveau des îlots CpG (séquence B de la figure 2.16). De plus, hPCL3 s'associe aussi à une déméthylase spécifique d'H3K36me3, NO66 permettant de lever son effet inhibiteur sur le dépôt de la

marque répressive H3K27me3 par EZH2 (séquence A de la figure 2.16) [BALLARÉ et al. 2012; CAI et al. 2013].

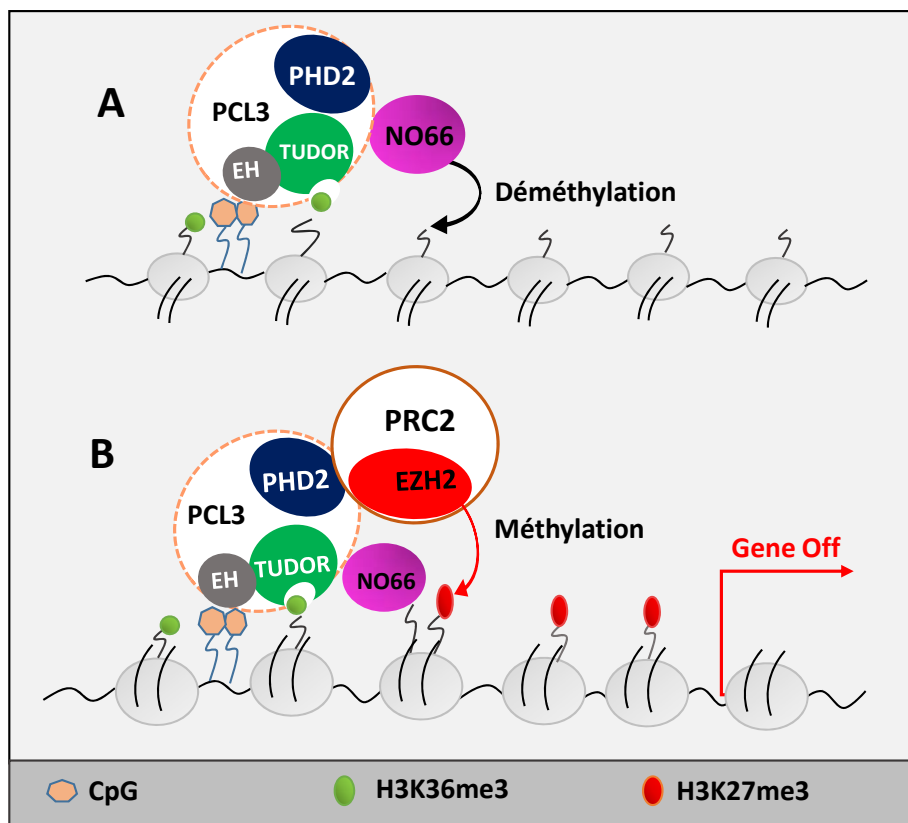


Figure 2.16 – Modèle de recrutement du PRC2 par PCL3 au niveau de la chromatine. (A) Polycomb-like hPCL3 se lie à H3K36me3 et permet le recrutement de la déméthylase NO66 qui catalyse la déméthylation d'H3K36me3. (B) Le domaine PHD2 de hPCL3 interagit avec EZH2 et permet l'intrusion du PRC2 dans la chromatine; ensuite EZH2 catalyse la triméthylation d'H3K27. Adapté de [ABED et al. 2018].

2.4.2.4.1 hPCL3L versus hPCL3S

(a) Mécanismes de polyadénylation alternative

La plupart des gènes humains expriment des isoformes de transcription distinctes grâce à des variations dans la régulation des processus de génération de l'ARN. L'utilisation des promoteurs, de sites d'épissage ou de polyadénylation alternatifs déterminent respectivement les limites des régions non traduites 5' et 3', et sont en grande

partie à l'origine des variations entre les isoformes [GRUBER et ZAVOLAN 2019].

La polyadénylation est l'étape de traitement de l'ARN qui achève la maturation des ARNm eucaryotes. Il s'agit d'un processus nucléaire en deux étapes qui implique un clivage endonucléolytique du pré-ARN en extrémité 3' au niveau d'un site de polyadénylation (poly (A)) défini par des motifs de séquences spécifiques (séquence canonique AAUAAA), puis par addition d'une queue de polyadénosine, ce qui est fondamental pour la stabilité de l'ARNm. L'utilisation de sites poly (A) alternatifs aboutit à plusieurs transcrits d'ARNm [GRUBER et ZAVOLAN 2019; CURINHA et al. 2014].

Comme la plupart des gènes humains ont plusieurs sites poly (A), le choix du site poly (A) utilisé et l'épissage alternatif permet à un seul gène de coder plusieurs isoformes différentes soit par leur séquence codante soit par leur 3'UTR.

La polyadénylation alternative (APA) est étroitement régulée par des facteurs agissant en cis et en trans et peut être divisée en deux classes majeures

- CR-APA (Coding Region-APA) dans le cas où les sites poly (A) alternatifs sont situés dans des introns/exons internes et, par conséquent, les événements APA peuvent affecter qualitativement l'expression des gènes en produisant différentes isoformes de protéines [DI GIAMMARTINO et al. 2011].
- UTR-APA dans le cas où les sites APA sont situés dans la région non traduite en 3' (3'UTR), ce qui donne des transcrits ayant des 3'UTR de longueur différente mais codant pour la même protéine et peut potentiellement affecter l'expression de manière quantitative. Les longueurs variables des régions 3' non traduites constituent une cible reconnaissable pour la régulation différentielle et affectent clairement le destin du transcrit, modulant finalement l'expression du gène [DI GIAMMARTINO et al. 2011].

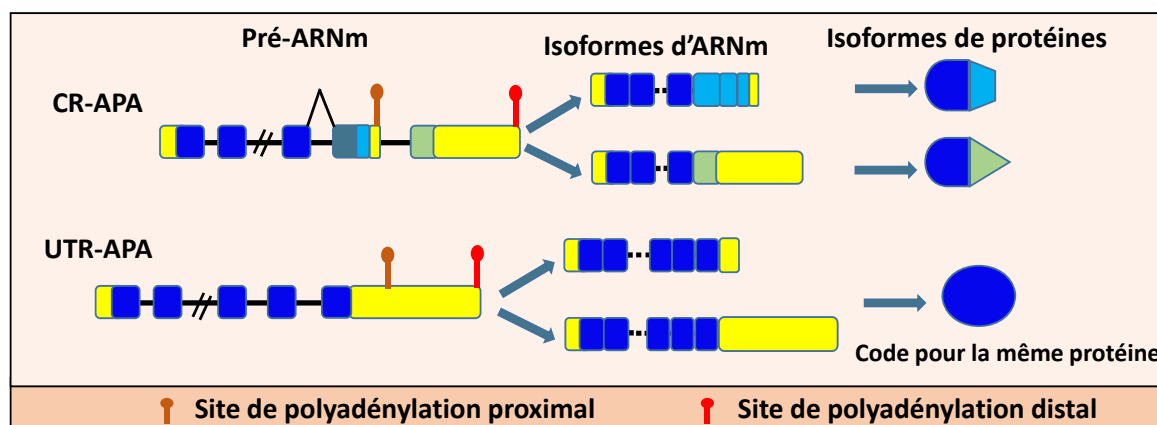


Figure 2.17 – Représentation schématique du CR-APA et UTR-APA.

Le CR-APA produit des isoformes d'ARNm avec des régions codantes C-terminales distinctes, produisant des isoformes de protéines distinctes. UTR-APA produit des isoformes d'ARNm distincts avec des longueurs 3'UTR différentes pouvant donc avoir des stabilités ou des mécanismes de régulation distincts tout en codant pour la même protéine.

Ces dernières années, plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la polyadénylation alternative dans l'expression des gènes et leur impact dans diverses conditions physiologiques, ainsi que pathologiques tels que le cancer [CURINHA et al. 2014]. Par exemple, une expression élevée de la cycline D1 est observée dans plusieurs cancers. Deux isoformes majeures, les cyclines D1a et b, sont créées par épissage et polyadénylation alternatifs. L'ARNm de CyclinD1a est complet, alors que l'ARNm de la cycline D1b est plus court. L'isoforme courte cycline D1b est trouvée surexprimée par le mécanisme UTR-APA dans le lymphome à cellules du manteau (MCL) et par CR-APA dans le cancer de la prostate [WIESTNER et al. 2007 ; COMSTOCK et al. 2009 ; DI GIAMMARTINO et al. 2011].

(b) Caractérisation de hPCL3L et hPCL3S

En raison des différents sites de polyadénylation et d'événements d'épissage alternatifs, le locus humain hPCL3/PHF19 code pour deux isoformes : une protéine de pleine longueur hPCL3L/PHF19L (580 AA), similaire à PCL de *Drosophila* et une isoforme courte, hPCL3S/PHF19S (207 AA) contenant uniquement le domaine TUDOR, le pre-

mier des deux domaines PHD, PHD1 et une région C-terminale spécifique (AA 155-207). La partie C-terminale n'est pas commune aux deux isoformes mais spécifique à l'isoforme courte hPCL3S. Elle est générée par une lecture de séquences introniques à cause de l'utilisation d'un site alternatif de polyadénylation intronique entre les exons 5 et 6 (Figure 2.18).

Le domaine PHD1, très divergent entre les trois protéines humaines de type Polycomb, pourrait être associé à des fonctions spécifiques pour chaque orthologue telle que la stabilisation de P53 dans le cas de PHF1, indépendamment du domaine TUDOR et de sa liaison à la chromatine [WANG et al. 2004a].

L'isoforme courte hPCL3S est trouvée chez l'homme et certains primates mais n'existe pas chez la souris.

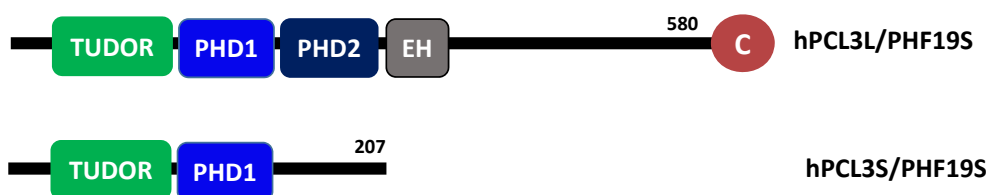


Figure 2.18 – Représentation schématique de la protéine hPCL3L de pleine longueur, hPCL3L et de l'isoforme courte hPCL3S

Les deux isoformes hPCL3L et hPCL3S interagissent avec EZH2, bien que l'isoforme hPCL3S interagisse moins bien avec EZH2 que la protéine de pleine longueur hPCL3L. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation semi-endogène avec les différents domaines de hPCL3 ont montré que hPCL3S n'a pas co-immunoprécipité SUZ12 en raison de l'absence du domaine PHD2 [BOULAY et al. 2010; BALLARÉ et al. 2012].

Les protéines hPCL3S et hPCL3L présentent des profils de localisation subcellulaires différentes. En surexpression dans les cellules U2OS, l'isoforme longue hPCL3L présente une localisation uniquement nucléaire alors que l'isoforme courte hPCL3S présente une localisation majoritairement nucléaire mais aussi cytoplasmique, ce qui suggère que la protéine hPCL3S a des fonctions différentes de celles de hPCL3L [BOULAY

et al. 2010].

Le moyen par lequel les deux isoformes hPCL3 stimulent l'activité d'EZH2 pourrait aussi impliquer des co-facteurs indispensables. A partir d'un crible double hybride, il a été mis en évidence l'interaction de la protéine hPCL3 avec la protéine suppresseur de tumeur HIC1. En effet, HIC1 interagit avec les deux isoformes de hPCL3 : hPCL3L et hPCL3S, ainsi qu'avec le paralogue PHF1. Cependant, le domaine commun TUDOR et le domaine PHD2 spécifique de hPCL3L sont tous les deux impliqués dans l'interaction avec HIC1. Cependant, bien que les deux isoformes hPCL3L et hPCL3S interagissent avec HIC1 et EZH2, seul hPCL3L favorise la formation d'un complexe ternaire avec les composants HIC1 et PRC2 [BOULAY et al. 2010].

2.4.2.4.2 Implication des protéines Polycomb-like, hPCL3 dans les cancers

Les protéines de type Polycomb-like sont apparues comme des co-facteurs essentiels pour réguler l'activité de transcription des complexes PRC2.1, mais sont également impliquées dans des mécanismes fondamentaux indépendants de la chromatine dont la dérégulation pourrait participer à la tumorigenèse. En effet, hPCL3 est trouvée surexprimée dans de nombreux cancers [WANG et al. 2004b].

Les deux isoformes hPCL3, en particulier l'isoforme courte hPCL3S, sont trouvées nettement surexprimées dans de nombreux types de cancers, notamment les cancers du côlon, de la peau, du poumon, du rectum, de l'utérus et du foie. Cette augmentation d'expression était en corrélation avec la progression tumorale. De plus, les ARNm de hPCL3S et hPCL3L ont été tous les deux augmentés considérablement dans la plupart des lignées cellulaires dérivées de divers stades de progression tumorale de mélanome et de gliome [WANG et al. 2004b].

Dans les fibroblastes du derme humains, le rôle de hPCL3 dans la régulation positive de la prolifération cellulaire a été lié à la régulation positive par E2F des gènes codant pour hPCL3 mais aussi hPCL2 alors que PHF1 est activé par P53 [BRIEN et BRACKEN 2015].

L'étude présentée dans [Xu et al. 2015] montre que le micro ARN, miR-195-5p, inhibe la croissance cellulaire du carcinome hépatocellulaire (HCC) en ciblant hPCL3L. Dans une autre étude récente, il a été démontré que hPCL3S est surexprimée dans le HCC et favorise la croissance et la migration cellulaire par l'activation de la voie β -caténine/IL-6. En effet, il a été démontré que hPCL3S stabilise la β -caténine par interaction directe et par l'inhibition de sa dégradation, augmentant ainsi l'expression du gène cible de la voie Wnt/ β -caténine, IL6 [CAI et al. 2018].

La protéine hPCL3 est surexprimée aussi dans le glioblastome (GBM) et accroît la prolifération, la migration et l'invasion des cellules du GBM par le biais de la voie β -caténine. En effet, hPCL3 régule la stabilité de la β -caténine via l'inhibition de la transcription de SIAH1 impliquée dans la dégradation de la β -caténine (figure 2.19) [DENG et al. 2018].

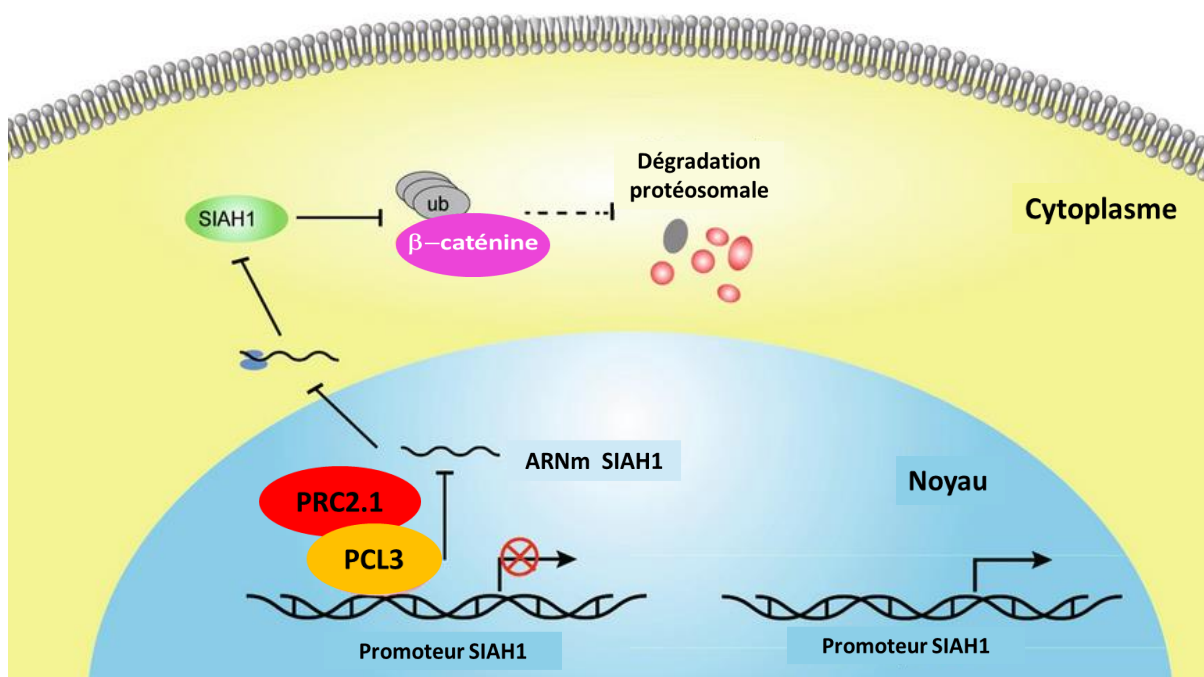


Figure 2.19 – Représentation schématique de l'axe hPCL3-SIAH1 et l'impact sur la régulation de la signalisation de la β -caténine.

Cette figure donne un aperçu sur la représentation schématique de l'axe hPCL3-SIAH1 et l'impact sur la régulation de la signalisation de la β -caténine. Adapté de [REN et al. 2019].

Enfin, hPCL3 agit également en tant que médiateur crucial de la tumorigenèse dans le myélome multiple (MM). En effet, la surexpression de hPCL3 favorise la croissance tumorale des lignées MM *in vitro* et *in vivo*. L'inactivation de hPCL3 dans les cellules MM conduit à une diminution globale de H3K27me3 ainsi qu'une réduction de la répression des gènes cibles PRC2, en raison d'une propagation altérée de H3K27me3 à partir des îlots CpG. En outre, l'analyse de la transcriptomique des cellules MM inactivées pour hPCL3 par « Konk-Down » a montré que l'inactivation de hPCL3 est corrélée positivement avec l'expression des gènes de progression du cycle cellulaire et la signalisation par les voies l'interféron et JAK-STAT [REN et al. 2019].

Cet effet de hPCL3 dans la tumorigenèse du MM repose sur sa fonction dans le recrutement de PRC2, en particulier les domaines de liaison à la chromatine et à l'ADN (TUDOR et EH, respectivement) [REN et al. 2019].

Ensemble, ces études indiquent que hPCL3L serait plutôt lié à la régulation épigénétique via la fixation d'H3K36me3 et le recrutement de PRC2, tandis que hPCL3S serait plus souvent lié à la régulation de voies de signalisation par le biais des interactions avec d'autres protéines impliquant ses domaines PHD.

2.4.3 Le recrutement séquentiel des complexes Polycomb

Des études ont démontré l'existence de recrutement séquentiel et réciproque entre PRC1 et PRC2. Le modèle du recrutement de PRC1 initié par PRC2 a dominé pendant longtemps le champs d'investigation des protéines PcG. Les composantes Cbx du PRC1 grâce à leur chromodomaine lient les marques H3K27me2/me3, produites par PRC2, permettant ainsi à PRC1 de catalyser la monoubiquitination d'H2K119. La perte de l'activité enzymatique d'EZH2 entraîne une diminution de liaison de PRC1 à l'ADN. Cette constatation a donné naissance au modèle hiérarchique classique du recrutement des PcGs.

Ce modèle stipule que la liaison initiale de PRC2 et la méthylation de H3K27 orientent le recrutement de PRC1, ce qui facilite la répression des gènes non-transcrits [KAHN

et al. 2016]. Ainsi, le recrutement du PRC1 a été considéré comme secondaire par rapport au recrutement de PRC2 à la chromatine (séquence A de la figure 2.20). Ce modèle concerne le sous-complexe PRC2.1 essentiel pour le dépôt d'H3K27me3 sur la majorité de ses gènes cibles via les protéines (Polycomb-Like) PCL (séquence A de la figure 2.20). Ces dernières ont la capacité de se lier aux régions CpG par le biais de leurs domaines de liaison à l'ADN [PERINO et al. 2018]. L'inactivation des PCL conduit à une réduction de la liaison à SUZ12 au niveau des îlots CpG et une forte diminution d'H3K27me3 [PERINO et al. 2018; REN et al. 2019]. De plus, la composante EPOP du PRC2.1 interagit également avec l'ADN au niveau des régions CpG [LAUGESSEN et al. 2019].

Cependant, seuls les complexes PRC1 canoniques contiennent une sous-unité Cbx, ce qui indique que seuls certains complexes PRC1 reposent sur ce mode de recrutement dépendant de PRC2; d'où l'effet relativement modéré sur les niveaux globaux d'H2AK119ub1 dans le cas de déplétion du PRC2. En effet, d'autres mécanismes de recrutement du PRC1 indépendants du dépôt d'H3K27me3 ont été mis en évidence [VIDAL et STAROWICZ 2017; MOUSSA et al. 2019].

Un autre modèle de recrutement de PRC2 initié par PRC1 a été rapporté. En effet, le dépôt d'H2AK119ub1 par PRC1 favorise le recrutement du PRC2.2 de manière dépendante d'un motif d'interaction à l'ubiquitine dans la partie N-terminale de la protéine accessoire JARID2. En effet, JARID2 fixe H2K119ub1 préalablement déposée par PRC1 et interagit avec PRC2 pour le recruter à la chromatine [LAUGESSEN et al. 2019]. In vitro, il a été démontré que JARID2 lie préférentiellement les nucléosomes avec H2AK119ub1 par rapport aux nucléosomes non-modifiés [COOPER et al. 2016] (séquence B de la figure 2.20).

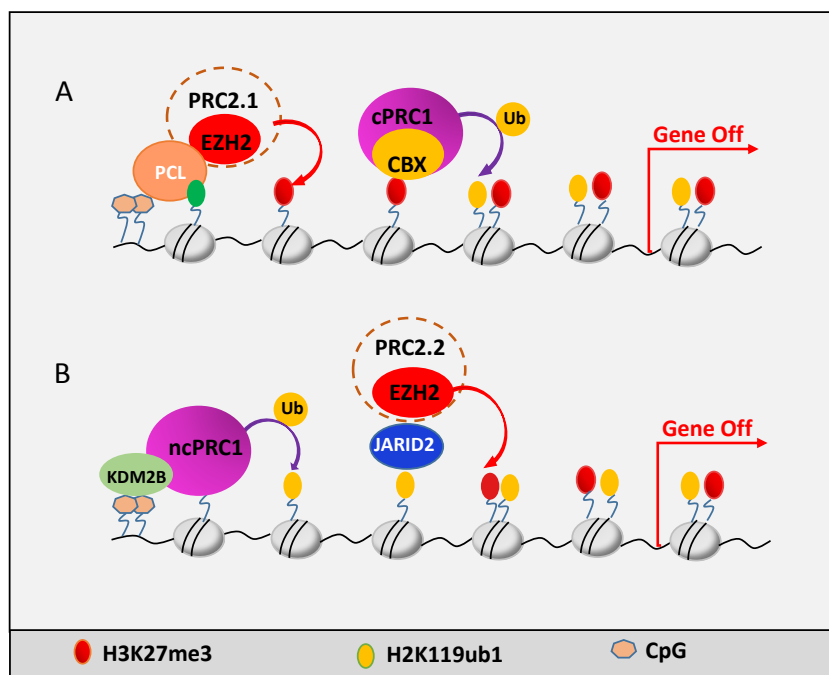


Figure 2.20 – Le recrutement séquentiel du PRC2 et PRC1

(A) le complexe PRC2.1 est recruté à la chromatine grâce à ses co-facteurs Polycomb-like (PCL) et dépose la marque épigénétique H3K27me3. Le complexe PRC1 canonique (cPRC1) fixe le produit catalytique du PRC2.1 (H3K27me3) et permet la mono-ubiquitination de H2AK119. (B) le complexe PRC1 non canonique (ncPRC1) est recruté à la chromatine par des co-facteurs, permettant le dépôt d'H2K119ub1. JARID2, fixe H2K119ub1 déposé par ncPRC1 et permet le recrutement du PRC2.2 au niveau de ses gènes cibles. Adapté de [MERINI et CALONJE 2015].

Prises ensemble, ces données indiquent que le modèle de recrutement PRC2 est déterminé en fonction de ses sous-unités facultatives. En effet, le complexe PCL-PRC2.2 permet un recrutement de novo du PRC2 indépendamment du PRC1, alors que le complexe JARID2-PRC2.2 lui est recruté suivant un modèle PRC1-dépendant.

Enfin, des études très récentes ont montré que les sous-complexes PRC2, PRC2.1 et PRC2.2 sont nécessaires pour la répression génique par le biais du PRC2 et fonctionnent de manière synergique pour le dépôt d'H3K27me3. Ainsi, la perte combinée de PRC2.1 et PRC2.2 est nécessaire pour supprimer complètement le dépôt d'H3K27me3 sur les gènes cibles du Polycomb, ce qui conduit à une mauvaise localisation de SUZ12 un des constituant du « cœur » de PRC2 dans l'ensemble du gé-

nome. Ces études montrent également, qu'une déplétion en PRC2.1 ou PRC2.2 seul ne provoque qu'une délocalisation du complexe PRC2 restant et une réduction partielle d'H3K27me3 au niveau des gènes cibles de PRC2 [LAUGENSEN et al. 2019; HEALY et al. 2019].

Deuxième partie

Résultats, discussion et perspectives

1

Résultats

Sommaire

1.1	Introduction	69
1.2	Publication	71

1.1 Introduction

Le but de ce travail de thèse a été d'étudier l'implication potentielle de l'isoforme courte hPCL3S codée par le gène Polycomb-like-3 dans la tumorigenèse prostatique. En effet, des analyse de RT-qPCR ont montré que dans une cohorte de 25 tumeurs prostatiques, hPCL3S était surexprimée dans 75% des cas. De plus, nous avons montré que hPCL3S était surexprimée dans les lignées de cancer de la prostate hormono-insensibles DU145 et PC3 mais pas dans la lignée hormono-sensible, LNCaP.

Dans le but d'étudier les conséquences fonctionnelles de la surexpression de l'isoforme courte de la protéine Polycomb-like hPCL3, hPCL3S, dans la tumorigènes prostatique, nous avons tout d'abord étudié par fractionnement cellulaire la localisation de la protéine hPCL3S endogène dans les cellules DU145 qui la surexpriment. Le lysat cellulaire des cellules est séparé en fraction cytoplasmique et nucléaire qui ont été ensuite analysées par immunoprécipitation suivie de Western Blot. Les résultats ont montré que la localisation de hPCL3S est majoritairement nucléaire mais aussi cytoplas-

mique, conformément à nos résultats préalables en transfection transitoire [BOULAY et al. 2010].

Nous avons ensuite mis en place des modèles d'inactivation par ARN interférence d'hPCL3S dans des cellules prostatiques DU145 qui la surexpriment et des modèles d'expression ectopique par transfection stable d'hPCL3S dans des cellules LNCaP qui ne la surexpriment pas. Ces deux modèles ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel d'hPCL3S dans la prolifération et la migration cellulaire en utilisant la technologie « Incucyte » qui permet de suivre en temps réel l'évolution d'une culture cellulaire.

Afin d'identifier les domaines fonctionnels impliqués dans cet effet, nous avons construit et analysé différents mutants ponctuels dans le domaine TUDOR ou dans le domaine PHD1. Ses résultats ont montré que la reconnaissance et la fixation de la marque épigénétique H3K36me3 par le domaine TUDOR n'était pas impliquée dans ces effets. Par contre, une mutation du domaine PHD1 abolit l'effet sur la croissance.

Nous avons remarqué que les clones stables de LNCaP obtenus quelque soit la version d'hPCL3S transfectée (WT ou mutante) présentaient un aspect morphologique différents des cellules LNCaP parentales. De plus, nous avons montré que les niveaux d'expression élevés d'AR et du PSA dans les cellules LNCaP parentales sont considérablement réduits dans les contrôles transfectés avec le vecteur vide et pratiquement indétectables dans les clones exprimant les différentes versions de hPCL3S. Cette population de cellules PSA^{-lo} exprime des niveaux élevés de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH1A1) ainsi qu'une faible expression de marqueurs neuroendocriniens tels que NSE et FAM184A. Ce qui évoque l'acquisition par ces cellules LNCaP surexprimant hPCL3S de certains caractères, présents dans les cellules PC3.

D'autre part, afin de définir des gènes cibles potentiels dont l'expression est dérégulée par la surexpression d'hPCL3S, des expériences de RNA-Seq (en collaboration avec le Dr G. Boulay dans le laboratoire de MN Rivera à la Harvard Medical School) ont été réalisées grâce aux clones stables générés par transfection de hPCL3S dans les cel-

lules cancéreuses LNCaP. Grâce à ces expériences de RNA-Seq, nous avons pu définir une liste de 240 gènes exprimés de manière différentielle dans les cellules hPCL3S-WT clone 12 par rapport aux cellules témoins (vecteur vide). Ainsi, hPCL3S pourrait favoriser la prolifération et la migration des cellules cancéreuses de la prostate par la régulation à la hausse de l'expression de gènes précédemment caractérisés tels que S100A16, PlexinA2 ou Spondin1, connus pour leur rôle important dans la prolifération et/ou la migration des cellules cancéreuses de la prostate.

1.2 Publication

Cette thèse a fait l'objet de la publication suivante qui a été soumise à Oncotarget le 19/09/2019 et qui est actuellement en révision favorable « Minor modifications » depuis le 26/10/2019 :

hPCL3S promotes proliferation and migration of androgen-independent prostate cancer cells.

Souhila ABDELFTTAH, Gaylor BOULAY¹, Marion DUBUISSEZ[£], Nathalie SPRUYT, Sara GARCIA¹, Shruthi RENGARAJAN¹, Ingrid LOISON, Xavier LEROY², Miguel N. RIVERA¹ and Dominique LEPRINCE*.

Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T - Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, F-59000 Lille. France

1- Department of Pathology, Center for Cancer Research, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School , Boston, Massachusetts 02114, USA.

2- Department of Pathology, Univ. Lille, CHU, F-59000 Lille, France.

Present Address: £ Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 Boulevard l'Assomption, Montreal, QC H1T 3W5, Canada.

*: To whom correspondence should be addressed. Tel: + 33 3 20 87 11 19

Fax: +33 3 20 87 11 11. Email: dominique.leprince@ibl.cnrs.fr

ABSTRACT

Polycomb repressive complex 2 (PRC2) allows the deposition of H3K27me3. PRC2 facultative subunits modulate its activity and recruitment such as hPCL3/PHF19, a human ortholog of *Drosophila* Polycomb-like protein (PCL). These proteins contain a TUDOR domain binding H3K36me3, two PHD domains and a "Winged-helix" domain involved in GC-rich DNA binding. The human PCL3 locus encodes the full-length hPCL3L protein and a shorter isoform, hPCL3S containing the TUDOR and PHD1 domains only.

