



**HAL**  
open science

# PRMT1, un nouveau corégulateur de la signalisation de la progestérone dans le cancer du sein

Lucie Malbeteau

► **To cite this version:**

Lucie Malbeteau. PRMT1, un nouveau corégulateur de la signalisation de la progestérone dans le cancer du sein. Cancer. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1178 . tel-02407422

**HAL Id: tel-02407422**

**<https://theses.hal.science/tel-02407422>**

Submitted on 12 Dec 2019

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

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

N°d'ordre NNT : 2019LYSE1178



**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 340**  
**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (ED BMIC)**

**Spécialité de doctorat** : Cancérologie  
**Discipline** : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue publiquement le 11/10/2019, par :

**Lucie Malbêteau**

---

**PRMT1, un nouveau corégulateur  
de la signalisation de la progestérone  
dans le cancer du sein**

---

Devant le jury composé de :

**M. GILLET Germain** - Professeur des Universités/Praticien Hospitalier, UCBL, Lyon  
**Mme TOMASETTO Catherine-Laure** - Directrice de Recherche, INSERM, Strasbourg  
**M. DUBOIS Thierry** - Ingénieur de Recherche, Institut Curie, Paris  
**Mme BILLAS MASSOBRIO Isabelle** - Chargée de Recherche, INSERM, Strasbourg  
**M. BENOIT Gérard** - Chargé de Recherche, INSERM, Lyon  
**Mme CORBO Laura** - Directrice de Recherche, CNRS, Lyon



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Directeur de l'Université**

Président du Conseil Académique  
Vice-président du Conseil d'Administration  
Vice-président du Conseil de Formation  
et Vie Universitaire  
Vice-président de la Commission Recherche  
Directrice Générale des Service

## **Professeur Frédéric FLEURY**

Professeur H. BEN HADID  
Professeur D. REVEL  
Professeur P. CHEVALIER  
  
M. F. VALLEE  
Mme D. MARCHAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Professeur G. RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Professeure A-M. SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

	(Directeur/Directrice)
Faculté des Sciences et Technologies	M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Professeur F. THIEVENARD
Département Chimie Biochimie	Mme C. FELIX
Département GEP	M. H. HAMMOURI
Département Informatique	Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Professeur J-C. PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	M. Y. VANPOUILLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Professeur E. PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	M. N. LEBOISNE



## REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au sein du « Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon », dirigé par le Professeur Alain Puisieux que je remercie de m'avoir accueillie au sein de l'établissement. Je remercie les organismes qui ont supporté financièrement ce doctorat, le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur pour la bourse des trois premières années. J'en profite pour remercier également l'Ecole Doctorale BMIC, pour leur investissement et leur encadrement perpétuels. Je remercie enfin l'Association pour la Recherche sur le Cancer qui a permis la finalisation de ces travaux grâce au financement d'une 4<sup>ème</sup> année.

Je tiens à remercier très chaleureusement les membres du jury d'avoir pris de leur temps pour évaluer mon travail de thèse, le Professeur Germain Gillet pour avoir accepté la présidence, le Docteur Catherine-Laure Tomasetto et le Docteur Thierry Dubois pour avoir eu le courage de lire et de corriger cette thèse en plein été caniculaire, et enfin le Docteur Isabelle Billas-Massobrio et le Docteur Gérard Benoît pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je joins à ces remerciements le Docteur Catherine Teyssier et le Docteur Frédéric Flamant, membres de mon comité de suivi de thèse, qui ont suivi mon travail tout au long de ces quatre années et m'ont apporté à chaque échange, de précieux conseils.

Ces quatre années de doctorat au sein de l'équipe « Signalisation des stéroïdes et cancer du sein » n'auraient pas été si formatrices et si inoubliables sans toi Laura. J'ai développé grâce à toi un esprit critique des résultats, une autonomie dans les expériences et une curiosité folle des mécanismes biologiques qui me serviront à coup sûr pour les prochaines années. J'ai eu la chance de t'avoir comme « chef exclusive » les deux dernières années, une directrice de thèse aux petits soins, prête à mettre la « main à la pâte » à la paillasse et toujours à l'écoute de mes angoisses de thésarde. Ce message ne suffira pas à retranscrire à quel point je te remercie pour ce temps que tu m'as accordé.