In this study, we demonstrated by RT-qPCR analyses of 25 prostate tumors that hPCL3S is up-regulated in 75% of cases. In addition, hPCL3S is overexpressed in the androgen-independent DU145 and PC3 cells, but not in the androgen-dependent LNCaP cells. *hPCL3S* knockdown decreased the proliferation and migration of DU145 and PC3 whereas its forced expression into LNCaP increased these properties. A mutant hPCL3S unable to bind H3K36me3 (TUDOR-W50A) increased proliferation and migration of LNCaP similarly to wt hPCL3S whereas inactivation of its PHD1 domain decreased proliferation. These effects partially relied on the up-regulation of genes known to be important for the proliferation and/or migration of prostate cancer cells such as *S100A16*, *PlexinA2* and *Spondin1*.

Collectively, our results suggest hPCL3S as a new potential therapeutic target in castration resistant prostate cancers.

Keywords: hPCL3S, PHF19, PRC2, β -catenin, Prostate cancer.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the second most common type of cancer diagnosed worldwide and is still a leading cause of death despite recent research advances. The vast majority of PCa are classified as adenocarcinomas, a tumor type deriving from glandular cells of the prostate. Androgen and Androgen Receptor (AR) signaling are critical not only for the development and function of normal prostate but also for tumor development and are thus widely used as therapeutic targets. In a first time treatment with androgen depletion or AR blocking called androgen dependent therapy (ADT) are efficient. Unfortunately, however, most patients relapse and progress to androgen-independent more aggressive forms of prostate cancer termed castration-resistant prostate cancer (CRPC) with poor prognosis [1]. One of the mechanisms leading to this castration resistant disease is the manifestation of a neuroendocrine transdifferentiation (NE) following ADT and resulting in prostatic small cell neuroendocrine carcinomas (SCNC). These SCNC tumors cells fail to express PSA and AR but rather express neuroendocrine markers such as Neuron-specific Enolase (NES) or Chromogranin A (CgA) as well as stem-cell associated markers such as ALDH1A1 and CD44 [2].

Two of most commonly used prostate cancer cell lines LNCaP and PC3 are representative of prostatic adenocarcinoma and of Small Cell Neuroendocrine Carcinomas, respectively [3]. Neuroendocrine transdifferentiation of LNCaP cells can be achieved through the ectopic expression of component of the Wnt signaling pathway [4] [5] or activation of STAT3 [6].

The Polycomb repressive complex 2 (PRC2) is one of the two main multimeric complexes of Polycomb group of proteins (PcG), initially identified in *Drosophila*, which are crucial for development of multicellular organisms [7] [8]. PRC2 allows the deposition of the repressive epigenetic mark H3K27me3 by its catalytic subunit, *EZH2* [7] [9] [10]. Depending on the

cancer type, *EZH2* is either overexpressed (prostate) or subject to loss or gain of function mutations, leading to aberrant levels of H3K27me3 [11] [12] [13]. *In vitro*, a tetramer consisting of the "core" PRC2 subunits, *EZH2*, *SUZ12*, *EED* and *RBBP4* is sufficient to catalyze the trimethylation of H3K27. However, *in vivo*, several facultative subunits modulating the enzymatic activity of the PRC2 complex or participating in its recruitment and/or its stabilization at target loci have been identified [10] [14]. They assemble with the core PRC2 subunits in mostly mutually exclusive combinations giving thus rise to two distinct classes of complexes, PRC2.1 and PRC2.2. PRC2.2 complexes are characterized by the *AEBP2* and *JARID2* facultative subunits. PRC2.1 complexes contain either of the two proteins *EPOP* or *C10orf12* together with one of the three human orthologs, *PHF1*, *PCL2* and *hPCL3/PHF19* of the *Drosophila* Polycomb-like protein (*PCL*) [10] [14]. These proteins share a structured N-terminal domain consisting of a TUDOR domain, two PHD domains (Plant Homeo Domain) followed by a "Winged-helix" domain involved in GC-rich DNA binding and a C-terminal "reverse" Chromodomain (RC) (Figure 1A). This RC domain and a domain of *AEBP2* which are in competition for the binding to the core component *SUZ12* likely dictate the mutually exclusive association of *hPCL3/PHF19* and *AEBP2* in PRC2 complexes [15]. *hPCL3/PHF19* regulates Polycomb PRC2 recruitment since it allows intrusion of PRC2 complexes into actively transcribed chromatin regions through binding to the active H3K36me3 epigenetic mark via an "aromatic cage" constituted by amino acids W50, Y56, F74 and Y80 in its TUDOR domain [16] [17] [18] and to GC-rich sequences [19] [20] (for review [10]). In addition, through its association with the H3K36 demethylase *NOD66*, *hPCL3/PHF19* also favors the activation of *EZH2* and H3K27me3 deposition [17].

Owing to different polyadenylation sites and alternative splicing events, the human *hPCL3/PHF19* locus encodes two isoforms: a *hPCL3L/PHF19L* full-length protein (580 AA) and a short isoform, *hPCL3S/PHF19S* (207 AA) which contains only the TUDOR domain,

PHD1-the first of two PHD- domains and a specific C-terminal region (AA 155-207) generated by a read-through and the use of an alternative intronic polyadenylation site between exons 5 and 6 [21] [22] (Figure 1A). This PHD1 domain, which is very divergent between the three human Polycomb-like proteins, could be associated with specific functions for each orthologue, such as the stabilization of P53 in the case of PHF1 [23]. Indeed, PHF1 through its PHD1 domain is the only human Polycomb-like protein capable of inducing cell quiescence by interacting with P53 to stabilize it independently of its TUDOR domain and thus of its binding at chromatin [24].

In a recent study, *hPCL3S* has been shown to be up-regulated in hepatocarcinoma tumors (HCC) and cell lines and promoting their growth and migration through activation of the β -catenin/IL-6 pathway [25]. Indeed, *hPCL3S* has been shown to stabilize β -catenin through direct interaction and inhibition of components of its degradation complex, thereby increasing the expression of the Wnt/ β -catenin pathway target gene, *IL6* [25]. Unfortunately, however, the exact contribution of the TUDOR and PHD1 domains to these interactions has not been investigated. Thus, Polycomb-like proteins appear as essential co-factors to regulate the transcriptional activity of the PRC2.1 complexes but are also involved in fundamental chromatin-independent mechanisms, whose deregulation could participate in tumorigenesis.

In this study, we have quantified the expression levels of both *hPCL3* isoforms in primary prostate tumors as well as in the hormone-dependent LNCaP and hormone-independent DU145 and PC3 prostate cancer cell lines. RT-qPCR experiments on a cohort of 25 prostate tumors revealed that *hPCL3S* is overexpressed in 75% of cases. In addition, *hPCL3S* is overexpressed in the DU145 and PC3 hormone-insensitive cell lines, but not in the hormone-sensitive LNCaP cell line. Wound-healing and proliferation assays showed that siRNA-induced decrease of *hPCL3S* impaired the proliferation and migration properties of DU145

and PC3 cells. Conversely, the stable transfection of hPCL3S into LNCaP increased these properties. Stable transfection of wild-type hPCL3S or a TUDOR domain mutant (W50A) unable to bind H3K36me3 resulted in increased proliferation and migration of LNCaP whereas a PHD1 mutant decreased their proliferation. Collectively, our results provide insights into a new mechanism whereby AR-independent prostate cancer cell lines acquire heightened ability to proliferate and migrate and highlight *hPCL3S* targeting as a new potential interventional strategy against castration resistant prostate cancers.

RESULTS

hPCL3S is up-regulated in human primary prostate tumors

Samples of human primary prostate cancers (PCas) were assessed for *hPCL3S* and *hPCL3L* expression using RT-qPCR analyses on total isolated RNAs (Suppl. Table 1). First, we determined the expression levels of *hPCL3S* and *hPCL3L* in 5 pairs of prostate cancer tissues and matched adjacent non-cancerous tissues (Figure 2A-B and Suppl. Table 2). We found that in 3 cases out of 5, *hPCL3S* was expressed at higher levels than in the normal tissue (Figure 2A). However, the expression level of *hPCL3L* was not significantly higher in cancerous tissues than in normal tissue with the notable exception of one tumor with a pT3a TNM staging (Figure 2B).

In a second experiment, we analyzed a larger cohort of 20 prostate cancers including several aggressive tumors characterized by a high Gleason grading (from 7 to 9) and TNM staging (pT3a and pT3b) (Suppl. Table 1). Their *hPCL3S* and *hPCL3L* expression levels were determined using RT-qPCR analyses on total RNAs by comparison with total commercial RNAs prepared from the normal prostate of a young (24-years old) healthy donor (BioChain).

The results showed that in 14 out of 20 samples the fold change of *hPCL3S* expression in the tumor tissue was above 1.5 relative to the normal prostate. Interestingly, the highest expression of *hPCL3S* was observed in some of the most advanced tumors, pT3a and pT3b according to the TNM classification for prostate cancer (Figure 2C and Suppl. Table 1). By contrast, the expression levels of *hPCL3L* remained highly homogenous (Figure 2C). As a further control, we analyzed the expression of *EZH2*. The data showed that *EZH2* was up-regulated in all tumors (Figure 2C). All, these results are summarized using Tukey's box-and-whisker plot (Figure 2D).

Thus, whereas *hPCL3L* expression levels do not show salient differences, *hPCL3S* is up-regulated in prostate tumors.

hPCL3S is overexpressed in androgeno-independent prostate cell lines.

hPCL3S is overexpressed in many cell lines [21] [22]. However, *hPCL3S* mRNAs levels in various types of transformed prostate cell lines have not been investigated in detail. Therefore, we measured the mRNA expression levels of *hPCL3S*, *hPCL3L* and *EZH2* in three transformed prostate cell lines; the androgeno-independent PC3 and DU145 and in the androgeno-dependent LNCaP in comparison with primary prostate epithelial cells PrEC and a non-tumorigenic prostate epithelial cell line, RWPE-1.

RT-qPCR analyses revealed that *hPCL3S* was strongly up-regulated in the two androgeno-independent cell lines and notably in the DU145 cell line as compared to PrEC whereas its expression level was very low in the androgeno-dependent LNCaP cell line. By contrast, *hPCL3L* was up-regulated in the immortalized RWPE-1 cells and in the two androgeno-independent cell lines, similarly to *EZH2* (Figure 3A).

Previously, we demonstrated through transient transfection assays in HEK293T followed by immunofluorescence or cell fractionation experiments that FLAG-hPCL3L is almost exclusively found in the nuclear fraction [22], in accordance with its function as a Polycomb PRC2.1 cofactor [10]. By contrast, FLAG-hPCL3S was detected both in the nuclear and cytoplasmic fraction with a majority in the cytoplasm [22]. Cell fractionation experiments in DU145 cells confirmed that the endogenous hPCL3S proteins also displayed a mixed cytoplasmic and nuclear localization (Figure 3B).

In conclusion, *hPCL3S* is overexpressed in the androgeno-dependent DU145 and PC3 cell lines but not in the androgeno-independent LNCaP cell line which is characteristic of prostate adenocarcinomas. Therefore, we selected these cell lines to investigate the biological role of *hPCL3S* through siRNA-mediated knockdown and ectopic overexpression experiments.

hPCL3S knockdown decreased cell growth and migration of the human androgeno-dependent prostate cancer cell lines, DU145 and PC3.

To explore the roles of *hPCL3S* in DU145 and PC3 cells, we silenced it through siRNA interference. Since available commercial *hPCL3/PFH19* siRNAs targeted both isoforms, we designed 3 siRNAs targeting the specific C-terminal part of *hPCL3S*. We verified by RT-qPCR and Western blot analyses that they efficiently inhibited *hPCL3S* expression (Figures 4A and 4B) with a relative lack of effect on *hPCL3L* (Figure S1A and data not shown).

Using these specific siRNAs, we investigated the effects of *hPCL3S* knockdown on the growth and migration of DU145 and PC3 cells using the Incucyte Live-Cell Imaging System. The cell proliferation curves as measured by the kinetics of cell confluence over a 96 hours time-course clearly indicated that *hPCL3S* knockdown dramatically decreased the proliferation of DU145 and PC3 cells (Figures 4C and 4D). A similar cell growth inhibition

effect is observed in DU145 and PC3 cells transfected by a siRNA targeting *EZH2*, the histone methyltransferase of the PRC2 complexes which is up-regulated in prostate cancers.

Follow-up experiments showed that *hPCL3S* knockdown caused a severely impaired colony formation of DU145 cells in anchorage-independent growth conditions (Figure S1B).

We, then, examined if *hPCL3S* knockdown could inhibit the migration properties of DU145 and PC3 cells. In a preliminary experiment, we performed wound-healing assays using DU145 cells. These experiments showed that, after 24 hours (a time window excluding the effects on cell growth upon *hPCL3S* loss), the wound closure was delayed in the absence of *hPCL3S* (Supplementary Figure 1C-D). In order to accurately measure these effects, we used the Incucyte scratch wound system allowing us to follow cell migration in real time over a longer time period. Therefore, 24h after siRNAs transfection, DU145 and PC3 cells were treated with low dose Mytomicin C (10µg/ml) for 1 hour to inhibit their proliferation before wound scratch and monitoring of cell migration for 60 hours. These experiments clearly demonstrated that DU145 cell migration properties were severely impaired upon *hPCL3S* knockdown (Figure 4E). The effects of the *hPCL3S* siRNAs on PC3 migration was less clear probably because in that case the wound closure occurred very rapidly (Figure 4F). Taken together, these results suggest that *hPCL3S* plays an important role in the regulation of cell growth and migration of DU145 and PC3 cells that overexpress this variant.

Transfection of LNCaP with p-AM-TAg expression vectors selected a PSA^{-lo}, AR⁻ and ALDH1A1⁺ cell population.

Overexpression of *hPCL3S* in LNCaP was achieved using the p-AM-Tag expression vector which appends the AM-tag sequences to the C-terminal part of the protein and allows

puromycine selection of stable clones either with increased expression of *hPCL3S* or transfected with the empty vector as control (Figure 1B). Strikingly, we noticed that whereas our parental LNCaP cultures displayed two types of cells with clearly distinct morphologies, all the clones emerging from our transfection with Lipofectamine followed by puromycine selection were highly homogenous with a population of small highly refringent epithelial-like cells (Figure 5A). This holds true for cells transfected with the empty vector (CaP-pAM) as well as cells transfected with wt *hPCL3S* or with the majority of the different *hPCL3S* mutants analyzed in this study (see below). LNCaP cultures are known to be highly heterogeneous and to contain cells with high levels of AR and PSA together with cells expressing low levels of both AR and PSA. These PSA^{-lo} cells have a high clonogenic capacity [26] [27].

RT-qPCR analyses demonstrated that the high expression levels of PSA and AR in our bulk LNCaP cultures are dramatically reduced in the controls transfected with the empty vector and virtually undetectable in the clones expressing the various versions of *hPCL3S* (Figure 5B). This PSA^{-lo} population is characterized by high Aldehyde Dehydrogenase activity [26]. RT-qPCR analyses demonstrated that in contrast with the parental LNCaP cells all the selected clones obtained either with the empty vector or with the various *hPCL3S* variants used in these studies all expressed *ALDH1A1*, which is considered as a stem cell marker [28] (Figure 5C).

In conclusion, the protocol (Lipofectamine transfection followed by Puromycine selection) that we have used to obtain stable clones, mainly sustained the growth of PSA^{-lo}, AR⁻ and ALDH1A1⁺ cells.

Overexpression of hPCL3S increases proliferation and migration of LNCaP cells.

We, next, wanted to determine more precisely the effects due to the overexpression of wt hPCL3S and of its various mutants. Then, as a first step, we studied some randomly picked individual clones overexpressing wt hPCL3S-AMTag. RT-qPCR analyses after clone selection indicated that LNCaP-hPCL3S-cln(clone) 12 and -cln 17 had approximately 30 and 8 fold more *hPCL3S* respectively relative to LNCaP or to a pool of empty vector-transfected LNCaP cells (Figure 6A). Immunofluorescence analyses of hPCL3S-cln 12 detected the hPCL3S-AMTag fusion protein which also displayed a mixed nuclear and cytoplasmic localization (Figure 6B), as shown by cell fractionation experiments for the endogenous hPCL3S proteins in DU145 (Figure 3B) [22] .

Then, the proliferation and migration properties of these clones were analyzed using the Incucyte Live-Cell Imaging System. First, the proliferation curves demonstrated that *hPCL3S* overexpression in two independent clones increased the proliferation potential of LNCaP cells as compared to the empty vector control (Figure 6C). These results were independently confirmed using the anchorage-independent growth assay (Supplementary Figure 2A-B and Figure 6D).

Similarly, the results obtained in the migration assay with the Incucyte Scratch wound system clearly showed an increase in migration for the *hPCL3S* overexpressing clone 12 (Figure 6E).

Thus, ectopic overexpression of *hPCL3S* in LNCaP cells increased their proliferation, anchorage-independent and migration properties. Interestingly, these phenotypic changes were correlated with hPCL3S levels in these subclonal populations (Figure 6, compare clone 12 high-hPCL3S- and clone 17 low-hPCL3S).

The hPCL3S specific C-terminal end generated by intronic alternative polyadenylation (CR-APA) did not significantly contribute to the increase of proliferation and migration.

hPCL3S is generated through the usage of an internal alternative intronic polyadenylation site [21]. This mechanism known as CR-APA (Coding Region Alternative PolyAdenylation) produces different protein isoforms endowed with different properties [29] [30]. Indeed, the C-terminal moiety of hPCL3L which contains several important and well characterized functional domains (the PHD2, the “Winged-helix” (EH) and the “RC” SUZ-12 binding domain) (Figure 1A) is lost in hPCL3S where it is replaced by a short (AA 155-207) specific C-terminal end of unknown function [21]. However, analyses of two stable clones of LNCaP cells transfected with a C-terminal deletion mutant (Δ 155-207), hPCL3S- Δ C-term, failed to demonstrate any global salient differences as compared to the wild-type *hPCL3S* isoform in terms of proliferation, clonogenicity and cell migration properties (Figure 7A-D).

Thus, the specific C-terminal end created by the CR-APA mechanism is not clearly involved in the regulation of proliferation and migration by *hPCL3S*.

Proliferation and migration effects are independent of the H3K36me3 binding activity of the hPCL3 TUDOR domain.

The TUDOR domain responsible for the binding to H3K36me3 is the major functional domain found both in the full-length hPCL3L protein and in the shorter hPCL3S isoform.

The residue W50 in the TUDOR domain is essential for the binding of PCL3/PFH19 to H3K36me3 and the genome-wide deposition of H3K27me3 by PRC2 [16] [17] [18, 31].

We therefore generated the hPCL3S W50A point mutant construct selectively inhibiting this essential function of the TUDOR domain, obtained stable transfected clones in LNCaP cells and analyzed their properties with the Incucyte system, as described above. Strikingly, this mutant predicted to be unable to bind to H3K36me3 maintained proliferation, anchorage-independent growth and migration properties similar to hPCL3S wt on LNCaP cells (Figure 8).

As a whole, these results strongly suggested that the proliferative and migration effects mediated by *hPCL3S* overexpression are not due to the perturbation of H3K36me3 binding by hPCL3L through a dominant-negative mechanism resulting in a genome-wide deregulation of H3K27 methylation by Polycomb PRC2.1 complexes.

The hPCL3 PHD1 is implicated in the increase of proliferation and migration.

The other functional domain conserved in hPCL3S is the first of the two PHD (Plant Homeo Domain), PHD1 (Figure 1A). In contrast with the PHD2 domain which is well conserved and involved in interaction with PRC2 components [22], PHD1 is not conserved and seems to be implicated in ortholog-specific interactions, as shown for the interaction of PHF1 with P53 [23]. To address the function of the hPCL3S PHD1 domain, we generated a mutant construct targeting Cysteine 3 in the PHD structure as well as an adjacent highly conserved region of hydrophobicity identified by sequence alignments of various PHD domains [32] [33] (Figure 1B). This mutant (E¹¹²ILIC¹¹⁶ to AQQQA) is located in an essential β strand involved in the interaction of PHD domains with several partners. Indeed, a similar QQQA mutant abolished the interaction between *Drosophila* PCL and EZH2 [34]. It contains also a residue (I¹¹⁵ in PCL3/PHF19 and PCL2 replaced specifically by a Serine in PHF1) essential for the interaction between PHF1 and P53 [23]. Finally, a point mutation of the conserved acidic

residue (equivalent to hPCL3S E¹¹²) in the PHD domain of CBP abolishing its Histone acetyl transferase activity has been identified in the Rubinstein-Taybi syndrome [35]. Two stably transfected clones of LNCaP cells expressing this PHD1-Mut-hPCL3S construct proliferated significantly at a lower rate than LNCaP cells overexpressing hPCL3S (cln12), as shown by Incucyte analyses (Figure 9B). In clonogenicity assays, these two PHD1-Mut-hPCL3S constructs gave rise to a lower number of colonies than the pool of empty vector transfected cells (Figure 9C). Interestingly, these PHD1 mutations did not significantly impair the migration potential of stably transfected LNCaP cells (Figure 9D).

Thus, the hPCL3S PHD1 domain seems involved in the proliferative effects but not in the cell migration increases induced by *hPCL3S* overexpression.

hPCL3S did not significantly regulate the Wnt/ β -catenin pathway in prostate cancer cell lines.

In a recent study, *hPCL3S* has been shown to be up-regulated in hepatocarcinoma tumors (HCC) and cell lines and to promote their growth and migration through activation of the β -catenin/IL-6 pathway [25]. Indeed, hPCL3S has been proposed to stabilize β -catenin through direct interaction and inhibition of components of its degradation complex, thereby increasing the expression of the Wnt/ β -catenin pathway target gene, *IL6* [25].

Using our three siRNAs efficiently targeting *hPCL3S*, we did not observe a consistent impact on *IL6* expression in DU145 cells (Figures 10A and 10B). We next examined the β -catenin protein levels by Western blot analyses of the same cell lysates. Strikingly, we failed to detect any significant decrease of β -catenin expression after knockdown of *hPCL3S* in these cells (Figure 10C). Furthermore, we were unable to detect a significant interaction between

hPCL3S and the E3 ligase for β -catenin, β -TrCP using transient transfection assays in HEK293T cells (data not shown).

Thus, whereas *hPCL3S* seemed to be somehow implicated in the regulation of *IL6* expression, the mechanism is independent of the activation of the Wnt/ β -catenin pathway in prostate cancer cells and might thus involve another cell-specific signaling pathway.

Effects of hPCL3S overexpression in LNCaP and validation of differentially expressed genes.

In an attempt to decipher the molecular mechanisms by which *hPCL3S* overexpression promotes cell growth and proliferation, we performed RNA-Seq analyses in a pool of stable clones obtained after transfection of LNCaP cells by the empty p-AM vector used as controls and in a clone of LNCaP overexpressing *hPCL3S*, LNCaP-hPCL3S cln12 cells (Figure 11A). We then defined a list of 240 statistically significant differentially expressed genes in the LNCaP clone 12 overexpressing *hPCL3S* as compared to control (empty vector) cells (1.5 fold changes and adjusted p value < 0.05). Among them, 84 genes were up-regulated and 156 genes down regulated (Supplementary Table 3). Functional enrichment analyses on the global RNA-Seq data performed using the DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) database identified Polymorphism, Alternative splicing, Phosphoprotein and Membrane as the four more enriched pathways with 224, 211, 180 and 158 genes identified respectively (Figures 11B and 11C).

The most down-regulated gene was *FAM184A* (family with sequence similarity 184 member A), a gene broadly expressed among various human tissues including prostate but with no known function. Interestingly, *FAM184A* has been found in a list of 88 pan-NET genes which are up-regulated in Neuroendocrine tumors (NETs) versus non-NETs in three different cancer

types; prostate, lung and nervous system cancer [36]. Neuroendocrine tumors are a highly aggressive variant of prostate cancer often emerging during progression of the disease, notably at the castration resistant stage [2]. Validation by RT-qPCR analyses demonstrated that whereas it is not expressed in the parental LNCaP bulk cell population, *FAM184A* is highly up-regulated in the clones obtained after transfection with the empty expression vector (Figure 12A). A similar “spontaneous” neuroendocrine transdifferentiation of LNCaP has been described in a study addressing the role of the Wnt activator FOXB2 after stable transfection in LNCaP of a control empty pcDNA3 vector followed by G418 selection [5]. In close agreement with the RNA-Seq data, overexpression of *hPCL3S* in LNCaP clone 12 strongly repressed the expression of *FAM184A* and even to a very low level as compared to non-transfected LNCaP cells (Figure 12A). Similarly, when we analyzed the expression of neuron-specific enolase (NSE), a classical marker of neuroendocrine tumors, the strong up-regulation observed in empty vector transfected cells as compared to LNCaP (10x fold) is reduced to a 4x fold up-regulation in cells overexpressing *hPCL3S* (Figure 12A). These results further confirmed the major differences between the bulk LNCaP cells and the cell populations obtained after transfection and selection (Figure 5). In addition, the neuroendocrine transdifferentiation process induced in LNCaP transfected with the p-AM empty vector is counterbalanced by the overexpression of *hPCL3S*.

We next selected genes which have been previously implicated in prostate cancers and analyzed their expression by RT-qPCR analyses. Among them, we focused on three genes which appeared to be up-regulated in the RNA-Seq analyses: *S100A16*, a member of the S100 calcium-binding protein family up-regulated in many cancers [37] and promoting cell migration and metastasis in prostate cancer [38]; *Spondin-1* (SPON1), a protein of the extracellular matrix which is up-regulated in an orthotopic model in mice of PC3-derived tumors that frequently metastasized [39] and *PlexinA2* (PLXNA2), a semaphorin receptor up-

regulated by the TRMPSS2-ERG fusion in metastatic cancers [40]. RT-qPCR analyses validated them as potential target genes up-regulated by ectopic expression of *hPCL3S* in LNCaP clone 12 cells (Figure 12B).

Collectively, our results strongly suggest that *hPCL3S* could promote proliferation and migration of prostate cancer cells through the up-regulation of previously characterized genes such as *S100A16*, *PlexinA2* or *Spondin1* which are known to be important for the proliferation and/or migration of prostate cancer cells.

DISCUSSION

Prostate cancer is a complex multifactorial disease caused by a series of genetic and epigenetic alterations. Despite significant recent progress, prostate cancer remains a leading cause of cancer-related death due to the inescapable occurrence of resistance during conventional androgen deprivation therapy (ADT), mostly through neuroendocrine transdifferentiation, ultimately resulting in metastatic castration resistant tumors. These mechanisms are still poorly understood and hence an intense area of study.

In this study, we identified *hPCL3S* as a new candidate overexpressed in primary human prostate tumors and interestingly in hormone-independent (DU145 and PC3) but not in hormone-dependent (LNCap) cell lines. Our results suggest that *hPCL3S* over expression can endow cells with two properties essential for prostate cancer progression, namely increased growth and increased mobility. These effects are independent of the well-conserved H3K36me3-binding TUDOR domain but rather rely on the PHD1 domain which displays great variation among the three human Polycomb-like homologs [23].

In their seminal paper characterizing the human *PCL3/PHF19* locus, Wang et al. identified the full-length protein hPCL3L highly homologous to the PHF1 and PCL2 orthologues as well as a specific shorter isoform called hPCL3S [21]. This isoform is generated through alternative polyadenylation (APA), a widespread and major mechanism allowing a single gene to encode multiple RNA transcripts and affecting gene expression qualitatively and/or quantitatively. Indeed, when the alternative polyadenylation site is located in internal introns/exons, this mechanism known as CR-APA (coding-region-APA) can give rise to different protein isoforms with different C-terminal ends whereas the same protein is produced but from differentially regulated mRNAs if the alternative polyadenylation site is found in the 3'untranslated region (UR-APA) [41] [29]. These APA mechanisms can

contribute to several human diseases and cancer, as recently shown by the widespread inactivation of tumor suppressor genes through CR-APA in leukemia [42].

This CR-APA mechanism produces different protein isoforms endowed with different properties such as the membrane-bound or secreted forms of Immunoglobulin M heavy chain or the cancer-specific Cyclin D1b isoform which is constitutively nuclear and devoid of regulatory motifs as well as of an essential regulatory phosphorylation site found in the C-terminus of Cyclin D1 [43]. In hPCL3S, the C-terminal three-quarters of hPCL3L (AA 155-580) are replaced by a short specific C-terminal end (AA 155-207) (Figure 1A) which is found conserved by BLAST analyses only in 6 primate species (data not shown) and which appears not to be required for the acquired growth and mobility increases upon hPCL3S overexpression (Figure 7). Thus, the major functional difference between hPCL3S and hPCL3L is the loss of several domains involved in the interaction with core PRC2 components to generate the PRC2.1 subtype, namely the PHD2 domain and the Reverse Chromodomain [22] [15] as well as in its recruitment to chromatin through the “Winged-Helix” EH domain [19] [20] while keeping the well characterized H3K36me3-binding TUDOR domain [17] [16] [18] (Figure 1). Therefore, one plausible hypothesis about the effects of hPCL3S overexpression on LNCaP cells was that this CR-APA mechanism generated a heavily truncated protein with a dominant-negative activity on the genome-wide deposition of H3K27me3 by PRC2.1 repressive complexes. However, our results strongly argue against this model. We have introduced in hPCL3S a W50A TUDOR point mutation which in the context of the full-length PFH19/hPCL3L protein inhibits H3K27me3 deposition in ES cells knocked-down for wild-type PHF19 [17] [16] [18]. Nevertheless, ectopic expression of this W50A hPCL3S mutant in LNCaP cells was able to increase their growth and mobility as efficiently as wild-type hPCL3S (Figure 8).

Our results rather sustain an alternative hypothesis which highlights the important role played by the PHD1 domain since a PHD1-mutated construct has lost its properties to increase proliferation and anchorage-independent growth but strikingly not to increase migration. The PHD1 domain is highly divergent between the three human PCL orthologs and even in the phylogeny of PCL3 proteins, strongly suggesting that this domain could be involved in ortholog-specific function. Our mutated construct target a β -strand involved in many aspects of PHD domain function including interaction of PCL with EZH2 [34] and stabilization of P53 by PHF1 [23]. However, the PHD domain is a protein-protein interaction domain as well as an epigenetic reader of histone marks predicted to adopt a cross-brace topology with 8 cysteine coordinating 2 zinc atoms and creating two interacting loops [44] [33]. This structure suggests that PHD domains could interact with two different ligands at the same time [44]. In that case, our construct could have only partially inactivated the hPCL3 PHD1 domain.

The two hPCL3 isoforms and particularly the short isoform hPCL3S are markedly and widely up-regulated in many types of cancers including colon, skin, lung, rectal, cervical, uterus and liver cancers, as shown by dot blot analyses of matched normal and tumors tissues from 19 different types as well as in melanoma and glioma cells lines [21].