Muriel, tu m'as fait confiance dès le Master 1 en me proposant un stage et tu as renouvelé cette confiance lors de ta proposition de continuer en thèse. Je sais la chance que j'ai eu d'avoir une chef d'équipe aussi disponible, enthousiaste et dynamique. Je te remercie de m'avoir permis de m'épanouir autant au sein de cette équipe. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci, à tous les membres de cette équipe incroyable, que j'ai pu côtoyer tout au long de cette thèse, et qui ont fait de cette aventure un très beau souvenir :

Julien, mon « acolyte », souvent accoudé à ma paillasse pour discuter de tout mais rarement des manips ! Tu fais partie des rares personnes à être au labo depuis mon arrivée. Je te remercie pour tous nos échanges, nos repas et nos pauses cafés partagés chaque jour ou presque, pendant plus de cinq ans.

*Hub*, par ton humour et ton énergie, ta présence dans l'équipe m'a apporté un petit plus énorme ! Je te remercie de ton aide et de ton soutien sans faille. Bonne continuation dans tes nouveaux projets !

*HPK*, partager mes journées au labo avec toi a été un réel plaisir. Ton optimisme, ta jovialité et ta quiétude m'ont apaisée à chacune de nos discussions. *ER-36* t'en a fait baver je le sais, mais il nous aura au moins permis de nous rencontrer et d'apprendre à nous apprécier. Ne lâche rien, ne change rien.

*Razan*, ton énergie et ta joie de vivre matinales vont terriblement me manquer ... ! Je te souhaite de belles choses pour la suite, à commencer par réussir à avoir un  $n=3$  dans tes résultats ! Tu es plus forte et têtue que *Menin*, alors accroche-toi ! *Diana*, notre humoriste préférée ! Tes talents d'imitation et ta « pêche » quotidienne vont beaucoup me manquer. Tu mérites une belle suite post-thèse et je suis sûre que tu y arriveras.

*Ha*, ne change rien ! Tu es le rayon de soleil de cette équipe. *Yakun*, mon voisin de bureau et de paillasse, j'ai appris à te connaître un peu plus chaque jour et j'ai découvert un garçon au grand cœur, une personne pleine de vie. Merci de ta bonne humeur ! *Lara*, bonne chance pour la thèse et bonne vie lyonnaise !

*Ausra*, ta gentillesse et ta douceur m'ont aidée chacun des jours que nous avons partagés. Tu es une personne sur qui j'ai pu compter à chaque fois que j'en avais besoin, et je te remercie énormément pour ça. Bisous à mon petit *Viggo* ! *Cécile* et *Farida*, vous m'avez chaleureusement accueillie dès mon arrivée et votre bienveillance a été sans faille chaque jour passé ici. Je vous remercie profondément pour votre aide quotidienne. *Chang*, votre sérénité et votre calme sont essentiels au bien-être de cette équipe. Je vous souhaite une belle fin de carrière et surtout une très belle retraite.

*Coralie*, bien que notre rencontre soit relativement récente, le peu de temps partagé a suffi à m'apporter une grande aide pour cette fin de thèse. Je te remercie pour tes conseils, pour ton soutien moral et pour ton aide technique. Je te souhaite un bel épanouissement dans cette équipe.

Un grand merci également aux collègues de l'équipe VMS et de l'équipe RRCG, et surtout aux copines *Florence* et *Sophie*, et à *Rudy* et *Ivan* pour leur précieuse aide technique.

Un petit mot également pour les « vieux copains », partis mais pas oubliés : *Marie-Lise*, *Céline*, *Raana* et *Hanine*, vous me manquez les filles. Je pense fort à vous. *Romain* et *Samuele*, je ne pouvais pas finir ces remerciements sans un mot sur vous deux, mes héros partis trop tôt ! Je vous remercie pour vos précieux conseils de *ChIP* et de *qPCR*, mais surtout pour nos moments de rigolade quasi quotidiens.

Je pense aussi aux copains du *Monthly Beer*, avec qui j'ai partagé mes joies de résultats positifs et surtout mon stress dû aux échecs de manips ... Félicitations à vous, Anissa, Matthias, Ommar et les autres à venir, pour avoir été au bout de votre thèse et rendez-vous un peu partout dans le monde !

*Sylvaine* et *Khadidja*, la distance n'a pas entaché cette belle amitié née sur les bancs du Master. J'ai pu compter sur vos nouvelles et sur votre indulgence de « mon absence » en fin de thèse. Merci pour nos moments partagés un peu partout en France, des bouffées d'oxygène qui m'ont permis de ne jamais craquer ! *Sév*, un merci tout particulier à toi, avec qui j'ai partagé pas mal de soirées à me plaindre des manips, des résultats, de la rédaction de ce manuscrit et j'en passe. Ça nous aura quand même permis de tester plusieurs bars à tapas assez sympas hein ;) )

Les filles, *Anne-Line* et *Alysée*, merci de votre présence sans faille et de vos mots si doux et gentils à chacun de vos messages et à chacun de nos moments passés ensemble. Vous m'avez apporté un soutien moral inestimable. Je vous fais de gros bisous, à bébé Léon aussi !

Les amies d'une vie se comptent sur les doigts d'une main ... Je vous ai sentis avec moi à chacune de mes angoisses et à chacun de mes petits « succès » au labo, malgré les centaines de kilomètres qui nous séparent depuis maintenant 7 ans. J'ai de la chance de vous avoir à mes côtés, vous êtes les meilleures, *Caro* et *Thaïs* ! Ma Poulette, tu as certainement bien plus confiance en moi que je ne l'ai moi-même, et cette force que tu m'apportes me permet de me lancer chaque fois dans de nouveaux défis. Merci infiniment ...

Je n'aurais pas eu à rédiger ce manuscrit aujourd'hui si ma famille ne m'avait pas permis d'en arriver là. Merci à tous les Malbeteau, *Ridel* « and Co » pour leur intérêt permanent à mes recherches et leur soutien, et particulièrement toi *Aurélié*. Je remercie bien évidemment mon frère et mes parents, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi jusque-là, notamment la relecture de cette centaine de pages à la recherche de fautes ! Une tendre pensée pour mon fidèle compagnon qui m'a accompagnée tout au long de l'écriture de ce manuscrit, ma boule de poils *Charly*. Enfin, et surtout, je pense à toi, *Rémi*. Ma « pudeur légendaire » m'empêche d'exprimer ici tout ce que je ressens pour toi, et un « merci » ne suffira pas à refléter tout ce que tu m'as apporté. Bravo pour l'optimisme et la patience dont tu as fait preuve pendant cette période. Courage, c'est bientôt fini !



## PREAMBULE

Le phénotype d'une cellule résulte en l'addition d'une multitude de composantes, portées en partie par le matériel génétique, mais aussi dépendantes de modifications non-génétiques. Parmi elles, l'épigénétique, à savoir l'ensemble des changements héréditaires étroitement liés au génome mais sans être basés sur des modifications de séquences de l'ADN, a émergé ces dernières années comme une discipline incontournable pour la compréhension des processus biologiques. Les modifications post-traductionnelles des histones au sein des nucléosomes jouent un rôle important dans les différents processus moléculaires associés à l'ADN, dont la transcription. Les marques déposées (phosphorylation, acétylation, méthylation) sont dépendantes de l'action dynamique de protéines, capables de modifier les résidus en réponse à un signal mais aussi de lire les modifications et d'amorcer une signalisation en aval.