Recent follow-up studies have finely deciphered the mechanisms implicating hPCL3L/PHF9L and hPCL3S in several cancer types including glioblastomas [45], hepatocellular carcinomas [25], multiple myelomas [46] and prostate (this study). Despite the low number of studies, a clear-cut situation seems to emerge with two different mechanisms for hPCL3L/PHF19 and hPCL3S. Indeed, in close agreement with its function as a PRC2 facultative subunit [10] [14], PHF19/hPCL3L amplification is correlated with the activation of PRC2 and thus increased H3K27me deposition whereas hPCL3S is clearly involved in PRC2-independent mechanisms. In gliomas, Deng and al. reported that PHF19 is up-regulated and promotes the proliferation and migration of glioblastoma cell lines through direct repression of the promoter of *SIAH*

(seven in absentia homolog 1), an E3-ubiquitin ligase of β -catenin and thus activation of the Wnt/ β -catenin pathway [45]. However, the potential contribution of hPCL3S/PHF19S which is known to be expressed concomitantly with hPCL3L in several glioblastomas cell lines [21] has not been carefully investigated [45]. In a recent study, PHF19L has been clearly identified as a crucial mediator of oncogenesis in multiple myeloma through activation of PRC2 [46]. Several functional assays demonstrated that mechanistically this effect is independent of the small isoform but rely on the interaction of PHF19L with PRC2 components to facilitate the formation of broad H3K27me3-containing genomic domains, possibly through promotion of initial recruitment of PRC2 and subsequent spreading of H3K27me3 [46].

Regarding the short isoform of hPCL3/PHF19, *hPCL3S*, it has been shown to be up-regulated in hepatocellular carcinomas (HCC) clinical samples and to promote the growth and migration of HCC *in vitro* as well as their metastasis *in vivo* using mouse xenografts models. At the mechanistic level, these effects are totally independent of the PRC2 complexes but rely on the activation of the Wnt/ β catenin pathway [25]. Indeed, the cytoplasmic hPCL3S isoform has no significant effect on β catenin mRNA transcription but rather interacts directly with cytoplasmic components of the β catenin destruction complex, notably β Trp, the E3-ligase for β catenin. Unfortunately, these authors did not characterize the hPCL3S domain(s) involved in these interactions. Thus, hPCL3S overexpression inhibits the degradation of β catenin, thereby activating transcription of Wnt/ β catenin target genes such as *IL6* which is a well-characterized driver of HCC [25].

Our study showed several strong similarities with the published study on HCC [25]. Indeed, we demonstrated that *hPCL3S* positively regulated the proliferation and migration properties of DU145 and PC3 cells and that these effects are also independent of PRC2 activity as shown by the TUDOR W50A point mutant abolishing H3K36me3 which behaves as wild-

type hPCL3S. However, we did not detect any significant variation in β catenin levels upon knock-down of hPCL3S in DU145 cells (Figure 10C) nor interaction with β catenin or the E3-ligase β Trp (data not shown). This apparent discrepancy would suggest that the effects on cell growth and mobility mediated by hPCL3S could rely on the activation of several different cell-specific pathways. Given these results, it would be interesting to identify proteins specifically interacting with the hPCL3 PHD1 domain through affinity purification and mass spectrometry analyses using our LNCaP hPCL3wt stable clones.

The acquisition of resistance to AR-targeted therapy, mainly through neuroendocrine transdifferentiation is a major clinical problem for prostate cancer since it is associated with poor prognosis. Whereas LNCaP cells which express AR and PSA are similar to prostate adenocarcinomas responsive to AR-depletion therapy, PC3 cells which do not express AR nor PSA but some neuroendocrine markers (NE) are characteristic of prostatic small cell neuroendocrine carcinomas (SCNC) which are aggressive tumors not responding to hormonal therapy [3]. These two cell lines could thus be viewed as models for the neuroendocrine transdifferentiation during tumor progression in prostate cancer [2]. A key finding of our study is that *hPCL3S* is found overexpressed in hormone-independent (DU145 and PC3) but not in the hormone-dependent cell line, LNCaP. Strikingly, stable transfection of hPCL3S results in the emergence of stable clones of LNCaP cells which have acquired some characteristics of the PC3 SCNC cell line, namely a stronger proliferation and migration potential together with the loss of AR and PSA expression as well as low expression of neuroendocrine markers such as NSE and FAM184A.

In conclusion, we demonstrated that overexpression of *hPCL3S* promoted proliferation, anchorage-independent growth and migration in human LNCaP prostate cancer cells whereas silencing of endogenous *hPCL3S* in DU145 and PC3 prostate cancer cells impaired these

effects. Furthermore, our results suggested that hPCL3S did not act through the perturbation of PRC2 activity but rather mainly through chromatin-independent effects relying on its PHD1 domain. Therefore, our studies could have identified the overexpression of hPCL3S as a new alteration contributing to tumor progression in prostate cancer through the emergence of a rapidly growing cell population of neuroendocrine-like cells.

MATERIAL AND METHODS

Patient information and tissue selection

All PCa patients included in this study had undergone radical prostatectomy in the Lille University Hospitals. Clinical data and patient consent were provided by the referring physician (Supplementary Table 1).. Total RNAs used in RT-qPCR analyses were extracted from frozen tissues corresponding to matched healthy prostate and neoplastic tissue obtained from 5 patients and to primary tumors obtained from 20 other patients (age ranging from 51 to 73 years; Gleason score ranging from 6 to 9; see Supplementary Table 1 for details) as previously described [47]. These tissues were obtained from the urological collection of the local tumor tissue bank (Tumorotheque C2RC, CHU LILLE, France) after approval by the internal review board (CSTMT 225).

As control, total prostate RNAs from a 24-year donor were obtained from Biochain.

Cell lines and cell culture

The human prostate cancer cell lines PC3, DU145 and LNCaP cells purchased from ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were a kind gift of Dr. Martine Duterque-Coquillaud (CNRS UMR 8161). They were maintained in Dulbecco modified Eagle medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum, non-essential amino acids and gentamycin. Cells were cultured at 37°C in humidified 5% CO² atmosphere as previously described [40].

Small Interfering RNAs

Three siRNAs specific for hPCL3S were designed: sihPCL3S-spe1 GCTCCAAGCAGAAGGGCCA; sihPCL3S-spe2 TGGAGACAGATAGCGCCTCT and sihPCL3S-spe3 GGTTTGGTGTCTG GGAATAACGG.

DU145 or PC3 cells were reverse-transfected with Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to manufacturer's instructions using 10 nM small interfering RNA targeting *hPCL3S* or a scrambled control sequence (si Ctrl; siGENOME RISC free control siRNA, Dharmacon) [48] [49].

48 hours after siRNA transfection, cells were plated and analyzed for their cell proliferation and cell migration capacities using the Incucyte technology as described below.

To verify knockdown efficiency, aliquots of these cells were treated for RNA and protein extraction and analyzed by RT-qPCR and/or Western blotting for *hPCL3S* expression levels.

EZH2-specific siRNAs were obtained from Dharmacon.

Plasmid construction and transfection

The human *hPCL3S* ORF was PCR-amplified from the previously described pcDNA3FLAG-*hPCL3S* vector [22] using oligonucleotides with suitable BglII and HindIII restriction sites. The insert was cloned in the eukaryotic pAM-1C expression vector containing a puromycine selection marker (Active Motif) using the BglII site to clone it downstream of a human beta Actin promoter and the HindIII site to append the AM-tag sequence to the C-terminal end of *hPCL3S*. The Δ C-Term (AA 155-207) deletion mutant, the point mutant in the Tudor Domain (W50A) and the mutant (E¹¹²ILIC¹¹⁶ to AAQAA) inactivating an essential β -turn in the PHD1 domain were similarly cloned by a two-round PCR mutagenesis strategy. All constructs were verified by sequencing.

LNCaP cells were transfected using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. At 48 hours after transfection, cells were cultured in complete selection medium containing 2 mg/ml of Puromycin. When isolated resistant clones appeared, they were recovered using the cloning cylinder method and amplified for use in all subsequent experiments.

RNA isolation and quantitative RT-PCR analyses

Total RNA was reverse transcribed using random primers and MultiScribe™ reverse transcriptase (Applied Biosystems). Real-time PCR analysis was performed by Power SYBR Green (Applied Biosystems) in a MX3005P fluorescence temperature cycler (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Results were normalized with respect to *ALAS1* [50] or *18S* RNAs used as an internal control. The primers used for the qRT-PCR analyses are summarized in Supplementary Table 2.

Statistics

Experiments were realized at least twice in duplicates or triplicates. Statistical analyses were performed by Student's test. The asterix (*) indicates $p < 0.05$, (**) indicates $p < 0.005$ and (***) indicates $p < 0.001$. NS: Non-Significant.

Antibodies and Western blot analyses

To generate polyclonal antibodies against hPCL3L and hPCL3S, the N-terminal common peptide corresponding to AA 1-15 of human hPCL3 (NH₂-MENRALDPGTRDSYG+C-CONH₂) was synthesized, coupled to KLH and used to immunize rabbits (Eurogentec, Belgium). Specific antibodies were purified by affinity chromatography using standard protocols. For hPCL3S, we also used commercial antibodies generated against a GST-hPCL3S fusion protein (Proteintech, 11895-1-AP) or against a C-terminal peptide (Everest biotech, EB22188).

Commercial primaries antibodies of the following specificities were also used: EZH2 (Cell Signaling, 5246), SUZ12 (Cell Signaling, D39F6), α -tubulin (Santa Cruz, sc-23948), GAPDH (Santa Cruz, sc-32223), Lamin (Santa Cruz, sc-20681), β -catenin (Santa Cruz, sc-7199), Vimentin (Santa Cruz, sc-6260), AM-Tag: (Active Motif, 61677) and normal rabbit IgG (Cell Signaling, 2729). Western blots were performed as previously described [48]. The secondary antibodies were horse-radish peroxydase-linked antibodies against rabbit, rat and mouse immunoglobulins (Amersham Biosciences) or goat immunoglobulins (Southern Biotech).

Cell proliferation and migration assays

The cell proliferation and migration were measured using label-free and non-invasive assays by the Incucyte Live-Cell Imaging System (Essen BioScience). DU145 or PC3 cells (10.000 cells/well) were plated overnight on two 24-well plates and transfected with control or *hPCL3S*-specific siRNAs. 24 hours later, one plate was kept for 72h before RNA extraction to check for transfection efficiency by qRT-PCR whereas the second was incubated in the Incucyte device Zoom system at 37°C in humidified 5% CO² atmosphere and photographed using a x 4 objective. The proliferation has been calculated by analyzing the surface of the well (Confluence %) through live cell images collected by the Incucyte Zoom system at 2h-intervals over 96 hours. For the migration assays, DU145 (40.000 cells) and PC3 (30.000 cells) were seeded in 96-well plates and transfected by siRNAs as described above. 24 hours after transfection, the cells were treated with Mitomycin C (10ug/ml) for 1 hour and a wound was created using the Incucyte ZOOM 96-well Scratch wound. Then, the cells were rinsed two times by complete medium and incubated in the Incucyte Zoom system, as described above except that the cells were photographed using a x 10 objective.

For the LNCaP stably transfected clones, the same protocols were used with minor modifications. Briefly, 10.000 cells/well in 24-well plates and 35.000 cells/well in 96-well plates were used for the proliferation and migration assays, respectively. For the migration assays, the cells were treated with Mitomycin C (10 µg/ml) for 2 hours.

Clonogenic Assays

DU145 cells transfected with the relevant siRNAs and LNCaP stable clones obtained after transfection with the empty pAM vector or each *hPCL3S*-AMTag version were plated in 60mm culture dishes at a density of 750 cells/dish and cultured in complete medium for 12-15 days. The medium was changed every 3 day and for the experiments using siRNAs, a second

round of transfection was performed after 6 days. The colonies were rinsed with PBS before fixation with 4% PFA at 4°C and stained with 5% crystal violet for 10 min at room temperature. Then, the number of colonies was counted using the software “Colony” on a LAS3000 device.

RNA-seq and Expression Analysis

Total RNA was isolated from a pool of LNCaP-pAM (empty vector) stable clones and from the LNCaP-p-AM-hPCL3S clone 12 cells using NucleoSpin RNA (Clontech). 0.5-1 µg of total RNA was treated with RiboGold zero to remove ribosomal RNA. Illumina sequencing libraries were constructed using random primers according to the manufacturer's instructions using the TruSeq Stranded RNA LT Kit [51]. Reads were aligned to hg19 using STAR [52]. Mapped reads were filtered to exclude PCR duplicates and reads mapping to known ribosomal coordinates, from rnsk table in the UCSC database (<http://genome.ucsc.edu>). Gene expression was calculated using featureCounts [53]. Only primary alignments with mapping quality of 10 or more were counted. Counts were normalized to 1 million reads. Signal tracks were generated using BEDTools [54]. Differential expression was calculated using DESeq2 [55]. For gene ontology analyses, we used the DAVID database [56] [57].

AUTHORS CONTRIBUTION

S.A., G.B., M.D., S.G., M.N.R. and D.L. designed experiments and analyses. S.A., G.B., M.D., N.S., S.G., S.R. and I.L. performed experiments. X.L. acquired and managed tumor samples. S.A., G.B., M.D., N.S., M.N.R. and D.L. wrote the manuscript and prepared figures. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Tumorothèque C2RC (CHU LILLE, France) and Pr A. Villers, the referring clinician of the urological tumors collection. We are indebted to Dr. Martine Duterque-Coquillaud for the kind gift of the LNCaP, PC3 and DU 145 cell lines, and for RNAs prepared from normal primary human prostate epithelial cells (PrEC) as well as for many helpful discussions. We thank Drs Vanessa Dehennaut and Martine Duterque-Coquillaud for critical reading of the manuscript.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no disclosure of potential conflicts of interest.

GRANT SUPPORT

We thank the CNRS, the “Association pour la Recherche sur le Cancer” (ARC) and the “Ligue Nationale Contre le Cancer”, Comités de la Somme et du Pas de Calais for their financial support. Souhila Abdelfettah was supported by a PhD fellowship from the «Ligue Nationale contre le Cancer”.

REFERENCES

- 1 Wang G, Zhao D, Spring DJ and DePinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & Development*. 2018; 32: 1105-1140.
- 2 Terry S and Beltran H. The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer progression. *Frontiers in oncology*. 2014; 4: 60.

- 3 Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang CZ and Huang J. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*. 2011; 71: 1668-1679.
- 4 Uysal-Onganer P, Kawano Y, Caro M, Walker MM, Diez S, Darrington, RS, Waxman J and Kypta RM. Wnt-11 promotes neuroendocrine-like differentiation, survival and migration of prostate cancer cells. *Molecular Cancer*. 2010; 9: 55.
- 5 Moparthi L, Pizzolato G and Koch, S. Wnt activator FOXB2 drives prostate cancer neuroendocrine differentiation. *bioRxiv*. 2019; doi 10.1101/564625.
- 6 Spiotto MT and Chung TD. STAT3 mediates IL-6-induced neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells. *The Prostate*. 2000; 42: 186-195.
- 7 Margueron R and Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011;469: 343-349.
- 8 Schuettengruber B, Bourbon HM, Di Croce L and Cavalli G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*. 2017; 171:34-57.
- 9 Vizan P, Beringer M, Ballare C and Di Croce L. Role of PRC2-associated factors in stem cells and disease. *The FEBS journal*. 2015; 282: 1723-1735.
- 10 Holoch D and Margueron R. Mechanisms Regulating PRC2 Recruitment and Enzymatic Activity. *Trends in Biochemical Sciences*. 2017; 42: 531-542.
- 11 Volkel P, Dupret B, Le Bourhis X and Angrand PO. Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics. *American Journal of Translational Research*. 2015; 7: 175-193.
- 12 Jain P and Di Croce L. Mutations and deletions of PRC2 in prostate cancer. *Bioessays*. 2016; 38: 446-454.
- 13 Comet I, Riising EM, Leblanc B and Helin K. Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16: 803-810.
- 14 van Mierlo G, Veenstra GJC., Vermeulen M and Marks H. The Complexity of PRC2 Subcomplexes. *Trends in Cell Biology*. 2019; 29: 660-671.

- 15 Chen S, Jiao L, Shubbar M, Yang X and Liu X. Unique Structural Platforms of Suz12 Dictate Distinct Classes of PRC2 for Chromatin Binding. *Molecular Cell*. 2018; 69: 840-852.
- 16 Ballare C, Lange M, Lapinaite A, Martin GM, Morey L, Pascual G, Liefke R, Simon B, Shi Y, Gozani O, Carlomagno T, Benitah SA and Di Croce L. Phf19 links methylated Lys36 of histone H3 to regulation of Polycomb activity. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2012; 19: 1257-1265.
- 17 Brien GL, Gambero G, O'Connell DJ, Jerman E, Turner SA, Egan CM, Dunne EJ, Jurgens MC, Wynne K, Piao L, Lohan AJ, Ferguson N, Shi X, Sinha KM, Loftus BJ, Cagney, G and Bracken AP. Polycomb PHF19 binds H3K36me3 and recruits PRC2 and demethylase NO66 to embryonic stem cell genes during differentiation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2012; 19: 1273-1281.
- 18 Cai L, Rothbart SB, Lu R, Xu B, Chen WY, Tripathy A, Rockowitz S, Zheng D, Patel DJ, Allis CD, Strahl BD, Song J and Wang GG. An H3K36 methylation-engaging Tudor motif of polycomb-like proteins mediates PRC2 complex targeting. *Molecular Cell*. 2013; 49: 571-582.
- 19 Li H, Liefke R, Jiang J, Kurland JV, Tian W, Deng P, Zhang W, He Q, Patel DJ, Bulyk ML, Shi Y and Wang Z. Polycomb-like proteins link the PRC2 complex to CpG islands. *Nature*. 2017; 549: 287-291.
- 20 Perino M, van Mierlo G, Karemaker ID, van Genesen S, Vermeulen M, Marks H, van Heeringen S J and Veenstra GJC. MTF2 recruits Polycomb Repressive Complex 2 by helical-shape-selective DNA binding. *Nature Genetics*. 2018; 50: 1002-1010.
- 21 Wang S, Robertson GP and Zhu J. A novel human homologue of *Drosophila* polycomblike gene is up-regulated in multiple cancers. *Gene*. 2004; 343: 69-78.

- 22 Boulay G, Rosnoblet C, Guerardel C, Angrand PO. and Leprince D. Functional characterization of human Polycomb-like 3 isoforms identifies them as components of distinct EZH2 protein complexes. *The Biochemical Journal*. 2011; 434: 333-342.
- 23 Brien GL, Healy E, Jerman E, Conway E, Fadda E, O'Donovan D, Krivtsov AV, Rice AM, Kearney CJ, Flaus A, McDade SS, Martin SJ, McLysaght A et al. A chromatin-independent role of Polycomb-like 1 to stabilize p53 and promote cellular quiescence. *Genes & Development*. 2015; 29: 2231-2243.
- 24 Brien GL and Bracken AP. The PCL1-p53 axis promotes cellular quiescence. *Cell Cycle*. 2016; 15:305-306.
- 25 Cai Z, Qian ZY, Jiang H, Ma N, Li Z, Liu LY, Ren XX, Shang YR, Wang JJ, Li JJ, Liu DP, Zhang XP, Feng et al. hPCL3s Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis by Activating beta-Catenin Signaling. *Cancer Research*. 2018; 78: 2536-2549.
- 26 Qin J, Liu X, Laffin B, Chen X, Choy G, Jeter CR, Calhoun-Davis T, Li H, Palapattu GS, Pang S, Lin K, Huang J, Ivanov I et al. The PSA(-/lo) prostate cancer cell population harbors self-renewing long-term tumor-propagating cells that resist castration. *Cell Stem Cell*. 2012; 10: 556-569.
- 27 Rycaj K, Cho EJ, Liu X, Chao HP, Liu B, Li Q, Devkota AK, Zhang D, Chen X, Moore J, Dalby KN and Tang DG. Longitudinal tracking of subpopulation dynamics and molecular changes during LNCaP cell castration and identification of inhibitors that could target the PSA-/lo castration-resistant cells. *Oncotarget*. 2016; 7: 14220-14240.
- 28 Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T. and Hara, A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*. 2016; 7: 11018-11032.
- 29 Di Giammartino, D. C., Nishida, K. and Manley, J. L. Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation. *Molecular Cell*. 2011; 43: 853-866.

- 30 Gruber AJ. and Zavolan M. Alternative cleavage and polyadenylation in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2019; 20: 599-614.
- 31 Hunkapiller J, Shen Y, Diaz A, Cagney G, McCleary D, Ramalho-Santos M, Krogan N, Ren B, Song JS and Reiter JF. Polycomb-like 3 promotes polycomb repressive complex 2 binding to CpG islands and embryonic stem cell self-renewal. *PLoS Genetics.* 2012; 8: e1002576.
- 32 Aasland R, Gibson TJ and Stewart AF. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends in Biochemical Sciences.* 1995; 20: 56-59.
- 33 Sanchez R and Zhou MM. The PHD finger: a versatile epigenome reader. *Trends in Biochemical Sciences.* 2011; 36: 364-372.
- 34 O'Connell S, Wang L, Robert S, Jones CA, Saint R and Jones RS. Polycombl like PHD fingers mediate conserved interaction with enhancer of zeste protein. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001; 276: 43065-43073.
- 35 Kalkhoven E, Roelfsema JH, Teunissen H, den Boer A, Ariyurek Y, Zantema A, Breuning MH, Hennekam RC. and Peters DJ. Loss of CBP acetyltransferase activity by PHD finger mutations in Rubinstein-Taybi syndrome. *Human Molecular Genetics.* 2003;12: 441-450.
- 36 Guo H, Ci X, Ahmed M, Hua JT, Soares F, Lin D, Puca L, Vosoughi A, Xue H, Li E, Su P, Chen S, Nguyen T et al. ONECUT2 is a driver of neuroendocrine prostate cancer. *Nature Communications.* 2019; 10: 278.
- 37 Sturchler E, Cox JA, Durussel I, Weibel M and Heizmann CW. S100A16, a novel calcium-binding protein of the EF-hand superfamily. *The Journal of Biological Chemistry.* 2006; 281: 38905-38917.

- 38 Zhu W, Xue Y, Liang C, Zhang R, Zhang Z, Li H, Su D, Liang X, Zhang Y, Huang Q, Liu M, Li L, Li D. S100A16 promotes cell proliferation and metastasis via AKT and ERK cell signaling pathways in human prostate cancer. *Tumour Biol.* 2016; 37: 12241-12250.
- 39 Penet MF, Kakkad S, Pathak AP, Krishnamachary B, Mironchik Y, Raman V, Solaiyappan M and Bhujwalla ZM. Structure and Function of a Prostate Cancer Dissemination-Permissive Extracellular Matrix. *Clin Cancer Res.* 2017; 23: 2245-2254.
- 40 Tian TV, Tomavo N, Huot L, Flourens A, Bonnelye E, Flajollet S, Ho, D, Leroy X, de Launoit Y and Duterque-Coquillaud M. Identification of novel TMPRSS2:ERG mechanisms in prostate cancer metastasis: involvement of MMP9 and PLXNA2. *Oncogene*; 2014: 33; 2204-2214.
- 41 Tian B and Manley J L. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 18: 18-30.
- 42 Lee SH, Singh I, Tisdale S, Abdel-Wahab O, Leslie CS and Mayr C. Widespread intronic polyadenylation inactivates tumour suppressor genes in leukaemia. *Nature.* 2018; 561: 127-131.
- 43 Lu F, Gladden AB and Diehl JA. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Research.* 2003; 63: 7056-7061.
- 44 Bienz, M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends in Biochemical Sciences.* 2006; 31: 35-40.
- 45 Deng Q, Hou J, Feng L, Lv A, Ke X, Liang H, Wang F, Zhang K, Chen K and Cui H. PHF19 promotes the proliferation, migration, and chemosensitivity of glioblastoma to doxorubicin through modulation of the SIAH1/beta-catenin axis. *Cell death & disease.* 2018; 9, 1049.

- 46 Ren Z, Ahn JH, Liu H, Tsai YH, Bhanu NV, Koss B, Allison DF, Ma A, Storey AJ, Wang P, Mackintosh SG, Edmondson RD, Groen RWJ et al. PHF19 promotes multiple myeloma tumorigenicity through PRC2 activation. *Blood*. 2019; doi:10.1182.
- 47 Flajollet S, Tian TV, Flourens A, Tomavo N, Villers A, Bonnelye E, Aubert S, Leroy X and Dutertre-Coquillaud M. Abnormal expression of the ERG transcription factor in prostate cancer cells activates osteopontin. *Mol Cancer Res*. 2011; 9: 914-924.
- 48 Dehennaut V, Loison I, Dubuissez M, Nassour J, Abbadie C and Leprince D. DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to regulate DNA repair. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288: 10254-10264.
- 49 Boulay G, Dubuissez M, Van Rechem C, Forget A, Helin K, Ayrault O and Leprince D. Hypermethylated in cancer 1 (HIC1) recruits polycomb repressive complex 2 (PRC2) to a subset of its target genes through interaction with human polycomb-like (hPCL) proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287: 10509-10524.
- 50 Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonic A and Jung K. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *Journal of Molecular Medicine*. 2005; 83: 1014-1024.
- 51 Boulay G, Sandoval GJ, Riggi N, Iyer S, Buisson R, Naigles B, Awad ME, Rengarajan S, Volorio A, McBride MJ, Broye LC, Zou L, Stamenkovic I et al. Cancer-Specific Retargeting of BAF Complexes by a Prion-like Domain. *Cell*. 2017; 171 163-178.
- 52 Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M and Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013; 29: 15-21.

- 53 Liao Y, Smyth G K and Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014 ;30: 923-930.
- 54 Quinlan AR and Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*. 2010; 26: 841-842.
- 55 Love MI, Huber W and Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*. 2014; 15: 550.
- 56 Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc*. 2009; 4:44-57.
- 57 Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:1-13.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1. Human hPCL3L and hPCL3S isoforms and their identified functional domains

A) Comparative structure of hPCL3L and hPCL3S. The structure of the full length human hPCL3L and of the shortest isoform hPCL3S generated by alternative splicing and Alternative Polyadenylation in the coding region (CR-APA) is schematically drawn [21] [22]. The various functional domains are indicated: the TUDOR domain; the two PHD (Plant Homeo domain); the Winged Helix domain involved in the binding to G-C-rich sequences [19] [20] and initially identified as an extended region of Homology (EH) with the *Drosophila* PCL protein [21] and finally the Reverse Chromodomain (RC) involved in the competitive interaction with AEBP2 for SUZ12 [15]. Two putative nuclear localization signals identified in hPCL3L are also indicated [21].

B) Structure of the various hPCL3S constructs used in this study. Schematic structure of the wt hPCL3S-AMTag protein and mutants thereof (Δ C-term, W50A and Mut-PHD1). The C-terminal AM-Tag is shown as an open box.

Fig. 2. Analyses of *hPCL3S* and *hPCL3L* expression in human prostate cancer tissue

A-B) Comparison of *hPCL3S* and *hPCL3L* mRNA levels in five matched prostate cancer (T) and normal adjacent (N) tissue samples by RT-qPCR analyses.

C) Expression in 20 tumor tissues of *hPCL3S*, *hPCL3L* and *EZH2*. The *hPCL3S*, *hPCL3L* and *EZH2* expression were measured by RT-qPCR analyses in comparison with their expression in a normal prostate tissue obtained from a young 24-years old donor (BioChain).

D) Quantification of *EZH2*, *hPCL3S* and *hPCL3L* expression in the 20 prostate tumors. The *hPCL3S*, *hPCL3L* and *EZH2* expression measured in panel C is represented as box plots. The box area corresponds to the first and third quartile. The median is shown as a horizontal line in the box. The maximum and minimum of the values are indicated by the whiskers above and below the box.

Fig. 3. *hPCL3S* expression is specifically elevated in androgeno-negative prostate cancer cells, in vitro .

A) The expression levels of *hPCL3S*, *hPCL3L* and *EZH2* were examined in normal primary (PrEC) and immortalized (RWPE-1) prostate epithelial cells as well as in transformed androgeno-dependent (LNCaP) and androgeno-independent (DU145, PC3) prostate cancer cell lines by RT-qPCR analyses.

B) Subcellular localization of endogenous *hPCL3S* proteins by cell fractionation experiments in DU145. Cytoplasmic and nuclear fractions prepared with the nuclear extraction Kit (Millipore) as previously described [22] were immunoprecipitated with rabbit IgG or anti-*hPCL3S* antibodies, resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-*hPCL3S* antibodies (Top panel) to detect the endogenous *hPCL3S* proteins. To validate the accuracy of the cell fractionation, samples of each fraction were tested by Western blot with anti-GAPDH, anti-LAMIN A/C and anti-EZH2 antibodies (Bottom panels).

Fig.4. *hPCL3S* is essential for DU145 and PC3 cell proliferation and migration

A) Validation of the *hPCL3S* siRNA efficiency by RT-qPCR analyses of transfected DU145 and PC3 cells. The expression level of *hPCL3S* was examined in the DU145 (left panel) and PC3 (right panel) prostate cancer cell lines transfected by the sicontrol RNA or each individual siRNA targeting *hPCL3S* by RT-qPCR analyses. As control, non-transfected LNCaP or LNCaP transfected by the transfection agent (RNAimax) alone were also tested.

B). Validation of the *hPCL3S* siRNA efficiency by Western blot analyses of transfected DU145 and PC3 cells. RNAs (used in panel A) and proteins were simultaneously prepared from the same transfected cells. Total cell extracts were analyzed by Western blotting to confirm the knockdown of *hPCL3S*. Actin and α -tubulin were used as a loading control.

C-D) Knockdown of *hPCL3S* inhibited the cell proliferation of DU145 cells (panel C) and of PC3 cells (panel D). The proliferation of non-transfected cells and of cells transfected by RNAiMax alone or in combination with the indicated siRNA was examined using the Incucyte system

E-F) Overexpression of *hPCL3S* inhibited the cell migration of DU145 cells (panel E) and of PC3 cells (panel E). The migration of non-transfected cells and of cells transfected by RNAiMax alone or in combination with the indicated siRNA was examined with the Incucyte Scratch wound system.

Fig. 5. Selection of stable clones expressing the empty vector (p-AM) or the various versions of hPCL3S-AMTag fusion proteins by transfection selected a subpopulation of LNCaP cells.

A) Transfection of LNCaP with p-AMTag expression vectors selects a cell population with an epithelium-like morphology. Bright field images of parental LNCaP cells, of a pool of clones obtained after transfection of these LNCaP cells by the p-AM empty vector and of individual clones used in this study and obtained after transfection of hPCL3S wt (clones 12 and 17), hPCL3S W50A (clones 5 and 14) and hPCL3S Mut-PHD1 (clones 8 and 20).

B) RT-qPCR analyses of *AR* and *PSA* expression level in the parental LNCaP cells, in LNCaP transfected by the empty vector as well as in the various hPCL3S (wt and mutants) stable clones obtained.