Parmi ces acteurs clés dans la régulation du phénotype cellulaire, PRMT1 est une arginine méthyltransférase impliquée dans un grand nombre de processus physiologiques dans la cellule saine (réparation d'ADN, métabolisme des ARNs) mais impliquée également dans des dérégulations de signalisation dans les cellules tumorales, mammaires notamment. Outre le fait que cette protéine soit capable de modifier les histones sur la chromatine, c'est également un coactivateur des récepteurs nucléaires, ce qui fait d'elle une cible d'études intéressante dans les cancers hormono-dépendants. Le récepteur aux œstrogènes (ER $\alpha$ ) et celui de la progestérone (PR) sont deux médiateurs clés de la transcription de gènes, codant pour la prolifération et la survie des cellules du sein. Comme la majorité des récepteurs stéroïdiens, leur activité de facteur de transcription est régulée par des modifications, non-héréditaires, médiées généralement par les mêmes enzymes modificatrices de la chromatine. La stabilité de la protéine, la liaison sur l'ADN ou les interactions avec des corégulateurs sont des exemples de mécanismes contrôlés par les modifications post-traductionnelles.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à décrypter le rôle que jouait PRMT1 sur la signalisation du récepteur de la progestérone. Pour cela, nous avons étudié, dans des cellules de cancer de sein PR-positives, l'interaction entre ces deux protéines ainsi que l'impact de l'enzyme sur l'activité transcriptionnelle du récepteur. Nous avons montré que PRMT1 agissait comme un corégulateur de PR et modulait l'expression spécifique de gènes cibles dépendants de la progestérone, notamment codant pour la prolifération et la migration des cellules tumorales. De plus, nous avons mis en évidence une nouvelle modification post-traductionnelle du récepteur, la méthylation de son arginine en position 637, localisée dans une région essentielle à son activité nucléaire. Nos résultats soulignent un nouveau mécanisme de régulation de l'activité du récepteur dans les cellules tumorales du sein.



## SOMMAIRE

<b>Chapitre 1 : La chromatine</b> .....	<b>23</b>
1. La découverte de la chromatine .....	23
2. La structure de la chromatine .....	24
2.1. Le nucléosome .....	24
2.2. Les niveaux de compaction de la chromatine.....	25
2.3. Les composants du nucléosome .....	27
2.3.1. La structure du cœur octamérique d'histones .....	27
2.3.2. L'histone <i>linker</i> H1 .....	28
2.3.2.1. Ses propriétés majeures .....	28
2.3.2.2. Les variants H1.....	29
2.3.2.3. Les modifications post-traductionnelles des H1s.....	30
2.4. Les queues saillantes des histones.....	30
2.4.1. Leurs rôles sur la chromatine .....	30
2.4.2. Leurs modifications post-traductionnelles .....	31
2.4.2.1. Introduction au « code histone ».....	31
2.4.2.2. L'acétylation dynamique des lysines .....	32
2.4.2.3. La méthylation dynamique des queues d'histones .....	34
2.4.2.3.1. Le dynamisme de la méthylation des lysines.....	34
2.4.2.3.2. La méthylation d'arginines.....	37
2.4.2.3.2.1. Introduction.....	37
2.4.2.3.2.2. Les histones arginine méthyltransférases (PRMTs) .....	37
2.4.2.3.2.3. Les protéines adaptatrices.....	40
2.4.2.3.2.4. Les rôles sur la chromatine.....	40
2.4.2.3.2.5. La méthylation d'arginines, un phénomène réversible ?	41
2.4.2.3.2.6. Ouverture : implication dans la tumorigénèse.....	42
2.4.2.4. La phosphorylation dynamique des histones .....	43
2.4.2.5. Autres modifications des queues d'histones .....	48
2.4.2.5.1. L'ubiquitination .....	48
2.4.2.5.2. La SUMOylation .....	49
2.4.2.5.3. La crotonylation.....	49
3. La régulation de la transcription.....	50
3.1. Le mécanisme de transcription de gènes eucaryotes.....	50
3.1.1. Les promoteurs de gènes eucaryotes .....	50
3.1.2. L'ARN Polymérase II.....	51
3.1.3. Le cycle de transcription de l'ARN Pol II .....	52

3.2.	La relation fonctionnelle entre transcription et chromatine.....	53
3.2.1.	Le remodelage de la chromatine.....	53
3.2.2.	La transcription dépendante des récepteurs nucléaires.....	54