C) Similar RT-qPCR analyses for *ALDH1A1* expression level in the indicated cells.

Fig. 6. *hPCL3S* promotes proliferation and migration in the androgeno-dependent human prostate cancer cells, LNCaP.

A) Stable overexpression of hPCL3S in LNCaP prostate cancer cells. Quantitative PCR analyses of *hPCL3S* expression was performed on LNCaP cells stably transfected with the empty vector (pool of clones) or on individual clones obtained after transfection of the hPCL3S-AMTag expression vector.

B) Immunofluorescence analyses of LNCaP-hPCL3S-clone 12. The three top panels correspond to the DAPI staining, the conventional immunofluorescence analysis with the anti-AMTag antibody and the merging of the two images, respectively. The bottom panel represents the same experiment except that the primary anti-AMTag antibody was omitted (negative control).

C) Overexpression of *hPCL3S* promoted the cell proliferation of LNCaP cells. The proliferation of parental LNCaP cells as well of a pool of empty vector transfected clones or the *hPCL3S* overexpressing clones 12 and 17 was examined using the Incucyte system

D) Clonogenicity assays. The empty vector transfected cells and the *hPCL3S* overexpressing clones 12 and 17 were compared in a clonogenicity assay. An example of the crystal blue staining (1 picture out of three) is shown as well as a graphical view of the three samples for each condition (see Supplementary Figure 3 for details).

E) Overexpression of *hPCL3S* promoted the cell migration of LNCaP cells. The migration of parental LNCaP cells as well of the various stable clones was examined using the Incucyte Scratch Wound system.

Fig. 7. The short (AA 155-207) specific C-terminal end of *hPCL3S* generated by the alternative polyadenylation mechanism is not essential for the promotion of proliferation and migration.

A) Stable overexpression of *hPCL3S*-Delta C-term in two individual clones was analyzed by RT-qPCR analyses

B) Overexpression of *hPCL3S-ΔC-Term* promoted the proliferation of LNCaP cells as efficiently as wt *PCL3S*. The proliferation of LNCaP transfected by the empty vector, of *hPCL3S* overexpressing clone12 and of two clones overexpressing the Delta C-term mutant was examined using the Incucyte system.

C) The effect of the overexpression of *hPCL3S-ΔC-Term* was examined using the clonogenicity assay (the original pictures used for this graphical view are shown in Supplementary Figure 3).

D) Overexpression of *hPCL3S-ΔC-Term* promoted the cell migration of LNCaP cells as efficiently as *wt hPCL3S*. The migration of the various indicated clones was examined using the Incucyte Scratch Wound system.

Fig. 8. The H3K36me3 binding activity of the *hPCL3S* TUDOR domain is not required for the promotion of proliferation and migration.

A) Stable overexpression of *hPCL3S-W50A* in two individual clones was confirmed by RT-qPCR analyses.

B) The W50A point mutation in the TUDOR domain did not impaired the proliferation of LNCaP cells as compared with *wt hPCL3S*. The proliferation of empty vector transfected cells or *wt hPCL3S* overexpressing clone12 was compared to two different clones overexpressing *hPCL3S-W50A* (clones 5 and 14) using the Incucyte system.

C) The effect of the overexpression of *hPCL3S W50A* was examined using the clonogenicity assay (the original pictures used for this graphical view are shown in Supplementary Figure 4).

D) Overexpression of *hPCL3S W50A* promoted the cell migration of LNCaP cells as efficiently as *wt PCL3S*. The migration of the various stable clones was examined using the Incucyte Scratch Wound system.

Fig. 9. The PHD1 domain is essential for the promotion of proliferation.

A) Stable overexpression of hPCL3S-PHD1-Mut in two individual clones was confirmed by RT-qPCR analyses.

B) The mutation of an essential β strand in the PHD1 domain impaired the proliferation of LNCaP cells as compared with *wt hPCL3S*. The proliferation of empty vector transfected cells or *wt hPCL3S* overexpressing clone12 was compared to two different clones overexpressing hPCL3S-PHD1-Mut (clones 8 and 20) using the Incucyte system.

C) The effect of the overexpression of hPCL3S-PHD1-Mut was examined using the clonogenicity assay (the original pictures used for this graphical view are shown in Supplementary Figure 4).

D) Overexpression of hPCL3S-PHD1-Mut slightly promoted the cell migration of LNCaP cells as compared to the control empty vector but less efficiently than *wt PCL3S*. The migration of the various stable clones was examined using the Incucyte Scratch Wound system.

Fig. 10. IL6 appeared as a hPCL3S target gene but independently of β catenin stabilization in DU145 cells.

After transfection of DU145 cells by *hPCL3S* siRNAs, RNAs and proteins extracts were simultaneously prepared from the same cells. A) Efficient knockdown of *hPCL3S* in DU145 after transfection of the three individual siRNAs was confirmed by RT-qPCR analyses.

B) *IL6* expression is down regulated after transfection of two out of three individual hPCL3S siRNAs. The RT samples analyzed in panel A were checked for expression of *IL6* by qPCR.

C) Efficient knockdown of *hPCL3S* did not affect the β catenin protein levels. Total proteins extracts were tested by Western blot for the expression of hPCL3S, β catenin and Tubulin as a loading control.

Fig. 11. Global analyses of the RNA-Seq data of LNCaP empty vector and LNCaP cells overexpressing hPCL3S (Clone 12)

A) Volcano plot shows gene expression changes upon PHF19S induction in LNCaP cells. X-axis shows fold changes in expression and y-axis shows adjusted p values. Red dots indicate the genes differentially expressed (at least two-fold changes and p-value < 0.05).

B) The enriched pathways were identified using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID).

C) Graphical representation of the common functions between up- and down-regulated genes.

Fig. 12. Validation of some differentially expressed genes.

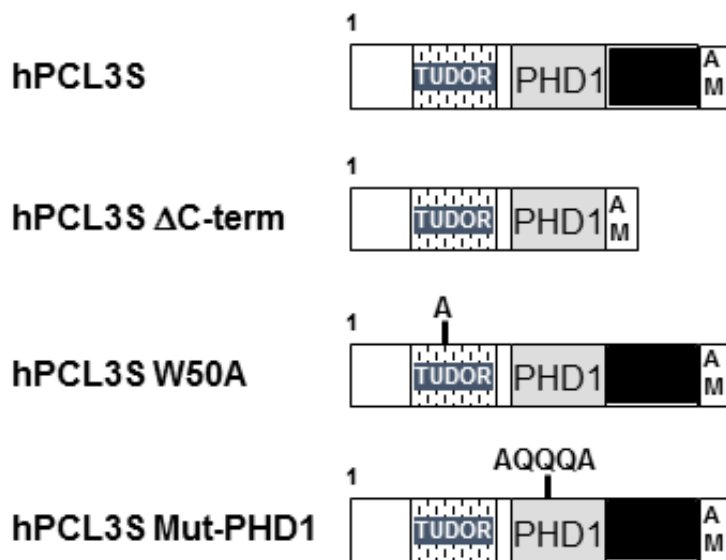
A) *FAM1484A* is up-regulated in LNCaP transfected by the p-AM empty vector but down-regulated in LNCaP clone 12 cells surexpressing *hPCL3S*. RNAs were extracted from the non-transfected LNCaP cells as well as from cells transfected with the empty vector or with the p-AM-hPCL3S wt clone 12. The expression of Neuron-specific enolase, a classical marker of NED, has also been tested.

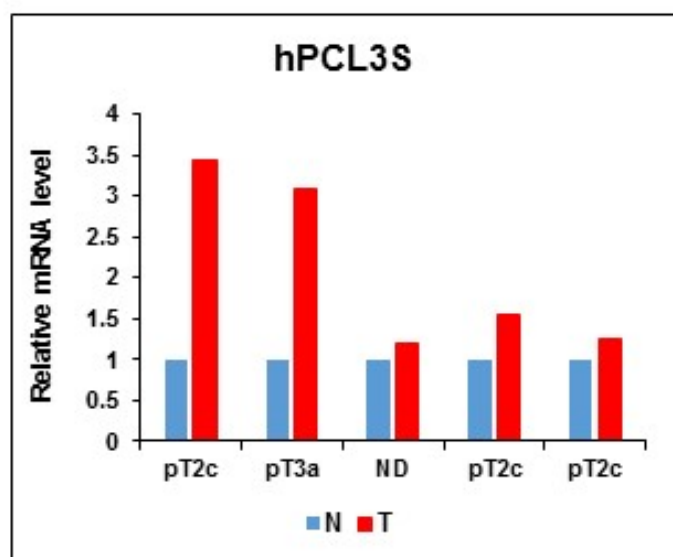
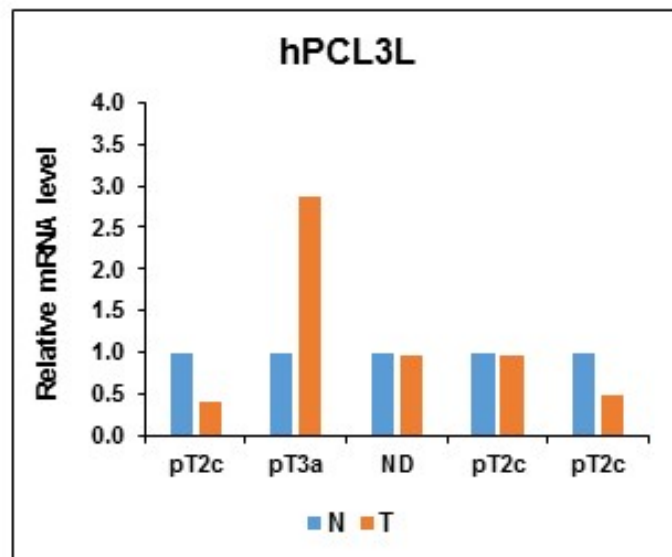
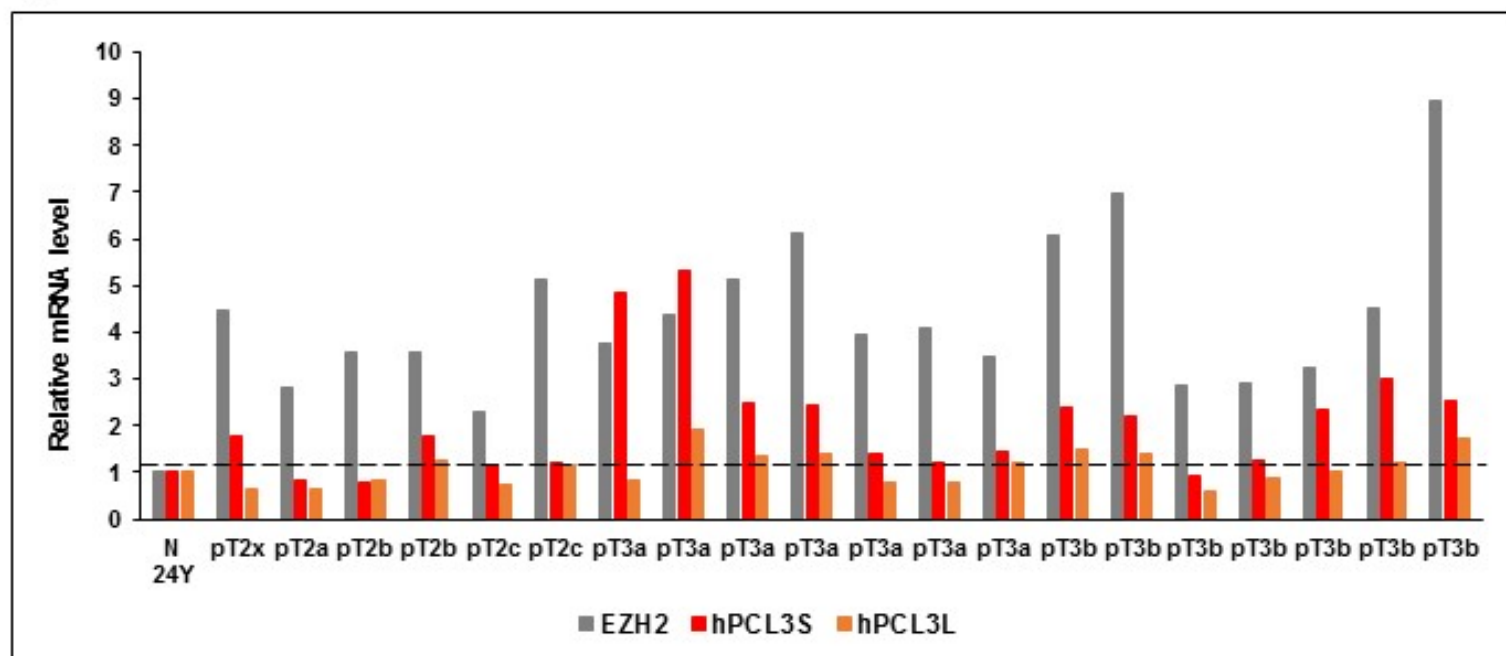
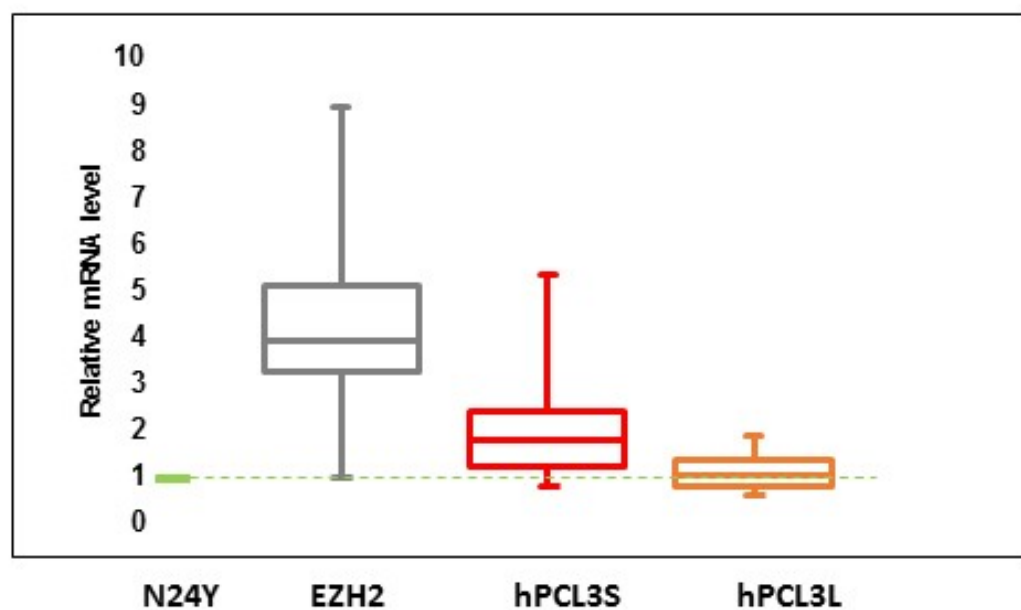
B) Validation by RT-qPCR analyses of the RNA-Seq data showing differential regulation of some selected genes in the LNCaP clone 12 cells. Selected genes (*S100A16*, *SPON1* and *PLXNA2*) were analyzed by RT-qPCR and showed the expected differential regulation.

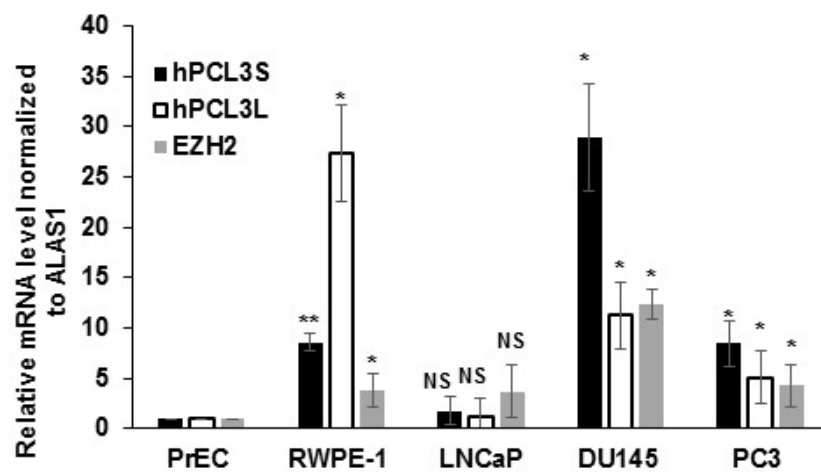
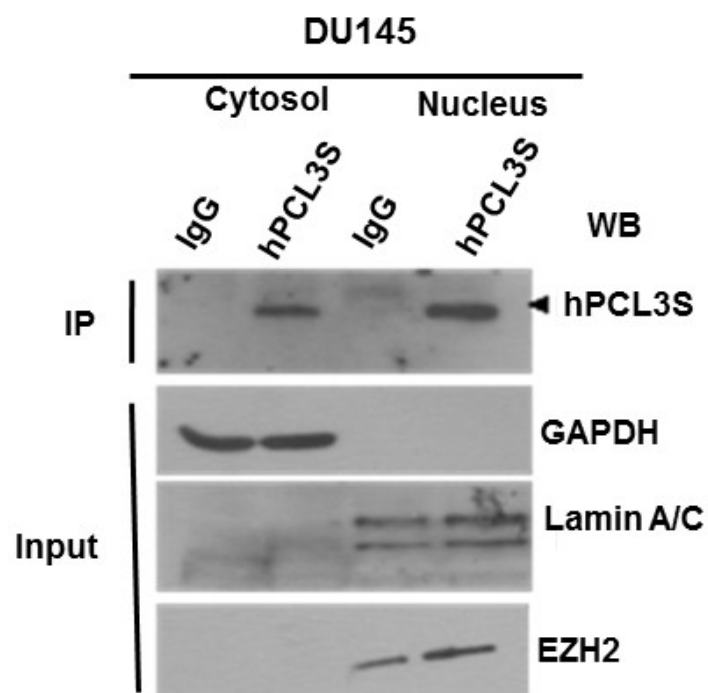
A

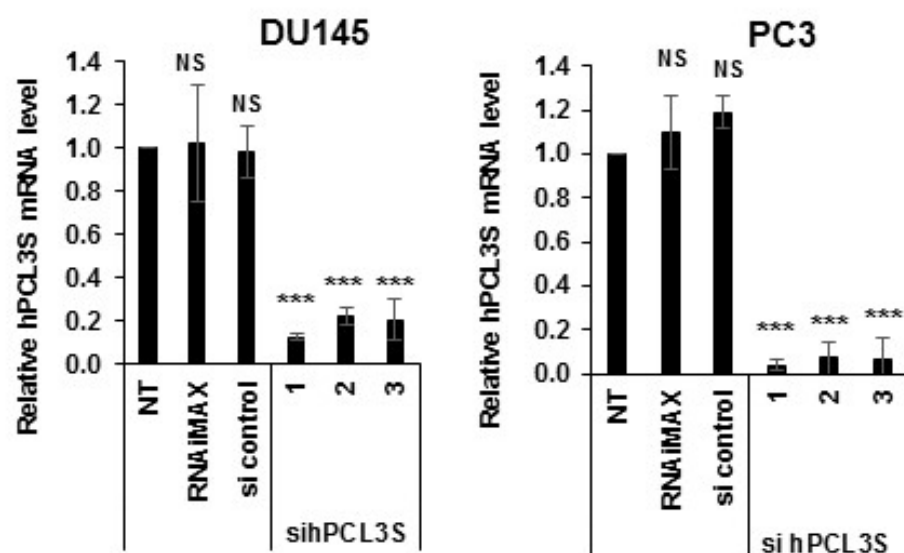
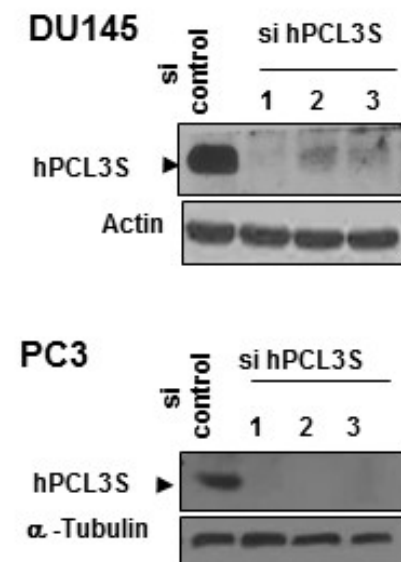
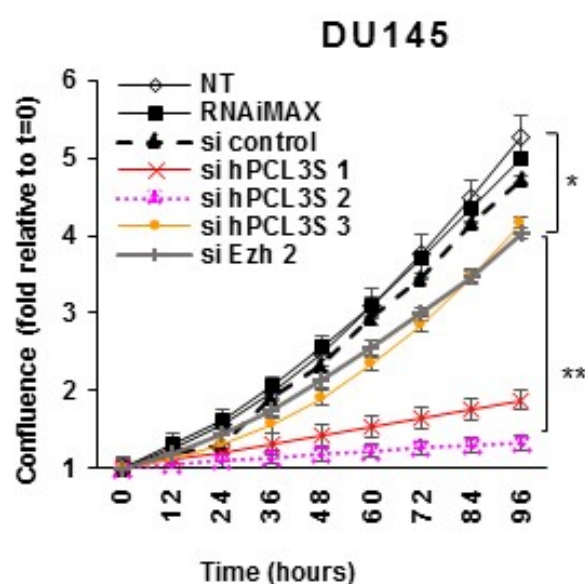
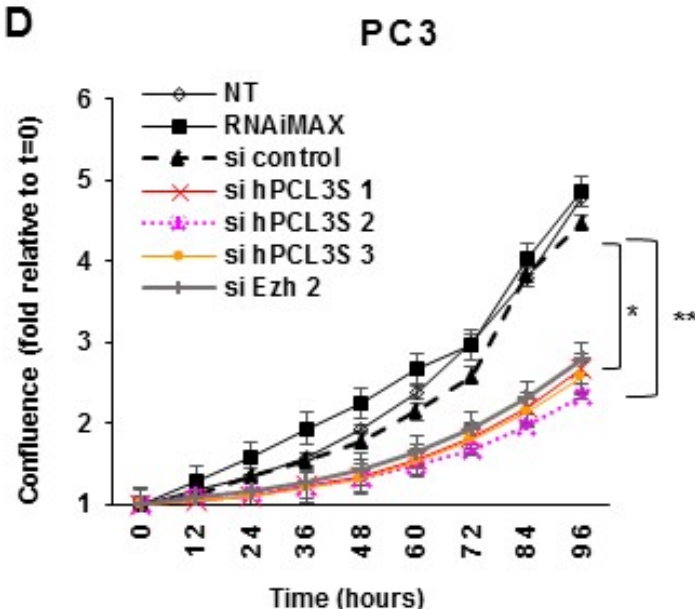
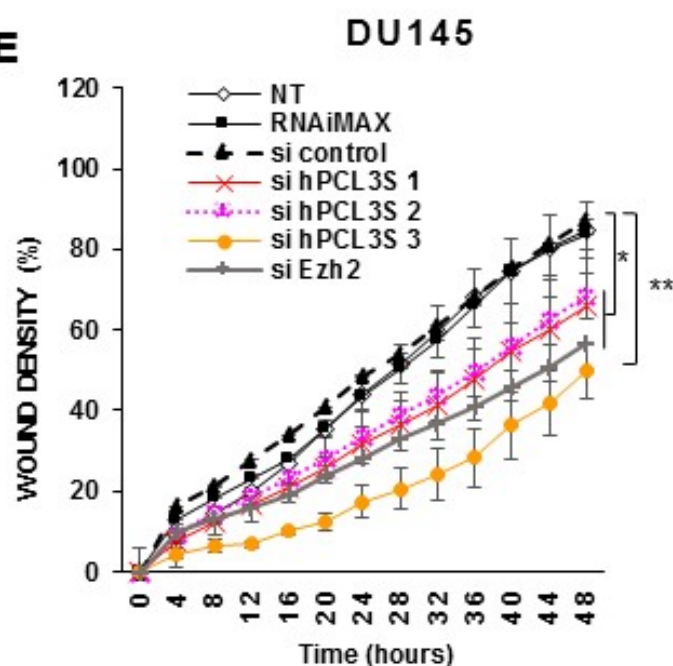
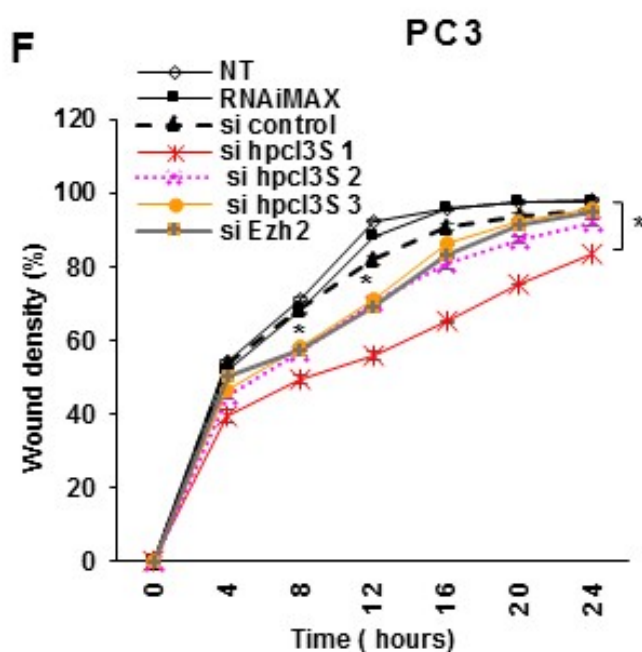


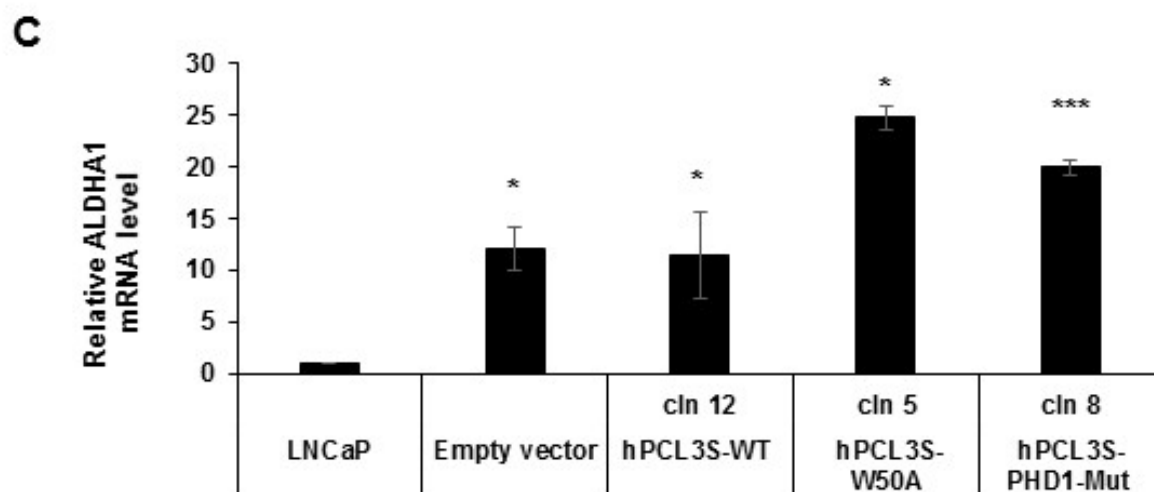
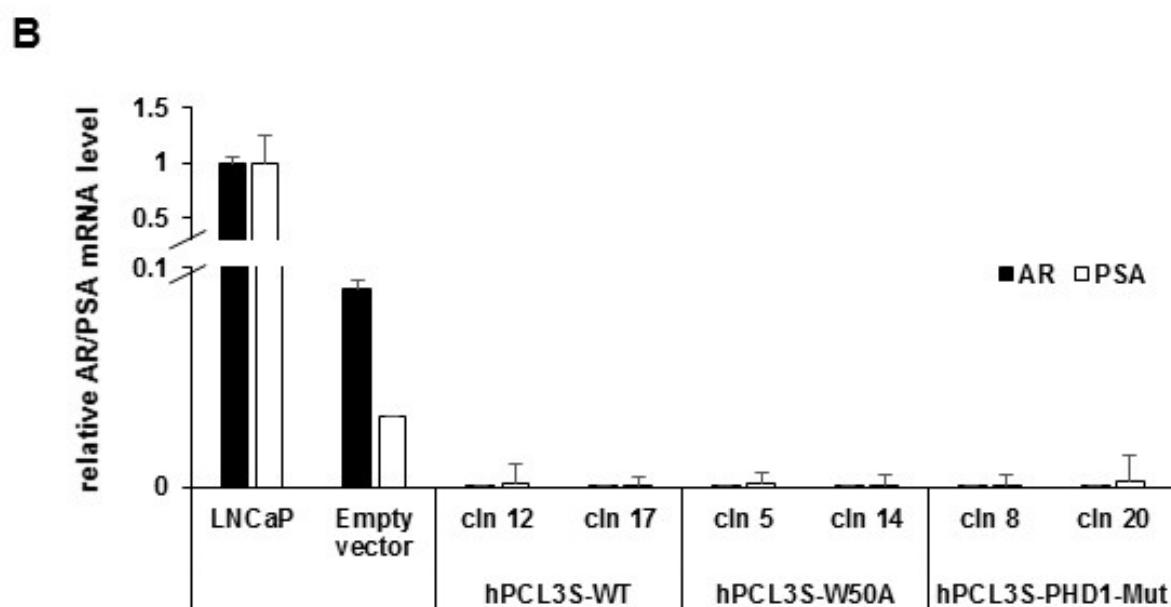
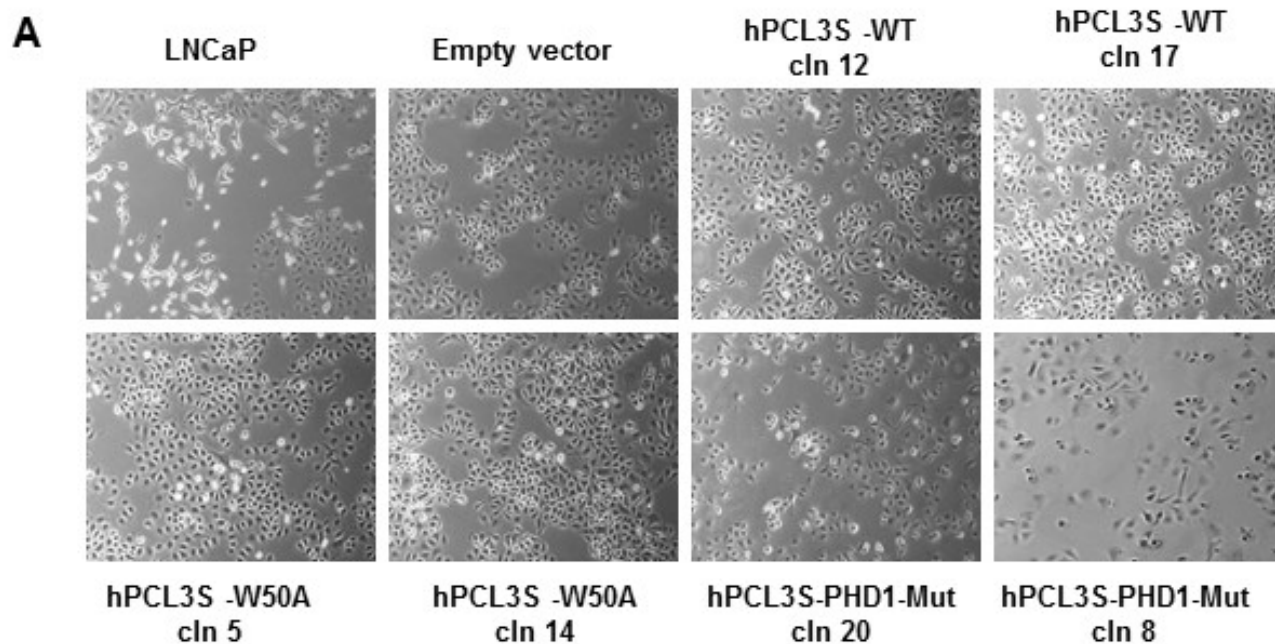
B