**Chapitre 2 : Les récepteurs nucléaires comme modèle d'étude de la régulation transcriptionnelle ..... 56**

1.	Introduction sur les récepteurs nucléaires.....	56
2.	La découverte des récepteurs nucléaires .....	57
3.	La superfamille des récepteurs nucléaires.....	58
3.1.	La classification des récepteurs nucléaires .....	58
3.2.	Structure des récepteurs nucléaires .....	60
3.2.1.	Le domaine de liaison à l'ADN (Domaine C).....	61
3.2.2.	Le domaine de liaison au ligand (Domaine E) .....	63
3.2.2.1.	La liaison du ligand.....	63
3.2.2.2.	La liaison des corégulateurs.....	65
3.2.2.3.	La dimérisation des récepteurs .....	66
3.2.3.	La région charnière (Domaine D).....	67
3.2.3.1.	Son rôle dans la localisation du récepteur.....	67
3.2.3.2.	Son rôle dans l'activité nucléaire du récepteur .....	67
3.2.4.	Le domaine amino-terminal d'activation (A/B) .....	68
3.2.5.	La partie extrême carboxy-terminale (F).....	69
3.3.	La phylogénie des récepteurs nucléaires .....	69

**Chapitre 3 : La méthylation d'arginines par PRMT1 ..... 72**

1.	Le gène <i>PRMT1</i> .....	72
2.	La protéine PRMT1.....	73
2.1.	Les isoformes PRMT1 v1-v7.....	74
2.2.	La structure de la protéine.....	74
2.2.1.	Le domaine méthyltransférase (MTase).....	74
2.2.2.	La partie C-terminale .....	75
2.2.3.	Le site catalytique.....	76
2.2.4.	L'extrémité N-terminale.....	76
2.3.	La phylogénie des PRMTs.....	77
3.	Les fonctions majeures décrites pour PRMT1 .....	78
3.1.	La di-méthylation asymétrique .....	78
3.2.	Le métabolisme des ARN messagers.....	78
3.2.1.	La modulation des interactions.....	79

3.2.2.	La localisation des protéines associées à l'ARNm.....	79
3.2.3.	L'impact sur l'exportation des ARNs.....	79
3.3.	La réparation de l'ADN .....	80
3.3.1.	MRE11 est méthylée par PRMT1.....	80
3.3.2.	53BP1 et PRMT1 .....	81
3.4.	PRMT1 et la signalisation cellulaire cytoplasmique .....	82
4.	La régulation de PRMT1 .....	83
4.1.	La « dé-méthylation » d'arginines ?.....	83
4.2.	La liaison de protéines régulatrices .....	83
4.3.	La coopération entre PRMTs.....	84
5.	L'implication de PRMT1 dans le cancer .....	84
<b>Chapitre 4 : La signalisation du récepteur de la progestérone .....</b>		<b>87</b>
1.	La structure de PR.....	87
1.1.	Son gène et ses variants protéiques .....	87
1.1.1.	<i>PgR</i> , le gène codant PR.....	87
1.1.2.	Les variants protéiques de PR .....	89
1.1.2.1.	Les isoformes majeurs PR-A et PR-B .....	89
1.1.2.1.1.	La partie N-terminale .....	89
1.1.2.1.1.1.	Le domaine BUS .....	89
1.1.2.1.1.2.	Le domaine inhibiteur (ID) .....	90
1.1.2.1.2.	Les rôles distincts des isoformes .....	90
1.1.2.1.2.1.	Les différences phénotypiques.....	90
1.1.2.1.2.2.	Régulation distincte de gènes cibles .....	91
1.1.2.1.2.1.	Impact plus global sur la transcription.....	92
1.1.2.2.	Les autres isoformes protéiques .....	93
1.1.2.2.1.	L'isoforme PR-C .....	93
1.1.2.2.2.	Les autres isoformes mineurs .....	94
2.	Son ligand, la progestérone .....	95
2.1.	La structure et la synthèse de la progestérone .....	95
2.2.	L'ovaire, lieu de synthèse de l'hormone .....	96
2.2.1.	Sa structure .....	96
2.2.2.	La synthèse des hormones stéroïdiennes .....	97
2.3.	Les actions de la progestérone .....	98
2.3.1.	La régulation du cycle ovarien.....	98
2.3.2.	La régulation de l'implantation de l'embryon .....	100
2.3.3.	La régulation du développement de la glande mammaire .....	101