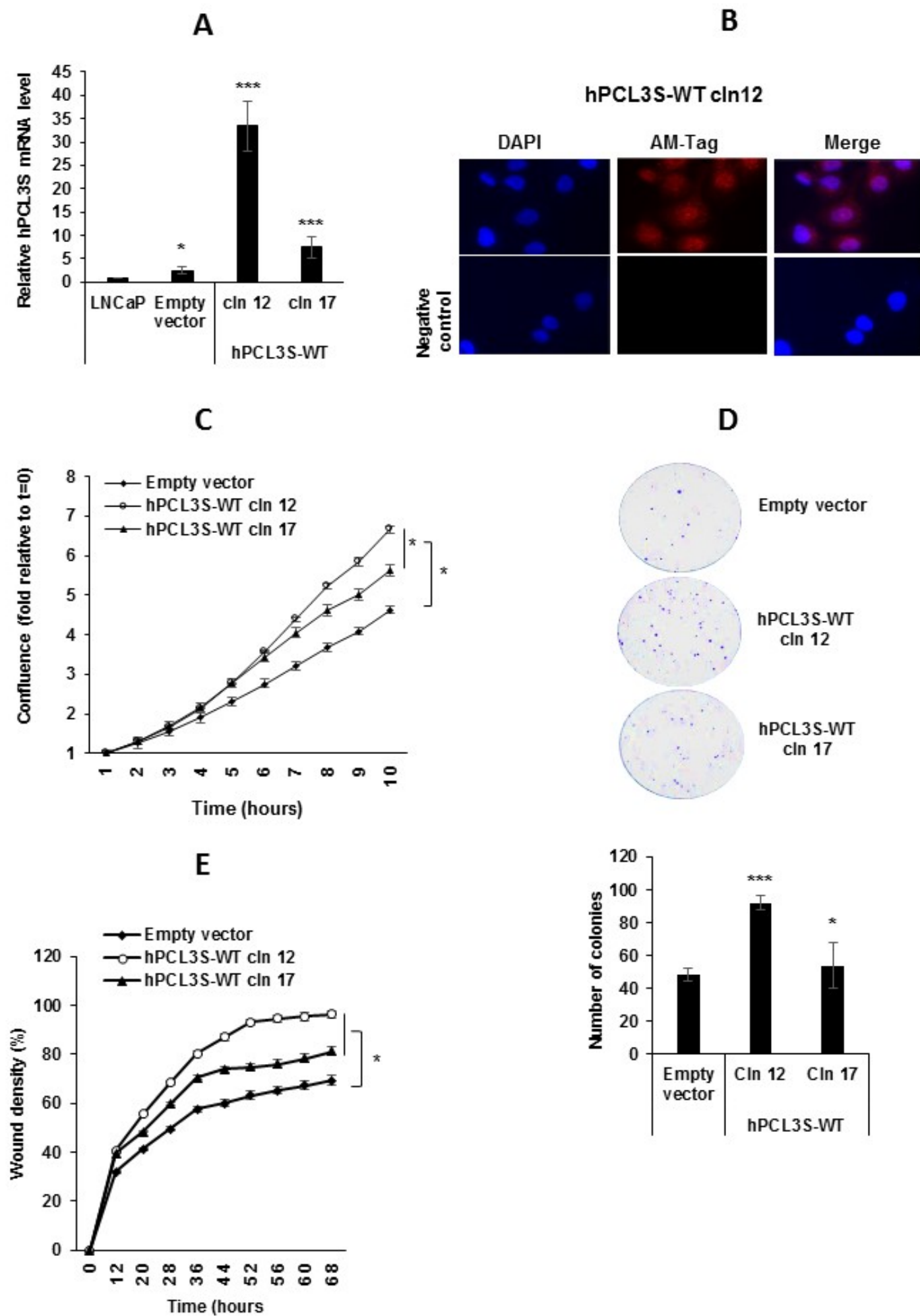
A**B****C****D**

A**B**

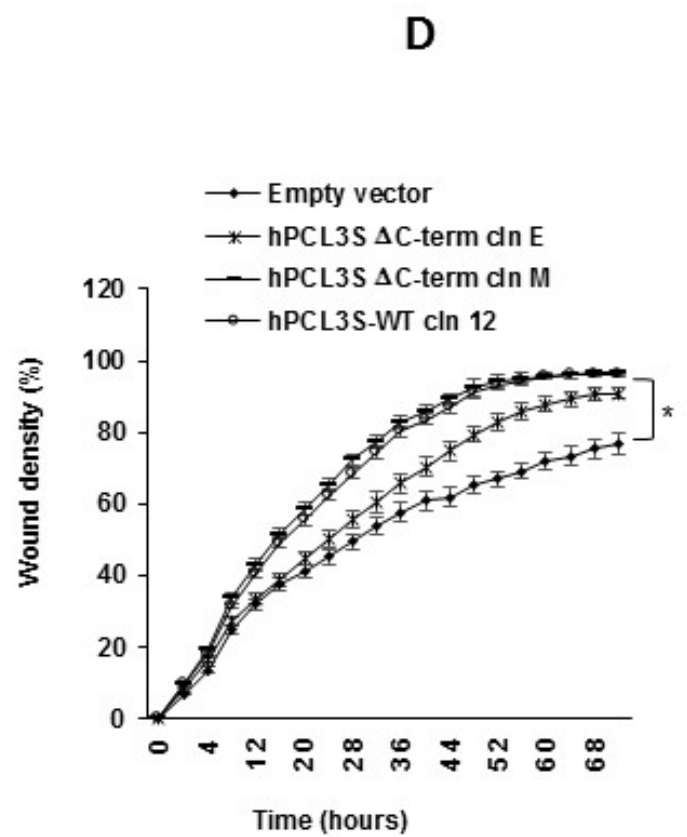
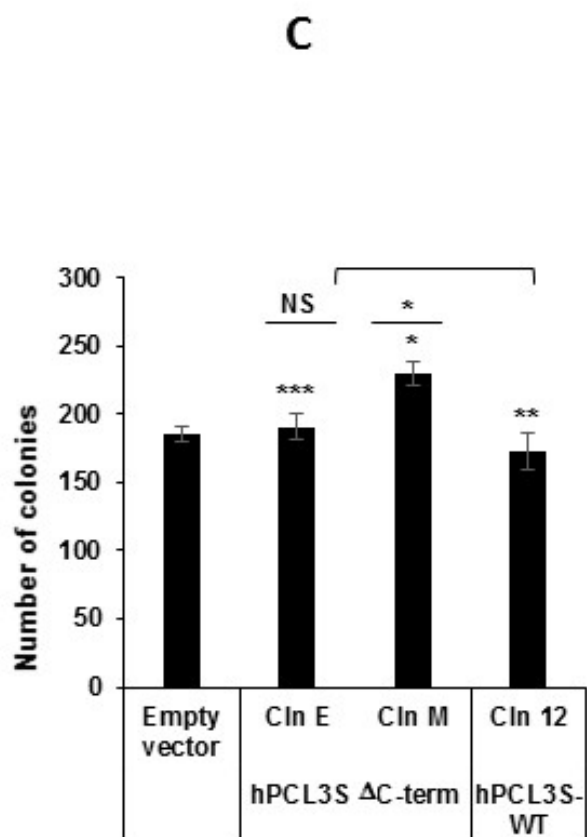
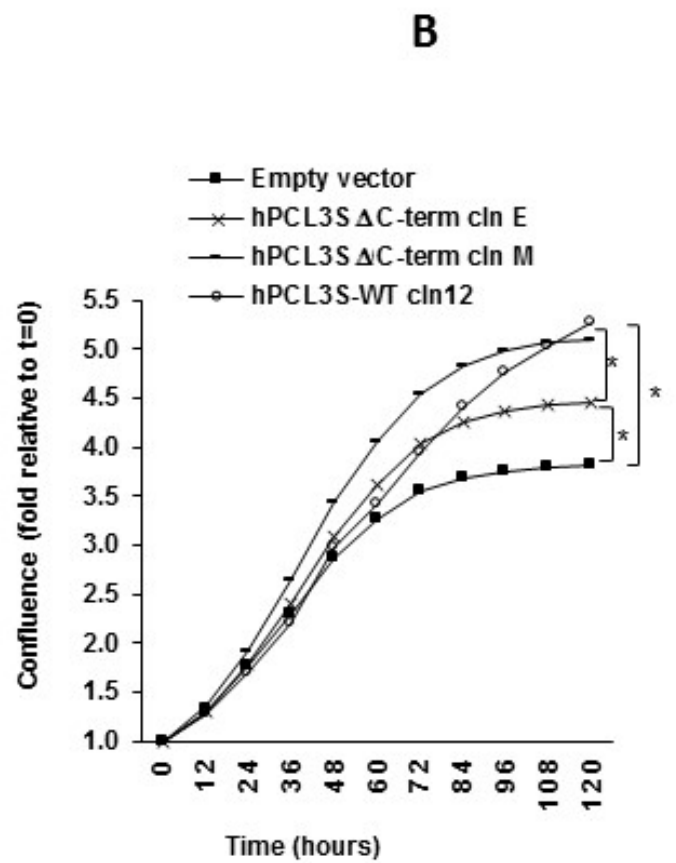
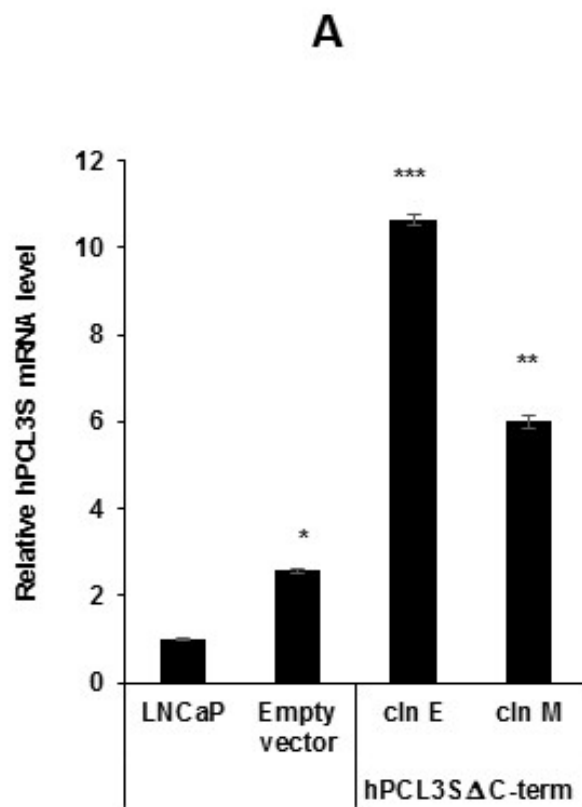
A**B****C****D****E****F**



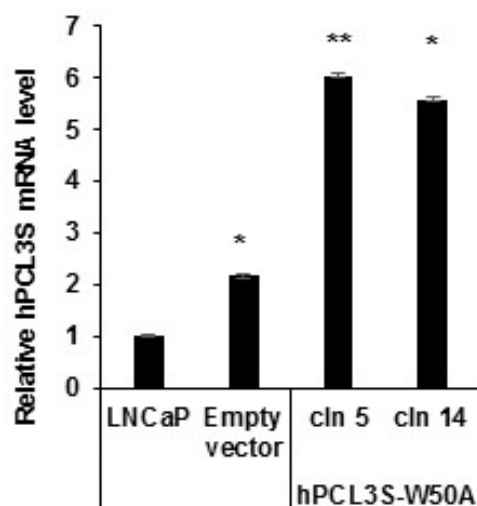
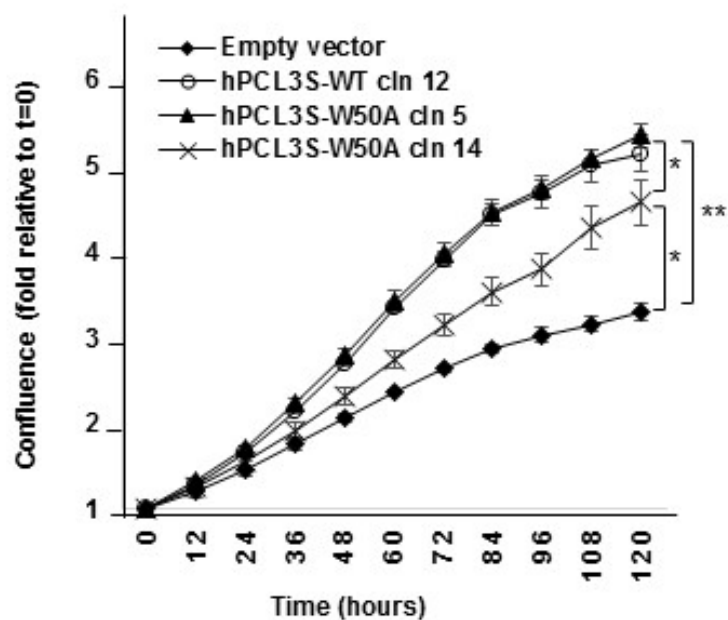
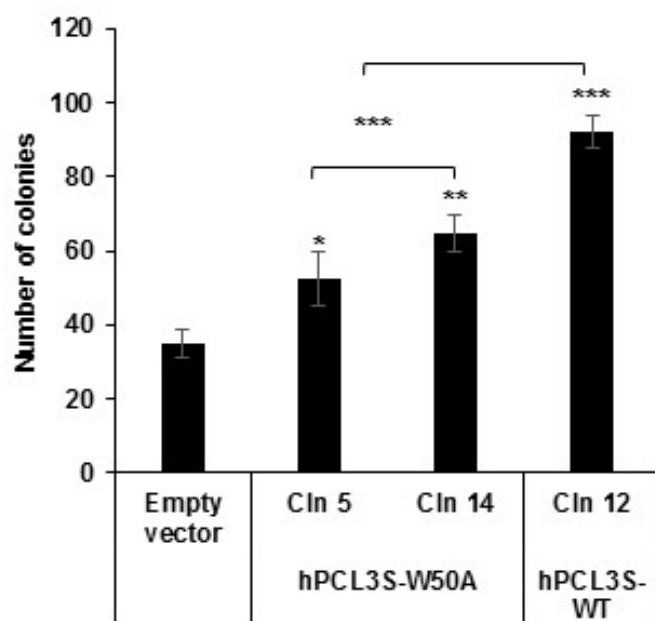
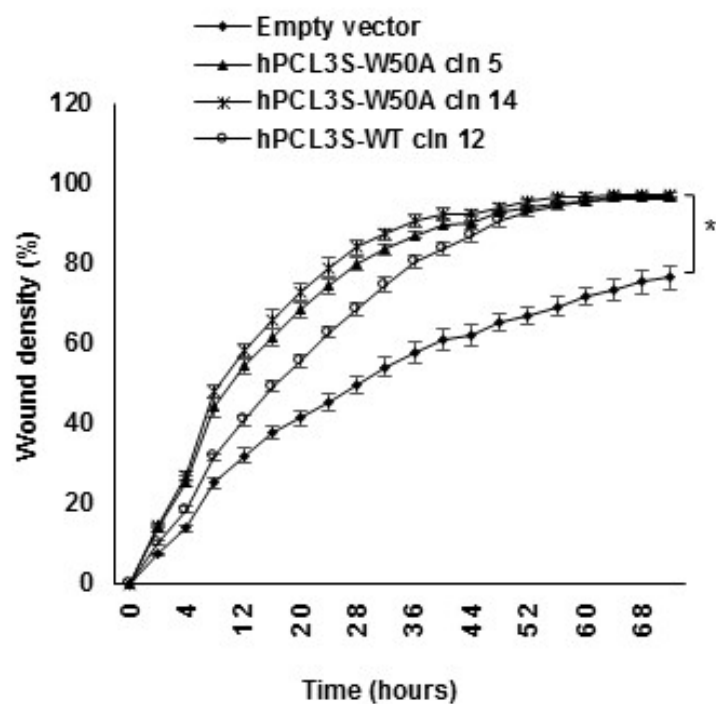
Abdelfettah et al., Figure 5

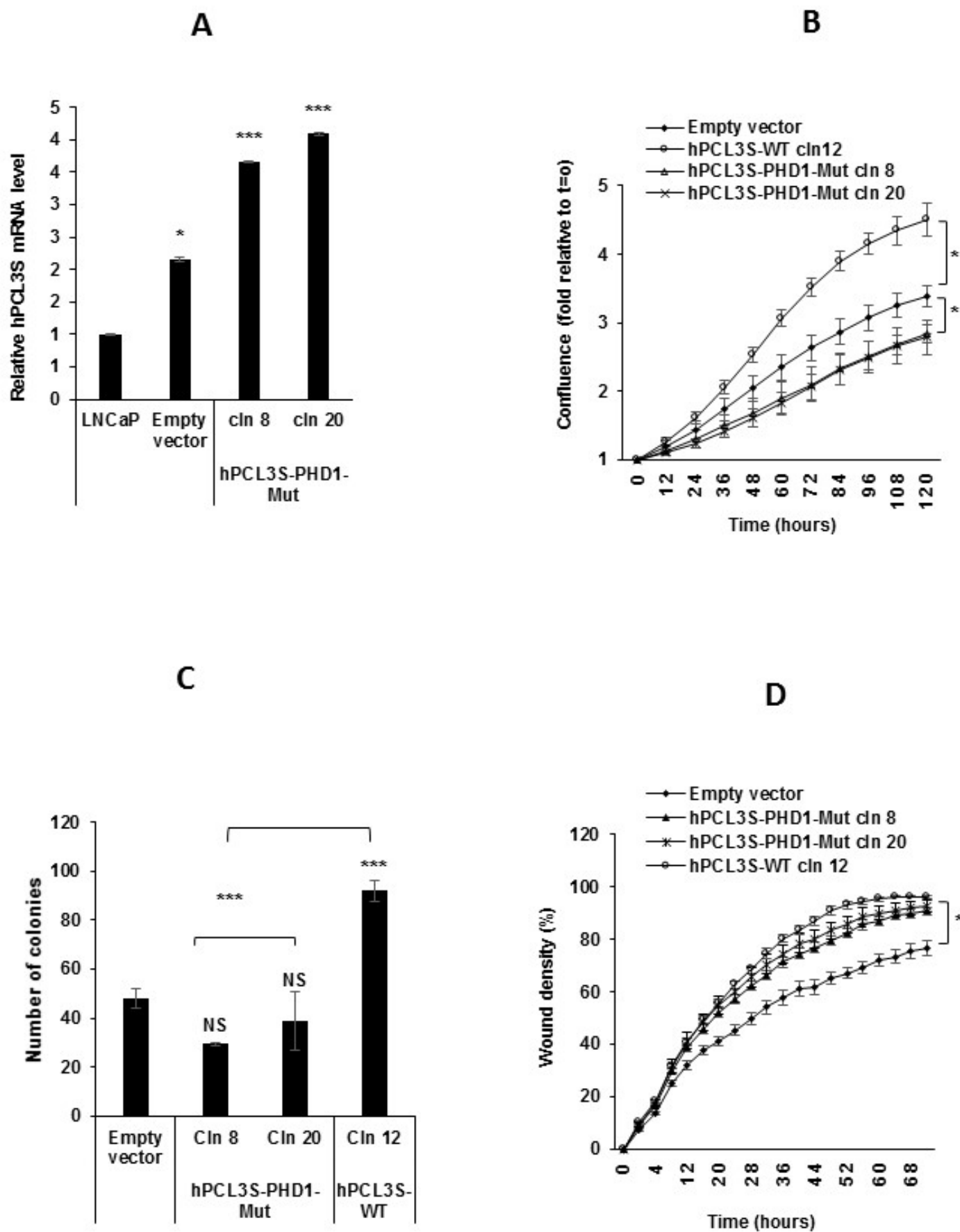


Abdelfettah et al., Figure 6

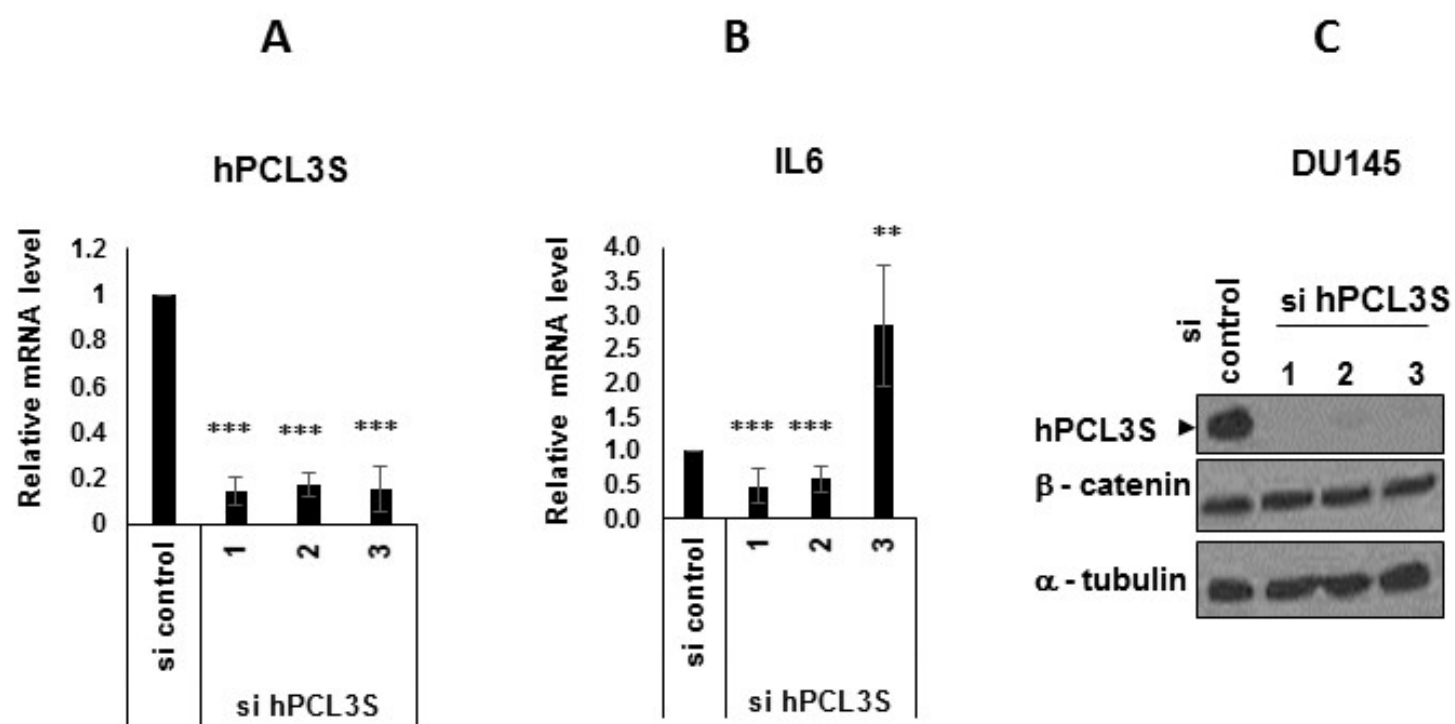


Abdelfettah et al., Figure 7

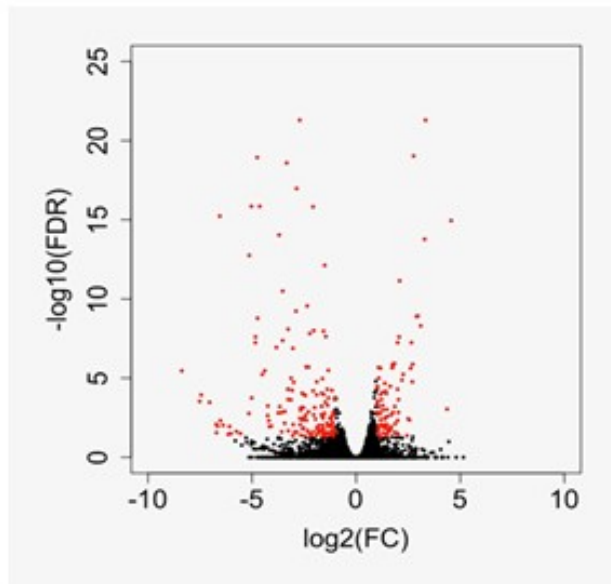
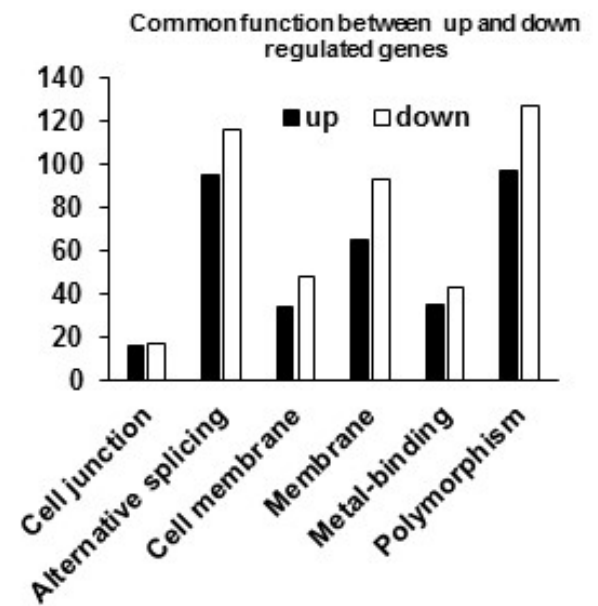
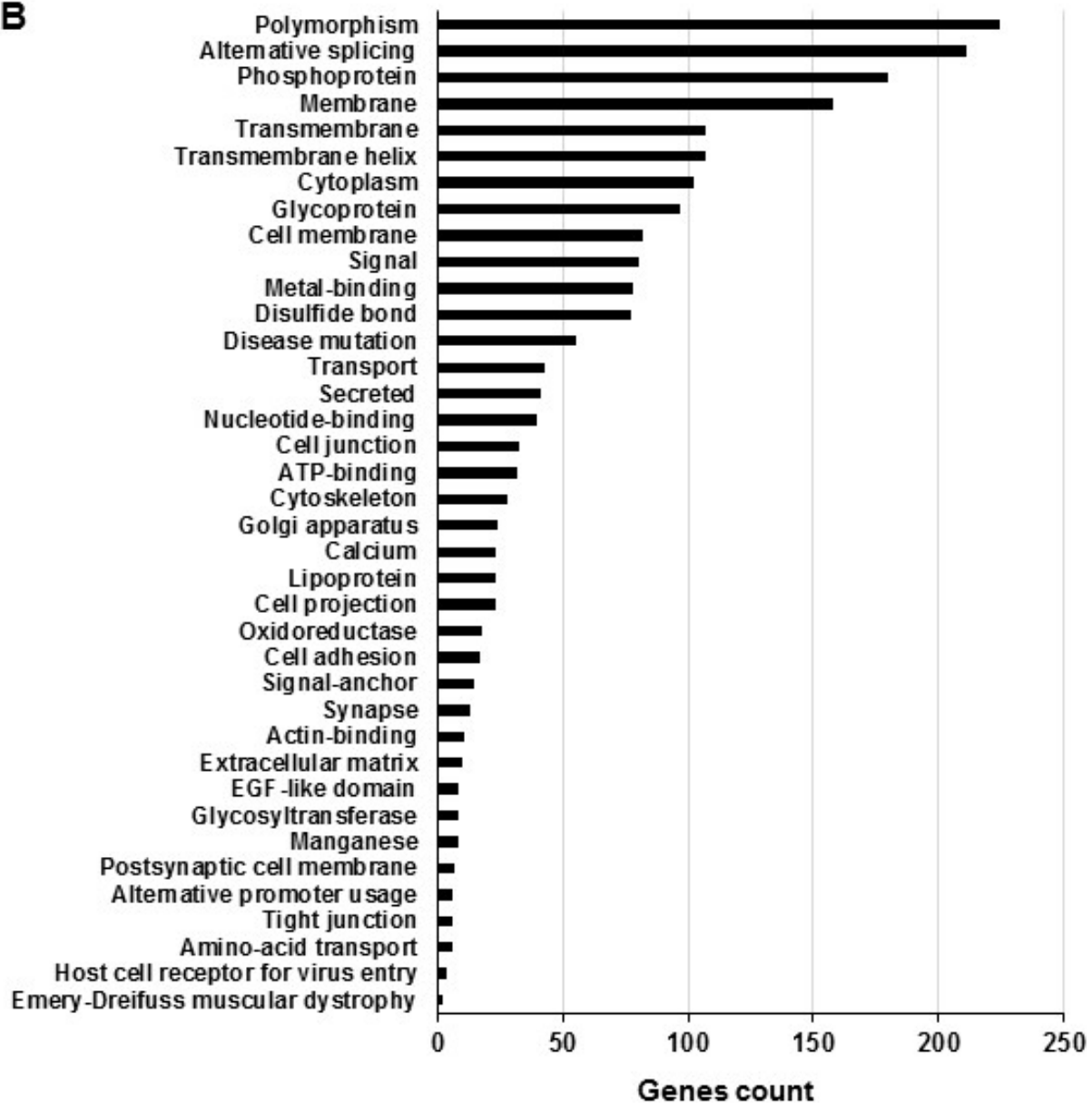
A**B****C****D**

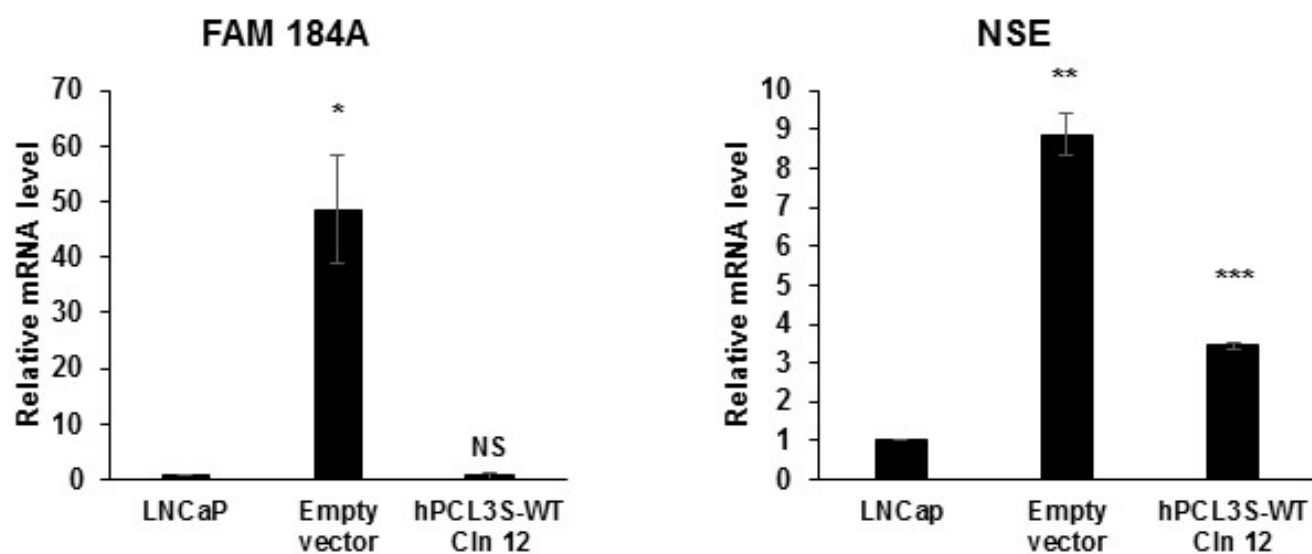
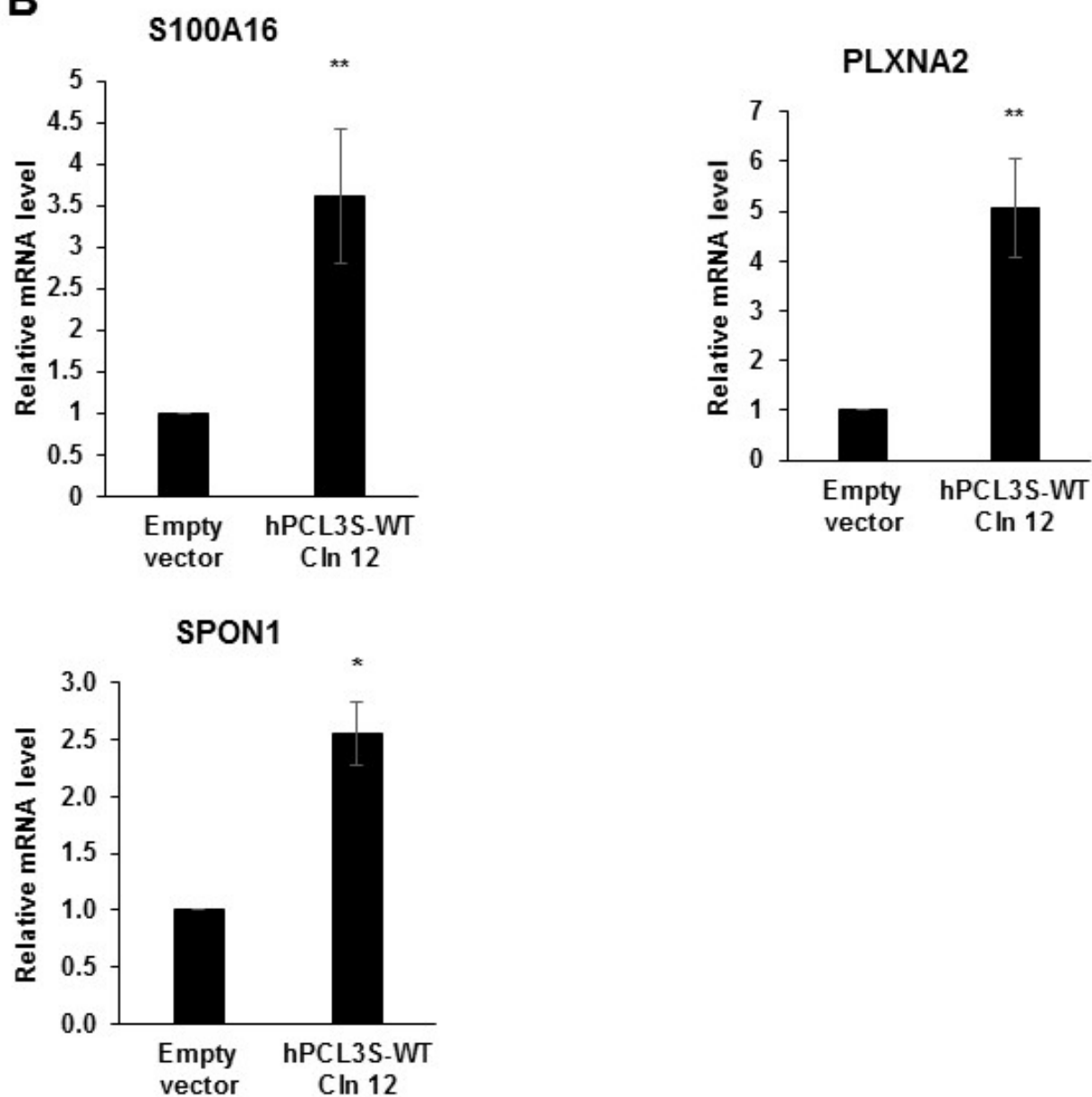


Abdelfettah et al., Figure 9

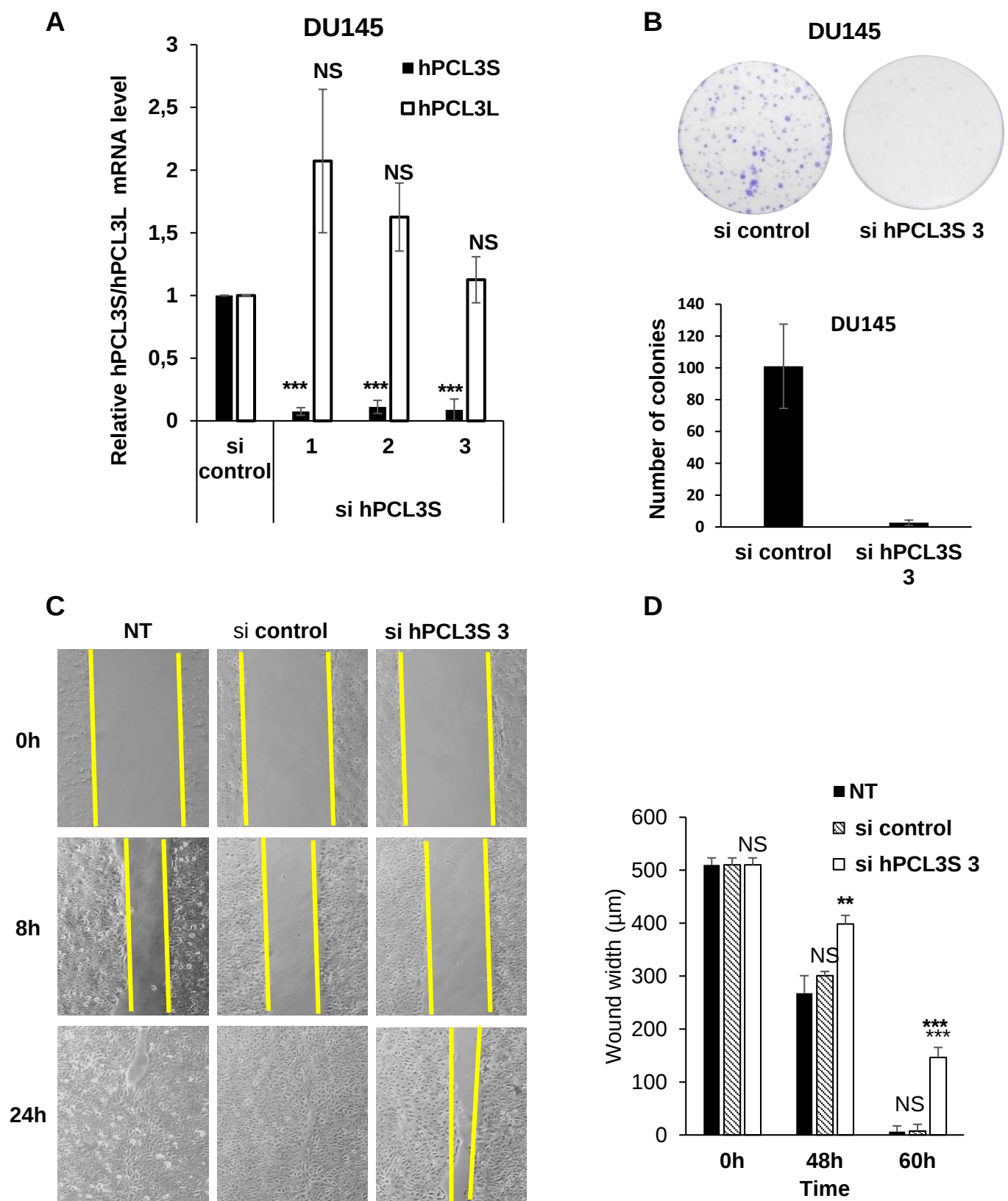


Abdelfettah et al., Figure 10

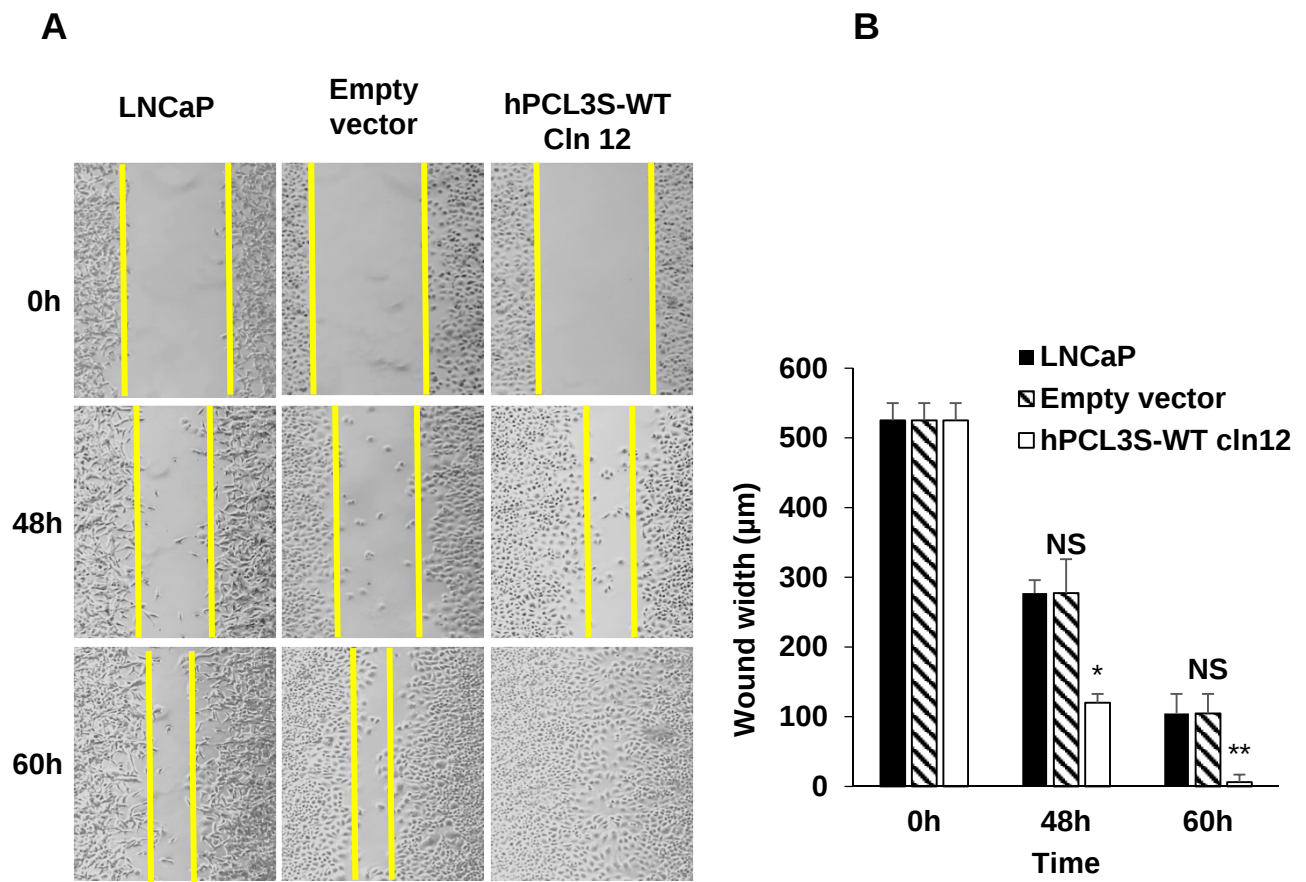
A**C****B**

A**B**

Supplementary Data



Abdelfettah et al., Supplementary Figure 1



Abdelfettah et al., Supplementary Figure 2

Annex A

Differentialy regulated genes

Tableau A.1: Differentialy regulated genes.

geneName	LNCaP control	LNCaP hPCL3S-WT clone 12	LNCaP control	LNCaP hPCL3S-WT clone 12	log2 Fold Change	padj Sample 12 Controls
RNLS	1,09565507	19,55588208	0,756153023	22,75451247	4,562201022	1,14E-15
STK32B	0,417392408	4,60138402	0	4,189719757	4,368803304	0,000913018
NOS1	8,191326001	102,3041047	11,27355417	84,87794335	3,333647446	5,10E-22
TRIM29	4,695664587	51,68888049	3,849506301	28,38896318	3,288448191	1,68E-14
MEIS2	2,556528497	17,63863874	2,887129726	26,94423223	3,099714902	4,96E-09
SLC7A7	4,956534842	38,57493603	7,355306682	53,31057208	2,967930981	1,19E-09
SHISA3	48,46969335	430,9196134	89,56976268	554,2710292	2,900307059	1,29E-09
SPON1	60,62624722	494,5720924	71,35334893	360,7493184	2,760935233	9,38E-20
ANGPTL2	5,739145606	22,93023036	6,049224187	51,07123911	2,713513258	1,32E-06
TGM2	26,71311409	229,2256139	21,92843768	72,66996682	2,698208385	1,69E-05
SLC1A3	4,747838638	21,31974596	2,26845907	21,45425462	2,657069126	5,69E-08
RTN4RL1	1,513047478	10,73656271	2,199717886	10,90771868	2,618175363	2,40E-06
FOXB1	1,200003172	8,742629637	3,230835645	15,964277	2,556284233	0,004391257
TMPRSS4	1,773917733	16,6416722	5,499294715	22,46556628	2,501045772	0,003659645
HRAT92	0,365218357	1,840553608	0,481188288	2,528279164	2,444430961	0,043077637
EHF	7,513063339	30,06237559	3,918247485	22,68227593	2,260806426	5,81E-06
PHF19	41,16532621	147,4743578	22,61584952	134,1432688	2,20384778	1,33E-05
S100A16	21,65223115	93,02464693	25,29675569	98,1694681	2,09079082	7,14E-12
CLMP	11,63481337	48,08446301	8,661389177	33,37328496	2,064698278	2,48E-08
PADI1	22,33049381	100,3868614	15,3980252	47,89283101	2,037144051	0,000227348
ENC1	27,60007296	136,8144849	52,44952335	175,462574	2,029166531	0,001468385
ACTA2	0,834784815	3,297658547	1,237341311	4,623139042	2,011006874	0,032666257
ADGRF1	17,53048112	71,47483177	13,61075442	47,38717518	1,99390581	5,71E-08

Annexe A. *Differentialy regulated genes*

ARHGAP31	5,791319657	22,47009196	10,51740114	39,5133915	1,993822157	0,00469879
SLPI	23,26962673	78,91373594	24,67808504	103,3704995	1,990224287	5,03E-05
SLC7A8	25,56528497	105,5250735	71,55957248	255,2117224	1,957914117	0,029665178
VWF	2,295658242	4,908142954	2,130976702	11,12442832	1,918827202	0,02805803
PRUNE2	4,486968383	12,88387525	7,355306682	28,53343628	1,874398715	0,007669268
TMEM45B	3,286965211	11,27339085	2,887129726	10,1853532	1,857589574	0,000620774
CYP1A1	10,17393994	29,90899613	6,736636026	28,46119973	1,844370552	1,20E-06
TINAGL1	4,643490536	23,39036877	9,555024568	24,41595307	1,820598207	0,026947683
LAD1	25,40876282	84,20532756	14,43564863	46,37586352	1,773789097	0,001468385
TJP2	17,47830707	71,85828044	24,33437912	63,49592528	1,76111824	2,12E-06
TMEM47	15,23482288	35,43065695	12,51089548	53,81622791	1,74656666	1,32E-06
ST8SIA4	5,321753198	18,71229501	6,392930107	18,20360998	1,723784195	2,21E-06
CCNA1	58,59145923	122,0133663	27,15276766	144,328622	1,695855407	0,002041631
ADAT3	1,773917733	4,678073753	1,581047231	5,634450708	1,679942681	0,011817482
ZDHHC14	1,773917733	6,28855816	2,26845907	5,85116035	1,656922601	0,016519928
MBP	4,956534842	15,7213954	5,22432998	14,51954605	1,635375345	3,28E-05
KCP	1,930439886	5,828419758	3,162094461	8,523912609	1,570616565	0,024744905
ALDH3B1	21,75657925	75,76945686	42,96323996	105,4653594	1,551249072	0,024764539
NFKBIZ	11,00872475	38,88169497	10,65488351	21,02083533	1,531212868	0,016450016
CDH16	7,460889288	24,08057637	6,874118394	15,02520189	1,5102601	0,002570392
FXYP2	1,460873427	4,831453221	2,130976702	4,69537559	1,482768584	0,046088389
ABCA12	3,23479116	7,362214431	2,887129726	8,957331894	1,475257452	0,008505264
KAZN	6,156538014	19,63257182	11,47977772	27,01646878	1,473010994	0,01434902
SGK1	34,85226604	89,19016025	22,13466123	62,12343088	1,470272696	0,000959411
EDIL3	10,53915829	25,61437104	7,973977337	23,04345866	1,452962703	9,51E-05
PLXNA2	18,36526594	31,13603187	8,867612729	39,36891841	1,430952637	0,032373849
ITGA2	53,37405414	164,1927198	53,89308821	111,5332294	1,426173781	6,88E-05
B4GALT4	42,52185154	109,5896294	28,80255607	70,3583973	1,397386744	0,003061494
ANKRD1	5,165231045	12,27035739	6,736636026	17,4812445	1,38982785	0,010569096
KIAA0513	119,3220546	334,597308	174,3276425	399,6848175	1,386580889	0,003817155
A4GALT	9,547851326	24,77078397	10,10495404	24,05477033	1,377529448	2,14E-05
RHOD	32,6609559	92,9479572	51,34966441	111,9666487	1,351566195	0,013907065
FAM89A	24,62615206	59,43454359	15,74173112	39,00773567	1,347101028	0,008682338
RAB15	99,33939304	193,9483364	136,6574737	358,726695	1,29122819	0,027706415
AHR	26,71311409	63,03896107	21,85969649	50,13216399	1,282091372	7,68E-05
PRKD1	13,35655705	28,60527066	10,24243641	26,2941033	1,27766117	0,000532229
VCAN	189,2352828	411,6704903	251,3177685	604,6921394	1,269807448	0,001049556
PAPSS2	35,37400655	85,6624325	25,15927332	53,52728172	1,263532035	0,010569096
FBXO32	10,9565507	27,99175279	12,78586021	24,7771358	1,218372998	0,000227348
GREB1L	15,49569314	29,37216799	17,87270783	43,12521888	1,184358032	0,004167434
NCOA7	47,73925663	92,87126746	46,6752639	110,7386274	1,172013625	2,33E-06
LURAP1L	9,18263297	23,08360983	13,74823679	26,14963021	1,169843179	0,048883621

CAV2	36,31313947	71,62821124	44,20058128	101,5645858	1,169309091	0,008505264
S100A4	213,7570868	473,1756567	232,2077194	482,6846106	1,163708366	0,000107598
SETBP1	22,27831976	40,95231777	19,45375506	48,54295994	1,162933391	0,004167434
LOC100506178	5,165231045	13,19063419	6,255447739	11,12442832	1,157098777	0,046574519
CYBA	45,54794649	120,0961229	63,51685396	111,0275736	1,148843718	0,001741589
SLC25A29	9,286981072	20,78291782	13,54201324	25,93292056	1,100894126	0,039214762
MBOAT1	15,49569314	28,91202959	13,74823679	30,77276925	1,090887671	0,000642483
ICAM2	35,1131363	77,456631	37,73890998	70,86405313	1,090035629	1,00E-05
BDNF	15,49569314	39,34183337	20,20990808	32,93986567	1,083716699	0,01434902
TMUB1	37,40879454	80,21746141	44,88799311	85,74478192	1,076712159	0,001510685
C19orf33	55,51319023	110,7399754	56,0928061	114,2059816	1,074825217	2,12E-06
LAMB2	193,8787734	433,7571336	294,8309379	538,9568811	1,057363272	0,018687663
TAPBPL	7,826107645	15,56801593	7,355306682	14,5917826	1,052395627	0,011695267
OIT3	6,782626625	12,34704712	5,911741819	12,85810546	1,049992679	0,023415597
RHOF	116,1916115	268,1073089	147,5873219	246,1099174	1,027704108	0,000288407
IMPA2	81,70456381	148,3179449	69,84104289	146,0622991	1,020590079	3,28E-05
FGF18	37,40879454	78,53028727	42,20708694	75,12600943	1,013212727	0,00038346
AJUBA	68,66105107	140,0354537	77,95250259	142,7394179	1,012018477	4,57E-05
SMOX	40,38271545	81,06104848	35,19548618	64,72394659	1,010512184	0,001943613
LETM2	41,00880406	76,38297473	39,66366314	77,87099824	0,998411352	5,43E-05
PTH1R	31,66964894	55,67674664	34,30185079	70,2139242	0,996418331	0,001913735
MISP	62,76538331	140,1121434	80,42718521	132,5540647	0,994121219	0,001570235
FAM129B	219,9136248	452,7761875	228,1519895	385,0207983	0,966861052	5,51E-05
SEL1L3	21,33918684	38,19148736	22,47836715	43,70311126	0,966349414	0,010745979
WARS	219,07884	396,1024744	277,0269713	529,9995492	0,964314403	0,024764539
LBH	244,5397769	430,5361648	284,9322074	545,530407	0,946099515	0,01483315
CCDC51	66,57408903	120,0194332	64,13552462	120,7795075	0,944760095	1,56E-05
PERP	135,6003585	224,1640915	108,4048471	224,150007	0,940272936	0,000659982
PDGFA	36,31313947	60,81495879	39,86988669	78,88230991	0,938654967	0,047448253
MYO10	118,9568362	231,7563751	126,0025902	212,9533421	0,924310445	8,70E-05
MOK	27,28702865	47,31756567	22,13466123	42,11390721	0,917062024	0,008996795
PRKCDBP	15,9652596	27,83837332	13,61075442	25,42726473	0,910092344	0,025005684
ALDH1A1	558,3666934	807,3128262	412,9970331	917,982046	0,891490903	0,010042114
SFN	132,2090451	271,4049674	168,553383	261,8574848	0,890730394	0,007303224
TTC7A	81,60021571	141,6459381	77,33383194	139,1998271	0,884597943	8,16E-05
MARVELD2	9,495677276	17,17850034	9,555024568	16,46993284	0,884284514	0,044904675
BAG1	51,44361425	87,96312451	38,22009827	69,41932218	0,873798539	0,040315891
C1orf106	60,31320291	123,1637123	67,2288779	100,0476183	0,871838916	0,01414525
FBN1	1536,891019	2682,300125	1531,897284	2684,960235	0,870140484	0,000168951
AP1M2	45,91316485	74,77249032	46,46904035	85,23912609	0,856105649	0,004323899
LMNA	428,7663508	775,1031381	538,8621409	896,9612107	0,853042679	0,023761782
LOC648987	17,32178492	30,522514	17,46026072	29,25580175	0,844915061	0,008743092

Annexe A. *Differentialy regulated genes*

SIVA1	34,48704769	65,10958388	34,78303908	53,38280863	0,838213513	0,007887152
WDR20	34,43487364	54,9098493	27,15276766	50,49334673	0,836841666	0,030803507
YIF1A	60,57407317	107,9024553	65,37286593	107,2712731	0,83677017	0,006575347
MGLL	191,7918113	341,1159353	181,3392432	296,4587911	0,836513697	0,001687669
TNNC1	45,7566427	69,2508295	37,46394525	73,1033861	0,836434471	0,008771183
GPX1	158,5569409	298,4764434	181,6829492	280,2778044	0,830594691	0,004254988
CYB5A	40,95663001	71,24476257	33,68318013	55,33319541	0,824411579	0,043893673
CA5B	47,11316802	80,06408194	39,93862787	67,3244623	0,82218947	0,017831062
RPL13P5	14,24351591	23,54374823	16,08543704	27,59436116	0,819202544	0,039214762
S100A6	394,6966955	702,1712014	372,7834405	591,1116685	0,816567369	0,006169976
TMEM139	50,03491487	88,73002185	55,13042952	87,11727632	0,805858511	0,038384409
PKP3	47,42621233	83,43843022	52,86197045	84,01110478	0,80393044	0,014776446
FAM207A	17,73917733	26,38126838	16,91033125	31,49513472	0,803135819	0,035198128
PROSER2	31,14790843	54,75646983	35,26422736	55,4776685	0,795881319	0,011482891
PTPRD	54,41753516	85,27898383	56,0928061	97,73604881	0,791536492	0,004254988
RNF31	40,5392376	70,1711063	49,63113481	75,34271908	0,755524059	0,026774396
DDRKG1	81,60021571	141,7993175	95,82521042	143,4617834	0,749503606	0,015587748
BRF1	28,38268372	47,54763487	32,17087409	49,62650815	0,747356651	0,017831062
SLC2A4RG	42,41750343	70,8613139	42,8257576	65,51854861	0,741661051	0,007040685
EHD1	87,28718726	154,7598825	101,1870228	146,5679549	0,741351711	0,023585344
MVP	231,4440901	389,8906059	260,9415342	395,4228612	0,737509678	0,00212388
FHL1	30,83486412	51,91894969	29,62745028	44,49771328	0,736412379	0,032666257
TRIP6	89,11327905	144,7135274	85,78899756	133,4931398	0,733040151	0,003651247
TCEB2	137,7916686	199,8534459	145,2501217	248,0603042	0,725771418	0,023632258
F11R	826,6456635	1329,723292	797,7414397	1237,917715	0,724198482	0,001316351
CLTB	50,50448133	77,84007967	44,75051075	72,16431098	0,717811673	0,025412375
WNT7A	78,3132505	133,6702058	94,93157503	136,1658921	0,703880293	0,028036845
NUBP2	32,19138945	51,99563942	32,78954474	47,74835792	0,681979576	0,038065736
SLC3A2	466,801234	693,1985026	433,5506471	687,9086421	0,68069932	0,008505264
CD9	77,79150999	116,031567	68,60370158	108,3548213	0,67899783	0,027706415
ITPK1	166,904789	269,1809651	171,0280657	244,9541327	0,669241626	0,008505264
RIPK4	148,2786528	233,1367903	168,0721947	247,4824118	0,667455922	0,013736835
KLF5	100,4872222	144,0233198	88,05745663	142,0170524	0,664206122	0,023585344
DMKN	129,2351242	177,9968718	128,0648257	211,1474284	0,660244078	0,030000393
ZNF395	156,7308491	264,1194427	179,8956784	244,4484768	0,659515327	0,047448253
SCRIB	130,2786053	214,8846337	150,0620045	206,5965259	0,65255596	0,030651083
SNTB1	110,5046399	159,1311973	104,8303055	162,7489416	0,643228624	0,011537719
ETHE1	84,00022205	127,5350271	85,44529164	124,1746252	0,634670512	0,035280933
TRIB3	401,9488886	657,9212251	461,528309	622,1733839	0,632105396	0,03012279
TTLL12	128,5568616	205,0683478	141,5380977	193,5939474	0,625823482	0,02855541
CCM2	53,53057629	78,45359753	55,95532373	82,99979311	0,624314844	0,038384409
HECTD1	334,4878407	481,2280787	344,7370375	515,9134225	0,61753762	0,013922013

IRAK1	208,6440298	310,3633521	203,5426457	292,1968348	0,61140328	0,020048934
RRP9	284,2964037	396,0257846	258,3293693	391,6665607	0,600987741	0,026242373
AKT1	112,4872539	167,873827	120,0221072	161,1597375	0,56494075	0,048971016
CNPY2	150,469963	216,5718079	158,2422054	218,4433197	0,558641262	0,04852312
TAOK1	299,7920968	186,7395015	311,2600809	203,4181179	-0,583573587	0,02891628
NPEPPS	206,0353273	137,351313	215,9847999	126,4861947	-0,613804261	0,04053464
AP2B1	545,7405731	346,0240783	598,5982298	364,5778554	-0,623599083	0,021547717
IGF2BP1	272,6615903	168,1805859	274,9647358	163,5435436	-0,6595268	0,048557891
TCAF1	71,00888336	44,48004552	75,68404352	44,35324018	-0,659602451	0,025005684
EPAS1	162,2612985	101,8439663	186,838538	109,366133	-0,660832279	0,022119486
CDK17	125,2698964	70,47786523	116,7912715	75,63166527	-0,665071237	0,015354471
MAN2A1	64,9045194	38,4982463	66,74768961	40,45246662	-0,673870034	0,023067776
ADGRL2	801,8629893	452,7761875	712,7085951	448,5167236	-0,685475185	0,016519928
BNC2	54,1566649	30,90596267	57,19266504	35,03472555	-0,691769359	0,042081968
RHOT1	36,67835783	20,09271022	33,4082154	20,80412569	-0,714408685	0,041076035
VPS13A	196,6961721	99,54327429	169,8594655	113,4113796	-0,720475752	0,027706415
TOM1L1	103,2002728	56,21357477	87,09508006	54,2496472	-0,721814231	0,048942933
ZNF287	30,78269007	16,411603	30,3836033	18,85373891	-0,730728636	0,045237159
MYCBP2	336,835673	180,2208741	382,1322415	231,1569521	-0,741809139	0,030240997
SFRP1	57,91319657	28,22182199	52,79322927	34,16788698	-0,764232824	0,025560785
NLK	25,40876282	14,18760073	25,84668516	14,66401915	-0,765188964	0,032666257
OTUD3	34,27835148	19,70926155	36,02038039	19,57610438	-0,775454641	0,016908915
LIPG	106,8524564	68,48393216	141,6068389	69,34708563	-0,785466656	0,039486293
PPARGC1A	38,19140531	20,32277942	41,45093392	23,69358759	-0,790940984	0,017209952
GALNT7	82,85239293	44,01990712	85,78899756	48,25401375	-0,806092157	0,001612372
DHX32	46,1740351	22,5467817	41,31345155	24,70489926	-0,825903912	0,007887152
DHX40	173,4265454	84,89553516	126,8274844	74,98153634	-0,846457131	0,042021451
NF1	249,3919636	150,6186369	360,2038039	173,4399506	-0,847227697	0,036764217
MPP2	25,09571851	14,72442886	29,69619146	14,37507296	-0,847704142	0,018519235
EPB41L5	127,2525103	56,06019531	124,3528018	77,07639622	-0,854918606	0,016567855
UBE2G1	91,30458919	42,71618165	70,45971354	42,47508995	-0,862687706	0,017831062
RIMKLA	50,71317754	20,32277942	39,11373366	25,78844747	-0,899776633	0,042745951
STXBP4	54,00014275	28,91202959	50,38728783	24,27147997	-0,909820808	0,011817482
GLRB	54,20883895	25,30761211	52,86197045	28,89461901	-0,918551848	0,000984299
C2orf88	33,28704452	13,26732392	23,9906732	15,60309427	-0,926944883	0,048971016
PSD3	22,48701597	11,19670111	26,74032055	13,50823439	-0,929234437	0,04053464
AASS	37,25227239	16,71836194	32,72080356	18,42031962	-0,93113213	0,003262241
MGC57346	22,69571217	10,27642431	21,65347294	11,91903034	-0,935127956	0,011004301
GJC1	159,652596	86,73608877	175,7712073	80,3992774	-0,940956859	0,001000244
DPYD	388,2271132	168,1805859	410,1099034	225,4502648	-0,956746423	0,001755855
RDH10	318,5747552	147,8578065	280,1890658	145,5566433	-0,965780938	0,000205578
B3GALT1	27,75659511	15,41463647	38,90751011	16,75887903	-0,985038063	0,021623075

Annexe A. *Differentialy regulated genes*

ITGB3	94,6959025	57,90074891	141,1256506	55,91108779	-0,986158684	0,033747382
DLX6-AS1	12,62612033	6,365247894	15,74173112	7,295891301	-0,987266531	0,035899654
SCD5	63,13060167	27,76168359	67,43510145	34,81801591	-0,996879519	0,000959411
IGSF3	98,50460822	49,61825768	141,8130625	65,01289278	-1,003408708	0,024658196
FAT1	1016,298339	437,2081716	993,4475903	517,9360458	-1,009881472	0,000167534
USP32	77,73933594	36,50431322	92,25066885	42,69179959	-1,03742474	0,000225662
SIRPA	17,53048112	9,43283724	27,90892068	11,19666487	-1,072110634	0,045019342
C1orf21	24,31310775	11,35008058	30,52108567	13,36376129	-1,084297162	0,017209952
TMTC1	29,94790525	13,19063419	26,80906174	12,20797653	-1,09769432	0,001357461
NTS	68,03496246	24,46402504	59,80483003	32,57868294	-1,101164426	0,001846047
STOX2	24,62615206	9,279457773	25,64046161	12,78586891	-1,12319094	0,006249856
CRYBG3	27,39137676	8,282491235	20,34739045	12,64139582	-1,127808996	0,041032183
SEMA4G	42,00011103	23,0069201	67,91628974	24,7771358	-1,136090829	0,01051526
FAM92A1	22,48701597	8,359180969	18,01019019	9,246278084	-1,140262356	0,00249907
AMZ2P1	7,773933594	3,757796949	8,042718521	3,106171544	-1,141418681	0,043077637
TXNIP	562,5406175	272,095175	750,3100227	289,0906632	-1,161957573	5,89E-05
OAS3	9,547851326	3,98786615	11,34229535	4,839848685	-1,175774057	0,021217843
ZFP3	8,034803849	3,527727748	10,24243641	4,189719757	-1,175902573	0,032872256
ARAP3	16,12178175	6,978765763	25,84668516	10,40206284	-1,204526689	0,035280933
TMEM52B	47,89577879	14,5710494	38,35758064	21,16530843	-1,208508598	0,003864583
PRR5L	8,504370307	3,374348281	10,17369522	4,334192852	-1,209441545	0,02694801
PDE4D	13,5130792	4,371314819	13,54201324	6,573525825	-1,240439281	0,010569096
PLEKHH2	11,16524691	5,291591623	11,96096601	4,045246662	-1,24542077	0,00878524
CCDC69	6,052189912	2,837520145	6,874118394	2,311569521	-1,263584323	0,029811003
CALCRL	16,43482605	7,668973366	18,28515493	6,14010654	-1,266291906	0,003262687
SLC43A2	15,44351909	6,518627361	15,87921349	5,417741065	-1,328960863	0,000177402
DDIT4L	35,2174844	14,41766993	41,17596918	14,5917826	-1,332028569	3,23E-06
TESC	7,930455747	2,30069201	5,705518267	2,889461901	-1,333591688	0,032373849
MOXD1	5,843493708	2,070622809	6,530412475	2,600515711	-1,338479939	0,032872256
FILIP1	14,92177858	5,828419758	20,69109637	7,512600943	-1,349885957	0,011482891
EMP2	40,69575975	15,41463647	31,96465053	11,41337451	-1,375628669	0,000522781
TUBB2B	46,48707941	17,25519007	57,12392386	20,58741605	-1,388234708	5,03E-05
GPRIN3	73,98280427	24,69409424	114,4540713	43,55863816	-1,400674568	0,007156747
ANTXR1	14,86960452	3,297658547	13,06082495	6,71799892	-1,41527657	0,025606106
LCA5	5,060882944	1,840553608	5,980483003	2,094859878	-1,420941282	0,029665178
ARAP2	88,33066828	29,98568586	99,60597553	35,46814484	-1,457435641	2,34E-08
EPHA6	5,739145606	2,224002276	7,424047866	2,311569521	-1,470244134	0,046689004
CEP85L	11,11307286	3,757796949	11,89222482	4,117483209	-1,481448604	0,000325975
MYO1D	5,686971555	2,30069201	7,217824314	2,094859878	-1,48778722	0,043077637
MMD	5,739145606	1,687174141	7,355306682	2,744988806	-1,493095095	0,027698338
FSTL1	149,3221339	46,0138402	142,0880272	51,79360458	-1,511589588	7,52E-13
MPP7	7,878281696	2,530761211	8,180200889	2,817225354	-1,521300282	0,001648924

ST6GALNAC3	7,252193084	2,377381743	4,811882876	1,589204046	-1,548413185	0,044267362
EPS8	12,36525008	4,371314819	11,68600127	3,467354282	-1,556218545	0,000107598
ARRDC4	43,04359205	13,88084179	48,66875823	15,74756736	-1,565346144	1,07E-08
PLEKHO1	43,93055091	7,592283632	39,66366314	19,43163129	-1,566051005	0,014845042
CENPV	14,76525642	4,678073753	11,96096601	3,828537019	-1,590635564	0,002768787
P3H2	10,33046209	3,527727748	6,392930107	1,805913688	-1,591547764	0,044786376
SYNPO2	22,48701597	4,448004552	21,24102584	9,318514632	-1,602939722	0,003445776
PDE9A	5,634797504	1,687174141	8,592647993	2,744988806	-1,612021043	0,026947683
PKDCC	6,260886116	1,917243342	8,523906809	2,672752259	-1,618091162	0,009313194
NSG1	19,82613937	5,291591623	22,06592005	7,729310586	-1,619730353	1,09E-05
IRF6	7,147844982	2,147312542	10,7236247	3,395117734	-1,619864873	0,019905674
TMEM171	3,286965211	1,227035739	4,674400508	1,228021308	-1,627642128	0,043881556
SLC6A17	18,52178809	4,60138402	24,19689675	8,379439514	-1,651724858	0,000592579
RASSF8	35,94792111	7,592283632	31,75842698	13,00257856	-1,653303162	8,93E-05
WASF3	19,20005075	4,371314819	21,92843768	8,090493324	-1,656624584	0,000606813
EFR3B	6,939148778	1,993933075	7,905236153	2,456042616	-1,671059288	0,002042807
SLC16A2	14,03481971	3,911176417	24,60934385	7,440364396	-1,7003895	0,018844559
ZNF516	13,304383	3,911176417	29,07752081	7,873783681	-1,779105592	0,019083486
GALNT14	6,365234218	2,530761211	7,011600762	1,155784761	-1,798643072	0,024455494
NETO2	10,7478545	2,30069201	5,705518267	2,239332973	-1,799982107	0,00955254
MAP7D2	5,373927249	0,996966538	5,293071164	1,878150236	-1,823955961	0,018519235
RELL2	5,269579147	1,150346005	3,368318013	1,155784761	-1,847581687	0,032373849
POPDC3	8,034803849	0,996966538	6,461671291	2,744988806	-1,887656372	0,013886707
TUB	17,00874061	6,211868426	27,56521476	5,27326797	-1,890130223	1,69E-05
GNAL	17,68700328	4,678073753	27,15276766	6,862472016	-1,891041651	0,000114608
NKD1	5,582623453	1,227035739	10,44865996	2,817225354	-1,916582098	0,041043511
PDE4B	8,295674103	1,687174141	11,75474245	3,250644639	-1,952747056	0,003864583
PLAU	16,90439251	3,98786615	29,5587091	7,151418206	-1,993320279	0,00071821
FAM171B	20,29570583	3,834486683	20,07242571	5,56221416	-2,037454274	9,95E-09
SRRM3	7,252193084	1,380415206	10,58614233	2,744988806	-2,042145247	0,002041631
PCDHGC4	3,026094956	1,150346005	5,155588796	0,722365475	-2,060644118	0,024831036
WNT2B	19,56526911	5,675040291	16,84159007	2,672752259	-2,064448964	6,28E-05
FZD4	74,08715237	15,261257	78,3649497	19,43163129	-2,071239981	1,50E-16
HOXB6	3,078269007	0,536828136	5,911741819	1,372494403	-2,16043858	0,041149008
KIAA1211L	9,965243734	0,766897337	12,92334258	3,900773567	-2,226790593	0,035408304
PDGFRL	20,29570583	3,527727748	24,74682622	5,634450708	-2,230372453	1,52E-08
ARNTL2	11,32176906	1,610484407	9,348801016	2,456042616	-2,281095262	2,02E-06
UPK1A-AS1	4,747838638	0,690207603	3,986988669	1,011311665	-2,295309959	0,001339658
TTC9	2,765224701	0,536828136	4,53691814	0,86683857	-2,305824312	0,022776733
TMOD2	2,504354446	0,383448668	3,780765117	0,794602023	-2,339513874	0,020739973
KIF5C	39,13053822	5,598350557	26,39661463	6,71799892	-2,349573746	2,75E-10

Annexe A. *Differentially regulated genes*

ZNF648	3,078269007	0,690207603	3,437059197	0,505655833	-2,383906161	0,004553942
DACH1	44,50446547	7,515593899	77,19634957	14,51954605	-2,399997522	1,95E-06
PMP22	4,956534842	1,150346005	7,630271418	1,083548213	-2,427224192	0,002203097
RIMS4	67,72191815	6,28855816	84,68913862	20,58741605	-2,439933426	0,000122331
LRRK2	1,878265835	0,306758935	2,887129726	0,505655833	-2,477540038	0,044786376
CP	8,973936766	1,073656271	13,61075442	2,672752259	-2,521148718	0,000107598
SESN3	18,99135455	1,533794673	30,45234449	6,645762373	-2,529742125	0,003346492
USH1C	4,539142434	0,536828136	9,692506936	1,805913688	-2,530211172	0,013907065
CNTN1	5,739145606	1,227035739	11,34229535	1,589204046	-2,530753593	0,000714111
ANKS1B	3,495661415	0,230069201	2,887129726	0,794602023	-2,567382098	0,016519928
CHRNA3	3,756531669	0,460138402	6,392930107	1,155784761	-2,576074984	0,004391257
STEAP2	7,200019033	0,766897337	9,142577464	1,805913688	-2,595791319	8,93E-05
HYDIN	3,078269007	0,536828136	4,811882876	0,650128928	-2,660273258	0,000736882
BARX2	2,086962039	0,076689734	1,306082495	0,433419285	-2,660639959	0,040217977
TMTC2	4,226098128	0,766897337	9,623765752	1,300257856	-2,671050279	0,001049556
EPB41L4A	4,017401924	0,613517869	3,024612093	0,433419285	-2,692839722	0,008682338
LYNX1	8,66089246	0,766897337	18,35389611	3,178408091	-2,706118458	0,003535924
CXCR4	54,78275351	9,586216708	58,01755925	6,934708563	-2,708861923	5,10E-22
GALNT12	2,869572803	0,536828136	12,71711903	1,516967498	-2,851595115	0,025412375
DPYSL5	63,23494977	7,515593899	48,05008758	7,151418206	-2,861411661	1,06E-17
MARCKS	18,52178809	1,840553608	11,34229535	2,022623331	-2,890256966	5,82E-10
DLGAP1	1,565221529	0,153379467	2,680906174	0,361182738	-2,963538582	0,026153242
CADPS2	11,42611716	0,613517869	13,12956613	2,311569521	-2,999082068	1,82E-05
FAM181B	2,921746854	0,306758935	7,14908313	0,86683857	-3,025411322	0,008505264
SLFN5	26,45224384	2,684140678	46,33155798	5,778923803	-3,037564391	1,31E-07
FOXF2	1,09565507	0,153379467	2,130976702	0,216709643	-3,04449633	0,045120204
CECR2	10,33046209	1,687174141	28,73381489	2,744988806	-3,071348705	5,89E-05
SLC7A2	8,973936766	0,383448668	8,455165625	1,516967498	-3,124619342	1,00E-05
FAM198A	3,756531669	0,383448668	3,024612093	0,361182738	-3,128004631	0,000234736
SUSD4	1,304351274	0,076689734	3,162094461	0,361182738	-3,260409471	0,021165112
SLC47A1	8,921762715	0,920276804	4,53691814	0,433419285	-3,261785356	4,94E-05
FAM155B	6,991322829	0,766897337	9,486283384	0,86683857	-3,265600723	8,05E-09
CALCB	3,078269007	0,153379467	3,643282749	0,505655833	-3,268721702	0,000221435
EFEMP1	6,365234218	0,306758935	7,905236153	1,083548213	-3,284842873	5,07E-05
STC1	52,01752881	4,217935351	62,14203028	6,573525825	-3,337225851	2,59E-19
RNF182	2,817398752	0,230069201	3,024612093	0,28894619	-3,424888177	0,001274476
TRIM6	2,13913609	0,230069201	2,062235518	0,144473095	-3,431766976	0,007040685
GHR	9,600025377	0,690207603	9,211318648	0,86683857	-3,528709806	3,16E-11
ARMC4	5,686971555	0,383448668	6,874118394	0,650128928	-3,529701443	4,20E-08
TMEM243	2,347832293	0,230069201	1,374823679	0,072236548	-3,580744233	0,024658196
RHOBTB3	3,23479116	0,153379467	2,337200254	0,28894619	-3,587261359	0,001483709
EDA	2,608702548	0,306758935	6,324188923	0,361182738	-3,669043952	0,000633697

SH3BGRL2	12,57394628	0,84358707	11,68600127	0,939075118	-3,702359986	9,14E-15
LINC01366	2,452180395	0,153379467	3,780765117	0,28894619	-3,740101418	0,001574797
PPP2R2C	5,530449402	0,306758935	9,967471672	0,722365475	-3,83434098	1,15E-07
FAXC	2,452180395	0,076689734	1,443564863	0,144473095	-4,07290902	0,010739205
SNAP91	1,513047478	0,306758935	5,568035899	0,072236548	-4,165895337	0,011338155
RNF217	1,669569631	0,076689734	2,61216499	0,144473095	-4,194466279	0,004972899
PARM1	3,391313313	0,153379467	2,474682622	0,144473095	-4,241491373	0,000572182
ZIC2	1,982613937	0,153379467	2,474682622	0,072236548	-4,249521334	0,002337061
MID2	5,94784181	0,076689734	11,82348364	0,722365475	-4,392219666	3,40E-06
FLRT2	4,33044623	0,076689734	4,468176956	0,28894619	-4,50544477	5,86E-06
ABCB1	91,77415565	1,45710494	45,30044022	3,828537019	-4,632127687	1,42E-16
LIN7A	6,417408269	0,076689734	8,042718521	0,433419285	-4,735452796	1,66E-09
GRB10	15,02612668	0,383448668	24,74682622	1,011311665	-4,754604845	1,16E-19
ZNF704	6,000015861	0,230069201	11,75474245	0,361182738	-4,834377768	2,48E-08
TMEM178B	7,721759543	0	5,499294715	0,433419285	-4,838593644	5,69E-08
KLHL29	2,556528497	0,076689734	5,018106428	0,144473095	-5,017346802	0,000177402
TMEM98	13,77394945	0,306758935	11,61726009	0,433419285	-5,032797178	1,42E-16
IGFBP2	9,704373479	0,460138402	14,9855781	0,216709643	-5,133426617	1,75E-13
PAPPA	1,982613937	0,076689734	3,574541565	0,072236548	-5,15190332	0,001696131
MRAP2	2,13913609	0	1,512306047	0,072236548	-5,559995637	0,03098277
SLC6A15	1,721743682	0	2,474682622	0,072236548	-5,75244292	0,023585344
MME	0,626088612	0	1,237341311	0	-6,015823413	0,03131483
VWDE	1,930439886	0,076689734	3,368318013	0	-6,082158071	0,011337997
NUDT11	0,991306968	0	1,031117759	0	-6,142709702	0,035280933
SLC35F3	1,043481019	0	1,374823679	0	-6,396907028	0,00955254
FAM110B	1,513047478	0	1,099858943	0	-6,518414667	0,004780064
MYRIP	15,13047478	0	21,24102584	0,361182738	-6,550936057	5,91E-16
FAM26F	1,565221529	0	1,306082495	0	-6,650605355	0,010560685
OPRK1	0,469566459	0	2,543423806	0	-6,709025311	0,027698338
DSEL	2,243484191	0	0,756153023	0	-6,722106878	0,008188397
ZDBF2	4,539142434	0	5,705518267	0,072236548	-7,038950562	0,000336386
DAAM2	6,208712065	0	7,355306682	0,072236548	-7,445573547	0,00011521
P2RY1	3,286965211	0	1,92475315	0	-7,515345507	0,000295806
FAM184A	12,62612033	0	13,19830732	0,072236548	-8,375465826	3,42E-06

Annex B

Clinical/Pathological characteristics of the prostate tumors

	Localisation	Age at collection	total PSA	Gleason	TNM	Morphological control				
						% Tumor	% normal tissue	% tumor necrosis	% tumor cells	% Stroma
1	Normal Tumor	63 years	8 ng/ml	3+3=6	pT2c	0 80	100 20	0 0	60	40
2	Normal Tumor	66 years	9,77 ng/ml	3+4=7	pT3a	0 90	100 10	0	70	30
3	Normal Tumor	67 years	5,4 ng/ml	3+4=7	unknown	0 80	100 20	0	40	60
4	Normal Tumor	67 years	9,65 ng/ml	4+3=7	pT2c	0 70	100 25	0	80	20
5	Normal Tumor	57 years	6,2 ng/ml	3+4=7	pT2c	0 60	100 40	0	70	30
6	Tumor	65 years	11,8 ng/ml	7 (3+4)	pT2b	100	0	0	80	20
7	Tumor	73 years	6,73 ng/ml	9 (4+5)	pT3b	80	20	0	70	30
8	Tumor	52 years	6,86 ng/ml	9 (4+5)	pT2x	80	20	0	80	20
9	Tumor	69 years	5 ng/ml	7 (3+4)	pT3a	80	20	0	80	20
10	Tumor	69 years	13,9 ng/ml	7 (3+4)	pT2c	95	5	0	80	20
11	Tumor	59 years	10,25 ng/ml	7 (4+3)	pT3b	100	0	0	80	20
12	Tumor	72 years	6,92 ng/ml	7 (4+3)	pT3a	95	5	0	80	20
13	Tumor	68 years	32,4 ng/ml	9 (4+5)	pT3b	90	10	0	90	10
14	Tumor	56 years	22,3 ng/ml	7 (4+3)	pT3a	90	10	0	90	10
15	Tumor	68 years	20 ng/ml	9 (4+5)	pT2c	90	10	0	90	10
16	Tumor	51 years	14,3 ng/ml	8 (4+4)	pT3a	80	20	0	80	20
17	Tumor	59 years	6,91 ng/ml	7 (4+3)	pT2b	95	5	0	90	10
18	Tumor	69 years	7,75 ng/ml	7 (4+3)	pT3b	80	20	0	80	20
19	Tumor	60 years	7,07 ng/ml	7 (4+3)	pT3a	95	5	0	95	5
20	Tumor	68 years	5,6 ng/ml	7 (4+3)	pT3b	70	30	0	60	40
21	Tumor	58 years	5,07 ng/ml	9 (4+5)	pT3a	90	10	0	90	10
22	Tumor	69 years	9 ng/ml	9 (4+5)	pT3a	90	10	0	80	20
23	Tumor	72 years	7 ng/ml	9 (4+5)	pT3b	90	10	0	80	20
24	Tumor	59 years	4,9 ng/ml	7 (3+4)	pT3b	80	20	0	80	20
25	Tumor	64 years	6,15 ng/ml	7	pT2a	80	20	0	80	20

Tableau B.1 – Clinical / pathological characteristics of the prostate

2

Discussion et perspectives

Sommaire

2.1	Discussion	141
2.2	Conclusion et perspectives	147

2.1 Discussion

Le recrutement du complexe PRC2 au niveau de ses gènes cibles pourrait impliquer des facteurs de transcription, des ARNs non-codants et des co-facteurs. De nombreuses études récentes qui ont caractérisé les différents sous types de complexes PRC2, ont montré que les sous unités non stoechiométrique ou dites « facultatives » qui définissent ces complexes jouent un rôle essentiel dans leur fonction et dans leur recrutement au niveau des gènes cibles.

Parmi ces co-facteurs, les trois orthologues humains de la famille Polycomb-like : PHF1, MTF2 et PCL3 participant à son recrutement et sa stabilisation pour générer le sous-type PRC2.1 [BRIEN et al. 2012; BALLARÉ et al. 2012; MIERLO et al. 2019]. Ces trois protéines présentent une organisation en modules fonctionnels très conservée : Un domaine TUDOR, impliqué dans la fixation à des modifications d’histones, suivi de deux domaines PHD (Plant Homeo Domain) [MUSSELMAN et al. 2012].

Dans leur étude caractérisant le locus humain PHF19/hPCL3, Wang et al ont identifié une protéine appelée hPCL3L de pleine longueur homologue aux orthologues PHF1 et PCL2 ainsi qu'une isoforme plus courte spécifique appelé hPCL3S. Cette isoforme est générée par le biais d'une polyadénylation alternative (APA), un mécanisme permettant à un seul gène de coder de multiples transcrits d'ARN en affectant l'expression génique de manière qualitative et/ou quantitative. En effet, le site de polyadénylation alternatif peut se trouver au niveau de la région 3' non traduite (3' UTR). Cependant, lorsque le site alternatif de polyadénylation est situé dans des introns/exons, on parle alors de CR-APA (Région Codante-APA). Ce mécanisme donne alors lieu à différentes isoformes de protéines ayant des extrémités C-terminales différentes [DI GIAMMARTINO et al. 2011 ; TIAN et MANLEY 2017]. Ces mécanismes d'APA peuvent contribuer à plusieurs types de maladies humaines dont le cancer. Une étude récente a mis en évidence inactivation généralisée de gènes suppresseurs de tumeurs par CR-APA dans des leucémies [LEE et al. 2018].

En raison d'épissage et de polyadénylation alternative, les trois quarts C-terminaux de hPCL3L (AA 155-580) sont remplacés dans le cas de hPCL3S par une courte extrémité C-terminale spécifique (AA 155-207) [WANG et al. 2004b]. A partir d'analyses bioinformatiques (BLAST) (données non présentées), nous avons constaté que cette extrémité de hPCL3S n'est conservée que 6 espèces de primates. Il s'agit d'une caractéristique de ce phénomène de polyadénylation alternative qui nécessite la présence d'un signal de polyadénylation dont la séquence et la localisation sont imposées dans des séquences introniques qui ne sont pas forcément bien conservées au cours de l'évolution. Ainsi, PCL3S n'existe pas chez la souris ni chez le rat. Par conséquent, hPCL3S comparée à hPCL3L a perdu plusieurs domaines impliqués dans l'interaction avec les composantes centrales de PRC2, à savoir : Le domaine PHD2, le « chromo-like » domaine ainsi que le domaine EH « Winged-Helix » impliqué dans le recrutement à la chromatine de PRC2 [BOULAY et al. 2010 ; LI et al. 2017 ; PERINO et al. 2018], tout en conservant le domaine TUDOR de liaison à H3K36me3 et le domaine d'interaction protéine-protéine PHD1 [BALLARÉ et al. 2012 ; BRIEN et al. 2012 ; CAI et al. 2013].

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'étude des conséquences fonctionnelles de la surexpression de l'isoforme courte de la protéine Polycomb-like hPCL3, hPCL3S, dans le cancer prostatique. Mes résultats expérimentaux m'ont permis de mettre en évidence la surexpression de hPCL3S dans les tumeurs et dans les lignées cancéreuses prostatiques hormono-indépendantes (DU145 et PC3) mais pas dans les cellules hormono-dépendantes (LNCap).

Mes résultats montrent également que la surexpression de hPCL3S peut conférer aux cellules deux propriétés essentielles à la progression du cancer de la prostate, à savoir : une croissance et une migration accrue. Les effets de la surexpression de hPCL3S observés sur la prolifération et la migration cellulaire sont indépendants du domaine TUDOR et de sa fixation à H3K36me3, mais dépendent plutôt du domaine PHD1, qui présente une grande variation entre les trois homologues humains de type Polycomb-like.

En effet, dans le cas de l'isoforme complète hPCL3L, la transfection d'une version de hPCL3L portant la mutation ponctuelle W50A dans le domaine TUDOR ne restaure pas le dépôt d'H3K27me3 dans les cellules ES inactivées pour hPCL3, contrairement à la version hPCL3L de type sauvage [BALLARÉ et al. 2012]. Dans notre étude, l'expression ectopique de ce mutant hPCL3S-W50A dans les cellules LNCaP a été en mesure d'accroître leur croissance et leur migration aussi efficacement que hPCL3S de type sauvage. Par contre, les cellules LNCaP exprimant le mutant hPCL3S avec un domaine PHD1 inactivé ont perdu leurs propriétés de la prolifération accrues, mais l'inactivation de ce domaine n'a pas aboli l'effet sur la migration comparé à hPCL3S sauvage. Ainsi, mes résultats soulignent plutôt un rôle important joué par le domaine PHD1. Ce dernier est très divergent entre les trois orthologues de PCL humain [BRIEN et al. 2015], ce qui suggère fortement que ce domaine pourrait être impliqué dans des fonctions spécifiques à chaque orthologue.

Les deux isoformes de hPCL3, et en particulier l'isoforme courte, hPCL3S, sont nettement surexprimées dans de nombreux types de cancers, y compris les cancers du

côlon, de la peau, du poumon, du rectum, de l'utérus et du foie ainsi que dans les lignées de cellules de mélanome et de gliome [WANG et al. 2004b].

Bien que des études récentes ont déjà commencé à décrypter les mécanismes impliquant hPCL3L et hPCL3S dans le cancer, dont les glioblastomes [DENG et al. 2018], les carcinomes hépatocellulaires [CAI et al. 2018] et les myélomes multiples [REN et al. 2019], il existe peu d'études discriminant les mécanismes d'action d'hPCL3S et d'hPCL3L dans les cancers. Cependant, les données actuelles semblent dessiner deux mécanismes différents pour hPCL3L et hPCL3S.

En effet, la surexpression de hPCL3L est corrélée avec une suractivation de PRC2 et donc à une augmentation du dépôt d'H3K27me3 [REN et al. 2019], alors que hPCL3S semble clairement impliqué dans des mécanismes indépendants de PRC2. Dans les gliomes, Deng et al. ont rapporté que hPCL3L est surexprimé et favorise ainsi la prolifération et la migration des lignées cellulaires de glioblastomes par la répression directe du promoteur de SIAH, une E3-ubiquitine ligase de la β -caténine et donc l'activation de Voie Wnt/ β -caténine. Cependant, la contribution potentielle du hPCL3S ne peut être écartée vu qu'elle est exprimée de manière concomitante avec hPCL3L dans plusieurs lignées cellulaires de glioblastome. De plus, l'anticorps (N-terminal) et les shRNA qu'utilisent ces auteurs ciblent l'isoforme courte et l'isoforme longue d'hPCL3.

Dans une étude récente, hPCL3L a été clairement identifié comme un médiateur crucial de l'oncogenèse dans le myélome multiple par le biais d'un mécanisme PRC2 dépendant. Cette étude a démontré que cet effet est indépendant de l'isoforme courte hPCL3S mais repose sur l'interaction de hPCL3L avec les composants du PRC2 pour faciliter la formation de vastes domaines génomiques contenant H3K27me3, éventuellement en favorisant le recrutement initial du PRC2 et la propagation ultérieure d'H3K27me3 [REN et al. 2019].

Une autre étude récente a démontré que l'hPCL3S est surexprimée dans des échantillons de carcinomes hépatocellulaires (HCC) et qu'elle favorise la croissance et la migration des cellules HCC in vitro et vivo. Ces effets semblent totalement indépen-

dants des complexes PRC2 mais reposent sur l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. En effet, l'isoforme hPCL3S cytoplasmique interagit directement avec les composantes cytoplasmiques du complexe de dégradation de la β -caténine, notamment β -Trp, la E3-ligase de la β -caténine. Ainsi, la surexpression d'hPCL3S inhibe la dégradation de la β -caténine, activant ainsi la transcription des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine, dont IL6, un facteur bien caractérisé du CHC [CAI et al. 2018]. Cependant, cette étude n'a pas caractérisé le(s) domaine(s) d'hPCL3S impliqué(s) dans ces interactions.

Mon étude présente plusieurs similitudes avec l'étude publiée sur le HCC. En effet, nous avons démontré que hPCL3S régulaient positivement les propriétés de prolifération et de migration des cellules DU145 et PC3 et que ces effets étaient également indépendants de l'activité de PRC2, comme le montre le mutant ponctuel TUDOR-W50A incapable de lier H3K36me3 et qui se comporte comme un hPCL3S de type sauvage. De plus, nous avons observé une diminution de l'expression de l'IL6 dans les cellules DU145 dans le cas de siARN hPCL3S numéro 1 et 2, tandis que le si RNA numéro 3 semble présenter un effet « off target » sur IL6. Cependant, nous n'avons détecté aucune variation significative des niveaux de β -caténine lors de l'inactivation du hPCL3S dans les cellules DU145, ni d'interaction avec la β -caténine ou la E3-Trp ligase en transfection de transitoire (résultats non montrés). Ainsi, alors que hPCL3S semble être impliqué d'une manière ou d'une autre dans la régulation de l'expression de l'IL6, le mécanisme lui semble être indépendant de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules cancéreuses de la prostate. Ainsi, les effets de la surexpression de hPCL3S pourraient donc impliquer une autre voie de signalisation spécifique à ce type cellulaire. Il serait donc intéressant d'identifier des protéines interagissant spécifiquement avec le domaine PHD1 de hPCL3 à l'aide de nos clones stables LNCaP hPCL3S-WT.

L'acquisition d'une résistance à une thérapie ciblée sur les AR, principalement par la transdifférenciation neuroendocrine, est un problème clinique majeur pour le cancer de la prostate [WATSON et al. 2015]. Alors que les cellules LNCaP exprimant AR et PSA sont similaires aux adénocarcinomes de la prostate sensibles à l'hormonothéra-

pie, les cellules PC3 n'exprimant pas AR et PSA mais exprimant certains marqueurs neuroendocriniens (NE) sont caractéristiques des carcinomes neuroendocriniens de la prostate à petites cellules (SCNC), qui constituent des tumeurs agressives résistantes à l'hormonothérapie [TAI et al. 2011]. Ces deux lignées cellulaires pourraient ainsi être considérées comme des modèles de transdifférenciation neuroendocrine au cours de la progression tumorale dans le cancer de la prostate [TERRY et BELTRAN 2014].

Les cellules LNCaP sont connues pour être très hétérogènes et contenir des cellules exprimant des niveaux élevés ou faible d'AR et du PSA (PSA^{-lo}) [RYCAJ et al. 2016]. En effet, dans nos cultures cellulaires de LNCaP parentales il y avait deux types de cellules morphologiquement différentes alors que tous les clones issus de notre transfection avec la lipofectamine suivie de la sélection à la puromycine sont morphologiquement homogènes avec une population de petites cellules. De plus, les niveaux d'expression élevés d'AR et du PSA dans les cellules LNCaP parentales sont considérablement réduits dans les contrôles transfectés avec le vecteur vide et quasiment indétectables dans les différents mutants d'hPCL3S. Cette population du PSA^{-lo} exprime des niveaux élevés de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH1A1) qui est considéré comme un marqueur de cellules souches [TOMITA et al. 2016].

Enfin, dans cette étude, nous avons démontré que hPCL3S est surexprimé dans les cellules hormono-indépendantes (DU145 et PC3), mais pas dans la lignée cellulaire hormono-dépendante, LNCaP. De plus, la transfection stable de hPCL3S entraîne l'émergence de clones stables LNCaP ayant acquis certaines caractéristiques de la lignée cellulaire PC3, à savoir un potentiel de prolifération et de migration plus élevé, une perte d'expression d'AR et de PSA, ainsi qu'une faible expression de marqueurs neuroendocriniens tels que NSE et FAM184A. En perspective, il serait attrayant de comprendre à quel point et par le biais de quel mécanisme la surexpression d'hPCL3S est impliquée dans ce processus de neurodifférenciation.

2.2 Conclusion et perspectives

Le cancer de la prostate est une maladie multifactorielle complexe causée par une série d'altérations génétiques et épigénétiques. En dépit des progrès récents significatifs, le cancer de la prostate reste la principale cause de décès par cancer, du fait de la résistance inévitable au cours du traitement conventionnel de privation androgénique (ADT), principalement par transdifférenciation neuroendocrine, aboutissant finalement à des tumeurs métastatiques résistant à la castration. Ces mécanismes sont encore mal compris et constituent donc un vaste domaine d'étude.

Les résultats que j'ai déjà obtenus au cours de mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence une surexpression de hPCL3S dans les tumeurs prostatiques et dans les lignées prostatiques DU145 et PC3. Cette surexpression favorise la prolifération et la migration des cellules prostatiques LNCaP, alors que l'inactivation de hPCL3S endogène dans les lignées cancéreuses prostatiques DU145 et PC3 réduit ces propriétés. De plus, nos résultats suggèrent que hPCL3S n'agit pas par perturbation de l'activité de PRC2 selon un modèle de « dominant-négatif » qui paraissait hautement probable de part la structure de la protéine hPCL3S, mais principalement par des effets indépendants de la chromatine reposant sur son domaine PHD1. Nos études ont donc montré que la surexpression de hPCL3S contribue à la progression tumorale prostatique par l'émergence d'une population cellulaire ayant acquis des propriétés de prolifération accrues.

En perspective et pour une meilleure compréhension de l'implication de la surexpression de hPCL3S dans le cancer de la prostate, il serait donc intéressant dans un premier temps de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus tumorigénique en identifiant par des analyses de protéomique les partenaires spécifiques du domaine PHD1 de hPCL3S. Puis, dans un second temps d'identifier les réseaux de signalisation perturbés par la surexpression de hPCL3S, notamment, ceux qui agissent sur l'expression de l'IL6.

Bibliographie

- ABED, Jumana Alhaj et al. (déc. 2018). “De novo recruitment of Polycomb-group proteins in *Drosophila* embryos”. en. In : *Development* 145.23, dev165027.
- AHMED, Muhammed et Long-Cheng Li (2013). “Adaptation and clonal selection models of castration-resistant prostate cancer : Current perspective”. en. In : *International Journal of Urology* 20.4, p. 362-371.
- ANTONESCU, Cristina R. et al. (2014). “Novel ZC3H7B-BCOR, MEAF6-PHF1, and EPC1-PHF1 fusions in ossifying fibromyxoid tumors—molecular characterization shows genetic overlap with endometrial stromal sarcoma”. en. In : *Genes, Chromosomes and Cancer* 53.2, p. 183-193.
- ARKOV, Alexey L. et al. (oct. 2006). “The role of Tudor domains in germline development and polar granule architecture”. en. In : *Development* 133.20, p. 4053-4062.
- BAJUSZ, Izabella et al. (mar. 2018). “From Flies to Mice : The Emerging Role of Non-Canonical PRC1 Members in Mammalian Development”. en. In : *Epigenomes* 2.1, p. 4.
- BALLARÉ, Cecilia et al. (déc. 2012). “Phf19 links methylated Lys36 of histone H3 to regulation of Polycomb activity”. eng. In : *Nature Structural & Molecular Biology* 19.12, p. 1257-1265.
- BOGDANOVIĆ, Ozren et Ryan LISTER (oct. 2017). “DNA methylation and the preservation of cell identity”. In : *Current Opinion in Genetics & Development*. Cell reprogramming 46, p. 9-14.
- BOOM, Vincent van den et al. (sept. 2016). “The role of polycomb group proteins and KDM2B in leukemia”. English. In : *Experimental Hematology* 44.9, S104-S105.

- BOULAY, Gaylor et al. (2010). "Functional characterization of hPCL3 (human Polycomb-like 3) isoforms identifies them as components of distinct EZH2 protein complexes". en. In : p. 25.
- BRIEN, Gerard L. et Adrian P. BRACKEN (déc. 2015). "The PCL1-p53 axis promotes cellular quiescence". In : *Cell Cycle* 15.3, p. 305-306.
- BRIEN, Gerard L. et al. (déc. 2012). "Polycomb PHF19 binds H3K36me3 and recruits PRC2 and demethylase NO66 to embryonic stem cell genes during differentiation". en. In : *Nature Structural & Molecular Biology* 19.12, p. 1273-1281.
- BRIEN, Gerard L. et al. (jan. 2015). "A chromatin-independent role of Polycomb-like 1 to stabilize p53 and promote cellular quiescence". en. In : *Genes & Development* 29.21, p. 2231-2243.
- BURCHARDT TATJANA et al. (nov. 1999). "Transdifferentiation of prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in vitro and in vivo". In : *Journal of Urology* 162, p. 1800-1805.
- CAI, Ling et al. (fév. 2013). "An H3K36 methylation engaging Tudor motif of polycomb-like proteins mediates PRC2 complex targeting". In : *Molecular cell* 49.3, p. 571-582.
- CAI, Zhen et al. (mai 2018). "hPCL3s Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis by Activating β -Catenin Signaling". en. In : *Cancer Research* 78.10, p. 2536-2549.
- CAO, Jian et Qin YAN (mar. 2012). "Histone Ubiquitination and Deubiquitination in Transcription, DNA Damage Response, and Cancer". In : *Frontiers in Oncology* 2.
- CAPILI, Allan D. et al. (jan. 2001). "Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor : structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains". In : *The EMBO Journal* 20.1-2, p. 165-177.
- CASANOVA, Miguel et al. (avr. 2011). "Polycomblike 2 facilitates the recruitment of PRC2 Polycomb group complexes to the inactive X chromosome and to target loci in embryonic stem cells". In : *Development (Cambridge, England)* 138.8, p. 1471-1482.
- CHANDRASEKAR, Thenappan et al. (juin 2015). "Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC)". In : *Translational Andrology and Urology* 4.3, p. 365-380.

- CHENG, Liang et al. (jan. 2012). "Staging of prostate cancer". eng. In : *Histopathology* 60.1, p. 87-117.
- CHOI, Jeongyoon et al. (déc. 2017). "DNA binding by PHF1 prolongs PRC2 residence time on chromatin and thereby promotes H3K27 methylation". eng. In : *Nature Structural & Molecular Biology* 24.12, p. 1039-1047.
- COMSTOCK, Clay E.S. et al. (sept. 2009). "Cyclin D1 splice variants : polymorphism, risk, and isoform specific regulation in prostate cancer". In : *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15.17, p. 5338-5349.
- CONNELLY, Katelyn E. et Emily C. DYKHUIZEN (fév. 2017). "Compositional and functional diversity of canonical PRC1 complexes in mammals". In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1860.2, p. 233-245.
- COOPER, Sarah et al. (2016). "Jard1 binds mono-ubiquitylated H2A lysine 119 to mediate crosstalk between Polycomb complexes PRC1 and PRC2". eng. In : *Nature Communications* 7, p. 13661.
- CRAWFORD, E. David et al. (mar. 2019). "Androgen-targeted therapy in men with prostate cancer : evolving practice and future considerations". en. In : *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 22.1, p. 24-38.
- CUDDAPAH, Suresh et al. (mai 2012). "A Novel Human Polycomb Binding Site Acts As a Functional Polycomb Response Element in Drosophila". In : *PLoS ONE* 7.5.
- CURINHA, Ana et al. (oct. 2014). "Implications of polyadenylation in health and disease". In : *Nucleus* 5.6, p. 508-519.
- DAI, Charles et al. (jan. 2017). "Androgen Signaling in Prostate Cancer". en. In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7.9, a030452.
- D'AMICO, A. V. et al. (sept. 1998). "Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer". eng. In : *JAMA* 280.11, p. 969-974.
- DENG, Qing et al. (oct. 2018). "PHF19 promotes the proliferation, migration, and chemosensitivity of glioblastoma to doxorubicin through modulation of the SIAH1/ β -catenin axis". en. In : *Cell Death & Disease* 9.11, p. 1-13.

- DEPLUS, Rachel et al. (déc. 2016). "TMPRSS2-ERG fusion promotes prostate cancer metastases in bone". In : *Oncotarget* 8.7, p. 11827-11840.
- DI GIAMMARTINO, Dafne Campigli et al. (sept. 2011). "Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation". In : *Molecular cell* 43.6, p. 853-866.
- DICKSON, Brendan C. et al. (2018). "Novel EPC1 gene fusions in endometrial stromal sarcoma". eng. In : *Genes, Chromosomes & Cancer* 57.11, p. 598-603.
- DILLON, Shane C et al. (2005). "The SET-domain protein superfamily : protein lysine methyltransferases". en. In : *Genome Biology*, p. 10.
- DUNCAN, Ian McKenzie (sept. 1982). "Polycomblike : A Gene That Appears to Be Required for the Normal Expression of the Bithorax and Antennapedia Gene Complexes of DROSOPHILA MELANOGASTER". In : *Genetics* 102.1, p. 49-70.
- EL-HAKIM, Assaad et Sabri MOUSSA (avr. 2010). "CUA guidelines on prostate biopsy methodology". In : *Canadian Urological Association Journal* 4.2, p. 89-94.
- EPSTEIN, Jonathan I. et al. (fév. 2016). "The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma : Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System". eng. In : *The American Journal of Surgical Pathology* 40.2, p. 244-252.
- ERCEG, Jelena et al. (mar. 2017). "Dual functionality of *cis* -regulatory elements as developmental enhancers and Polycomb response elements". en. In : *Genes & Development* 31.6, p. 590-602.
- FRIBERG, Anders et al. (2010). "Structure of an atypical Tudor domain in the Drosophila Polycomblike protein". en. In : *Protein Science* 19.10, p. 1906-1916.
- FUJITA, Kazutoshi et Norio NONOMURA (sept. 2019). "Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer : A Review". English. In : *The World Journal of Men's Health* 37.3, p. 288-295.
- FUKS, François (oct. 2005). "DNA methylation and histone modifications : teaming up to silence genes". In : *Current Opinion in Genetics & Development*. Differentiation and gene regulation 15.5, p. 490-495.

- GAN, Lu et al. (mar. 2018). "Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2 : from biological insights to therapeutic potential". In : *Biomarker Research* 6.
- GRAHAM, Rondell et al. (nov. 2013). "PHF1 Rearrangements in Ossifying Fibromyxoid Tumors of Soft Parts : A Fluorescence In Situ Hybridization Study of 41 Cases With Emphasis on the Malignant Variant". ENGLISH. In : *The American Journal of Surgical Pathology* 37.11, p. 1751-1755.
- GRUBB, Brenda (juin 2006). "Developmental Biology, Eighth Edition. Scott F. Gilbert, editor." In : *Integrative and Comparative Biology* 46.
- GRUBER, Andreas J. et Mihaela ZAVOLAN (juil. 2019). "Alternative cleavage and polyadenylation in health and disease". en. In : *Nature Reviews Genetics*, p. 1-16.
- HANSON, Robin D. et al. (déc. 1999). "Mammalian Trithorax and Polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96.25, p. 14372-14377.
- HEALY, Evan et al. (sept. 2019). "PRC2.1 and PRC2.2 Synergize to Coordinate H3K27 Trimethylation". In : *Molecular Cell*.
- HOLOCH, Daniel et Raphaël MARGUERON (juil. 2017). "Mechanisms Regulating PRC2 Recruitment and Enzymatic Activity". English. In : *Trends in Biochemical Sciences* 42.7, p. 531-542.
- HONG, Zehui et al. (mai 2008). "A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA double-strand breaks in human cell". en. In : *Nucleic Acids Research* 36.9, p. 2939-2947.
- HUGGINS, Charles et Clarence V. HODGES (avr. 1941). "Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate". en. In : *Cancer Research* 1.4, p. 293-297.
- HUNKAPILLER, Julie et al. (mar. 2012). "Polycomb-Like 3 Promotes Polycomb Repressive Complex 2 Binding to CpG Islands and Embryonic Stem Cell Self-Renewal". en. In : *PLOS Genetics* 8.3, e1002576.

- JAENSCH, Elizabeth S. et al. (jan. 2017). "Multitasking by Polycomb response elements". en. In : *Genes & Development* 31.11, p. 1069-1072.
- KAHN, Tatyana G. et al. (juil. 2014). "Combinatorial Interactions Are Required for the Efficient Recruitment of Pho Repressive Complex (PhoRC) to Polycomb Response Elements". In : *PLoS Genetics* 10.7.
- KAHN, Tatyana G. et al. (déc. 2016). "Interdependence of PRC1 and PRC2 for recruitment to Polycomb Response Elements". In : *Nucleic Acids Research* 44.21, p. 10132-10149.
- KASSIS, Judith A. et J. Lesley BROWN (2013). "Polycomb group response elements in Drosophila and vertebrates". eng. In : *Advances in Genetics* 81, p. 83-118.
- KASSIS, Judith A. et al. (août 2017). "Polycomb and Trithorax Group Genes in Drosophila". en. In : *Genetics* 206.4, p. 1699-1725.
- KIM, Eunhee et al. (juin 2013). "Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells". eng. In : *Cancer Cell* 23.6, p. 839-852.
- KIM, Kimberly H. et Charles W. M. ROBERTS (fév. 2016). "Targeting EZH2 in cancer". In : *Nature medicine* 22.2, p. 128-134.
- KOHAAR, Indu et al. (avr. 2019). "A Rich Array of Prostate Cancer Molecular Biomarkers : Opportunities and Challenges". en. In : *International Journal of Molecular Sciences* 20.8, p. 1813.
- La classification TNM des cancers de la prostate* (sept. 2015). fr-FR.
- LAUGESSEN, Anne et al. (avr. 2019). "Molecular Mechanisms Directing PRC2 Recruitment and H3K27 Methylation". English. In : *Molecular Cell* 74.1, p. 8-18.
- LE FAOU, Perrine et al. (avr. 2011). "The zebrafish genes encoding the Polycomb repressive complex (PRC) 1". In : *Gene* 475.1, p. 10-21.
- LEE, Shih-Han et al. (sept. 2018). "Widespread intronic polyadenylation inactivates tumour suppressor genes in leukaemia". en. In : *Nature* 561.7721, p. 127-131.
- LI, Haojie et al. (2017). "Polycomb-like proteins link the PRC2 complex to CpG islands". eng. In : *Nature* 549.7671, p. 287-291.

- LI, Xiangzhi et al. (jan. 2011). "Mammalian Polycomb-Like Pcl2/Mtf2 Is a Novel Regulatory Component of PRC2 That Can Differentially Modulate Polycomb Activity both at the Hox Gene Cluster and at Cdkn2a Genes". en. In : *Molecular and Cellular Biology* 31.2, p. 351-364.
- LIEFKE, Robert et Yang SHI (avr. 2015). "The PRC2-associated factor C17orf96 is a novel CpG island regulator in mouse ES cells". In : *Cell Discovery* 1, p. 15008.
- LIU, Ruiqiong et al. (juil. 2018a). "PHD finger protein 1 (PHF1) is a novel reader for histone H4R3 symmetric dimethylation and coordinates with PRMT5-WDR77/CRL4B complex to promote tumorigenesis". In : *Nucleic Acids Research* 46.13, p. 6608-6626.
- (juil. 2018b). "PHD finger protein 1 (PHF1) is a novel reader for histone H4R3 symmetric dimethylation and coordinates with PRMT5-WDR77/CRL4B complex to promote tumorigenesis". en. In : *Nucleic Acids Research* 46.13, p. 6608-6626.
- LU, Rui et Gang Greg WANG (nov. 2013). "Tudor : a versatile family of histone methylation 'readers'". In : *Trends in biochemical sciences* 38.11.
- LYNCH, Henry T. et al. (2016). "Screening for familial and hereditary prostate cancer". en. In : *International Journal of Cancer* 138.11, p. 2579-2591.
- MARGUERON, Raphael et al. (oct. 2009). "Role of the polycomb protein Eed in the propagation of repressive histone marks". In : *Nature* 461.7265, p. 762-767.
- MERINI, Wiam et Myriam CALONJE (juil. 2015). "PRC1 is taking the lead in PcG repression". eng. In : *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 83.1, p. 110-120.
- MICCI, Francesca et al. (jan. 2006). "Consistent rearrangement of chromosomal band 6p21 with generation of fusion genes JAZF1/PHF1 and EPC1/PHF1 in endometrial stromal sarcoma". eng. In : *Cancer Research* 66.1, p. 107-112.
- MICCI, Francesca et al. (déc. 2017). "Fusion of the genes BRD8 and PHF1 in endometrial stromal sarcoma". en. In : *Genes, Chromosomes and Cancer* 56.12, p. 841-845.
- MIERLO, Guido van et al. (août 2019). "The Complexity of PRC2 Subcomplexes". In : *Trends in Cell Biology* 29.8, p. 660-671.

BIBLIOGRAPHIE

- MOORE, Lisa D et al. (jan. 2013). "DNA Methylation and Its Basic Function". In : *Neuropsychopharmacology* 38.1, p. 23-38.
- MOUSSA, Hagar F. et al. (avr. 2019). "Canonical PRC1 controls sequence-independent propagation of Polycomb-mediated gene silencing". en. In : *Nature Communications* 10.1, p. 1-12.
- MOZGOVA, Iva et Lars HENNIG (2015). "The Polycomb Group Protein Regulatory Network". In : *Annual Review of Plant Biology* 66.1, p. 269-296.
- MUSSELMAN, Catherine A. et al. (déc. 2012). "Molecular basis for H3K36me3 recognition by the Tudor domain of PHF1". In : *Nature structural & molecular biology* 19.12, p. 1266-1272.
- O'CONNELL, Sinead et al. (nov. 2001). "Polycombl like PHD Fingers Mediate Conserved Interaction with Enhancer of Zeste Protein". en. In : *Journal of Biological Chemistry* 276.46, p. 43065-43073.
- PAULO, Paula et al. (avr. 2018). "Targeted next generation sequencing identifies functionally deleterious germline mutations in novel genes in early-onset/familial prostate cancer". en. In : *PLOS Genetics* 14.4, e1007355.
- PELTOA, Katriina J. et al. (sept. 2018). "ODM-204, a Novel Dual Inhibitor of CYP17A1 and Androgen Receptor : Early Results from Phase I Dose Escalation in Men with Castration-resistant Prostate Cancer". In : *European Urology Focus*.
- PERINO, Matteo et al. (juil. 2018). "MTF2 recruits Polycomb Repressive Complex 2 by helical-shape-selective DNA binding". en. In : *Nature Genetics* 50.7, p. 1002-1010.
- PREKOVIC, Stefan et al. (juil. 2016). "The Effect of F877L and T878A Mutations on Androgen Receptor Response to Enzalutamide". en. In : *Molecular Cancer Therapeutics* 15.7, p. 1702-1712.
- REN, Zhihong et al. (jan. 2019). "PHF19 promotes multiple myeloma tumorigenicity through PRC2 activation". en. In : *Blood*, blood.2019000578.
- ROSSETTO, Dorine et al. (oct. 2012). "Histone phosphorylation". In : *Epigenetics* 7.10, p. 1098-1108.

- ROTHBERG, Janet L. Manias et al. (mai 2018). "Mtf2-PRC2 control of canonical Wnt signaling is required for definitive erythropoiesis". en. In : *Cell Discovery* 4.1, p. 1-16.
- RYCAJ, Kiera et al. (fév. 2016). "Longitudinal tracking of subpopulation dynamics and molecular changes during LNCaP cell castration and identification of inhibitors that could target the PSA-/lo castration-resistant cells". In : *Oncotarget* 7.12, p. 14220-14240.
- SANCHEZ, Roberto et Ming-Ming ZHOU (juil. 2011). "The PHD Finger : A Versatile Epigenome Reader". In : *Trends in biochemical sciences* 36.7, p. 364-372.
- SANULLI, Serena et al. (mar. 2015). "Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation". In : *Molecular Cell* 57.5, p. 769-783.
- SARMA, Kavitha et al. (avr. 2008). "Ezh2 Requires PHF1 To Efficiently Catalyze H3 Lysine 27 Trimethylation In Vivo". In : *Molecular and Cellular Biology* 28.8, p. 2718-2731.
- SAVLA, Urmi et al. (mar. 2008). "Recruitment of Drosophila Polycomb-group proteins by Polycomblake, a component of a novel protein complex in larvae". en. In : *Development* 135.5, p. 813-817.
- SCHOOLMEESTER, J. et al. (juin 2013). "JAZF1 Rearrangement in a Mesenchymal Tumor of Nonendometrial Stromal Origin : Report of an Unusual Ossifying Sarcoma of the Heart Demonstrating JAZF1/PHF1 Fusion". ENGLISH. In : *The American Journal of Surgical Pathology* 37.6, p. 938-942.
- SCHUETTENGROBER, Bernd et al. (sept. 2017). "Genome Regulation by Polycomb and Trithorax : 70 Years and Counting". en. In : *Cell* 171.1, p. 34-57.
- SHI, Yi et al. (juin 2019). "C10ORF12 modulates PRC2 histone methyltransferase activity and H3K27me3 levels". en. In : *Acta Pharmacologica Sinica*, p. 1-9.
- SIMON, Jeffrey A. et Robert E. KINGSTON (mar. 2013). "Occupying chromatin : Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put". eng. In : *Molecular Cell* 49.5, p. 808-824.

- SO, Alan et al. (fév. 2005). "Mechanisms of the development of androgen independence in prostate cancer". en. In : *World Journal of Urology* 23.1, p. 1-9.
- STEFFEN, Philipp A. et Leonie RINGROSE (mai 2014). "What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory". en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15.5, p. 340-356.
- TAI, Sheng et al. (nov. 2011). "PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma". eng. In : *The Prostate* 71.15, p. 1668-1679.
- TAN, MH Eileen et al. (jan. 2015). "Androgen receptor : structure, role in prostate cancer and drug discovery". en. In : *Acta Pharmacologica Sinica* 36.1, p. 3-23.
- TAPLIN, Mary-Ellen et al. "Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist". en. In : (), p. 7.
- TERRY, Stéphane et Himisha BELTRAN (2014). "The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer progression". In : *Frontiers in oncology* 4, p. 60.
- TIAN, Bin et James L. MANLEY (2017). "Alternative polyadenylation of mRNA precursors". eng. In : *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18.1, p. 18-30.
- TIE, Feng et al. (mai 2003). "A 1-Megadalton ESC/E(Z) Complex from Drosophila That Contains Polycomblike and RPD3". In : *Molecular and Cellular Biology* 23.9, p. 3352-3362.
- TOMITA, Hiroyuki et al. (mar. 2016). "Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer". eng. In : *Oncotarget* 7.10, p. 11018-11032.
- TUCCI, Marcello et al. (oct. 2018). "Enzalutamide-resistant castration-resistant prostate cancer : challenges and solutions". en. In : *OncoTargets and Therapy* Volume 11, p. 7353-7368.
- UEDA, Takeshi et al. (nov. 2002). "Ligand-independent Activation of the Androgen Receptor by Interleukin-6 and the Role of Steroid Receptor Coactivator-1 in Prostate Cancer Cells". en. In : *Journal of Biological Chemistry* 277.41, p. 38087-38094.
- VANDAMME, Julien et al. (avr. 2011). "Interaction Proteomics Analysis of Polycomb Proteins Defines Distinct PRC1 Complexes in Mammalian Cells". en. In : *Molecular & Cellular Proteomics* 10.4, p. M110.002642.

- VIDAL, Miguel et Katarzina STAROWICZ (avr. 2017). "Polycomb complexes PRC1 and their function in hematopoiesis". In : *Experimental Hematology* 48, p. 12-31.
- VLAEMINCK-GUILLEM, V. et al. (déc. 2015). "Urinary PCA3 to predict prostate cancer in a cohort of 1015 patients". eng, fre. In : *Progres En Urologie : Journal De l'Association Francaise D'urologie Et De La Societe Francaise D'urologie* 25.16, 1160-1168, e1-8.
- VÖLKE, Pamela et al. (mai 2012). "A human Polycomb isoform lacking the Pc box does not participate to PRC1 complexes but forms protein assemblies and represses transcription". In : *Epigenetics* 7.5, p. 482-491.
- VÖLKE, Pamela et al. (fév. 2015). "Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics". In : *American Journal of Translational Research* 7.2, p. 175-193.
- VÖLKE, Pamela et al. (mar. 2019). "Ezh1 arises from Ezh2 gene duplication but its function is not required for zebrafish development". en. In : *Scientific Reports* 9.1, p. 1-13.
- WALKER, Emily et al. (fév. 2010). "Polycomb-like 2 Associates with PRC2 and Regulates Transcriptional Networks during Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation". English. In : *Cell Stem Cell* 6.2, p. 153-166.
- WALKER, Emily et al. (jan. 2011). "PCL2 modulates gene regulatory networks controlling self-renewal and commitment in embryonic stem cells". In : *Cell Cycle* 10.1, p. 45-51.
- WANG, Liangjun et al. (juin 2004a). "Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes". eng. In : *Molecular Cell* 14.5, p. 637-646.
- WANG, Shuwen et al. (déc. 2004b). "A novel human homologue of Drosophila polycomblike gene is up-regulated in multiple cancers". In : *Gene* 343.1, p. 69-78.
- WASSEF, Michel et al. (mar. 2019). "EZH1/2 function mostly within canonical PRC2 and exhibit proliferation-dependent redundancy that shapes mutational signatures in cancer". en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.13, p. 6075-6080.

- WATSON, Philip A. et al. (déc. 2015). "Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer". en. In : *Nature Reviews Cancer* 15.12, p. 701-711.
- WIESTNER, Adrian et al. (juin 2007). "Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival". In : *Blood* 109.11, p. 4599-4606.
- WOO, Caroline J. et al. (jan. 2010). "A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness". eng. In : *Cell* 140.1, p. 99-110.
- WU, Xiaoji et Yi ZHANG (sept. 2017). "TET-mediated active DNA demethylation : mechanism, function and beyond". en. In : *Nature Reviews Genetics* 18.9, p. 517-534.
- XU, Hui et al. (juil. 2015). "MicroRNA-195-5p acts as an anti-oncogene by targeting PHF19 in hepatocellular carcinoma". In : *Oncology Reports* 34.1, p. 175-182.
- YANG, Yang et al. (jan. 2013). "Polycomb group protein PHF1 regulates p53-dependent cell growth arrest and apoptosis". eng. In : *The Journal of Biological Chemistry* 288.1, p. 529-539.
- YUAN, Ta-Chun et al. (sept. 2007). "Neuroendocrine-like prostate cancer cells : neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells". In : *Endocrine-Related Cancer* 14.3, p. 531-547.
- YUEN, Benjamin T. K. et Paul S. KNOEPFLER (nov. 2013). "Histone H3.3 Mutations : A Variant Path to Cancer". English. In : *Cancer Cell* 24.5, p. 567-574.
- ZHANG, Zhuo et al. (2011). "PRC2 Complexes with JARID2, MTF2, and esPRC2p48 in ES Cells to Modulate ES Cell Pluripotency and Somatic Cell Reprograming". en. In : *STEM CELLS* 29.2, p. 229-240.
- ZHU, Shimiao et al. (juin 2019). "Neurotensin and its receptors mediate neuroendocrine transdifferentiation in prostate cancer". en. In : *Oncogene* 38.24, p. 4875-4884.