2.3.3.1.	Anatomie de la glande mammaire .....	101
2.3.3.2.	Le rôle de la progestérone .....	102
2.3.4.	Les agonistes et antagonistes de PR.....	104
2.3.4.1.	Les agonistes et la contraception orale.....	104
2.3.4.2.	Les antagonistes de PR.....	104
3.	La signalisation de PR.....	105
3.1.	En absence d'hormone .....	106
3.2.	Après la stimulation hormonale .....	107
3.2.1.	La liaison du ligand au récepteur .....	107
3.2.2.	La voie non génomique.....	108
3.2.3.	La dimérisation du récepteur et la liaison à l'ADN .....	110
3.2.3.1.	PR et sa forme monomérique .....	110
3.2.3.2.	La liaison de PR à la chromatine.....	110
3.2.4.	La régulation transcriptionnelle des gènes cibles .....	112
3.2.4.1.	L'activation génique .....	112
3.2.4.2.	La répression « active » de gènes.....	113
4.	Les modifications post-traductionnelles.....	115
4.1.	La phosphorylation de PR .....	115
4.2.	L'acétylation de PR.....	116
4.3.	La SUMOylation et l'ubiquitination de PR.....	117
4.4.	La méthylation de PR .....	117
<b>Chapitre 5 : Le cancer du sein, modèle d'étude de la signalisation de PR .....</b>		<b>118</b>
1.	Une maladie hétérogène.....	118
2.	La progestérone dans le cancer du sein .....	120
2.1.	Un rôle mal connu dans le développement tumoral.....	120
2.2.	PR, nouveau <i>leader</i> de la carcinogénèse mammaire ?.....	121
<b>Objectifs de la thèse et introduction au papier.....</b>		<b>125</b>
<b>Conclusions générales .....</b>		<b>129</b>
<b>Discussions et perspectives .....</b>		<b>129</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>141</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1:</b> Historique des avancées majeures sur l'étude de la chromatine. ....	24
<b>Figure 2:</b> La structure d'un nucléosome au sein de la fibre chromatinienne. ....	25
<b>Figure 3:</b> Les différents niveaux de compaction de la chromatine. ....	26
<b>Figure 4:</b> La structure globulaire des histones au sein d'un nucléosome. ....	28
<b>Figure 5:</b> La structure de l'histone H1. ....	29
<b>Figure 6:</b> Les modifications post-traductionnelles majeures des queues d'histones. ....	31
<b>Figure 7:</b> L'acétylation dynamique des lysines. ....	33
<b>Figure 8:</b> La méthylation dynamique des lysines. ....	36
<b>Figure 9:</b> Le mécanisme de méthylation des arginines. ....	39
<b>Figure 10:</b> La phosphorylation dynamique des résidus de queues d'histones. ....	44
<b>Figure 11:</b> L'activation séquentielle des kinases de la voie MAPK. ....	45
<b>Figure 12:</b> La structure conservée des kinases RSK et MSK. ....	45
<b>Figure 13:</b> Structure schématique d'un promoteur de gène eucaryote. ....	51
<b>Figure 14:</b> L'initiation de la transcription d'un promoteur eucaryote. ....	53
<b>Figure 15:</b> La structure du promoteur MMTV. ....	55
<b>Figure 16:</b> Le modèle d'action du récepteur nucléaire. ....	57
<b>Figure 17:</b> Les différentes classes de récepteurs nucléaires. ....	59
<b>Figure 18:</b> La structure d'un récepteur stéroïdien humain. ....	60
<b>Figure 19:</b> Liaison d'un homo-dimère stéroïdien sur l'ADN. ....	61
<b>Figure 20:</b> La composition structurale du DBD. ....	62
<b>Figure 21:</b> Hélices $\alpha$ composant le LBD. ....	64
<b>Figure 22:</b> La position centrale de l'hélice $\alpha$ n°12 dans la fonction du LBD. ....	65
<b>Figure 23:</b> Modélisation de l'interaction entre corégulateurs et LBD. ....	66
<b>Figure 24:</b> L'arbre phylogénétique de la superfamille des récepteurs nucléaires. ....	70
<b>Figure 25:</b> La phylogénie des récepteurs stéroïdiens. ....	71
<b>Figure 26:</b> Les différents isoformes de PRMT1. ....	73
<b>Figure 27:</b> Les motifs conservés des PRMTs. ....	75
<b>Figure 28:</b> La phylogénie des PRMTs. ....	77
<b>Figure 29:</b> Les trois isoformes du récepteur à la progestérone chez l'Homme. ....	88
<b>Figure 30:</b> La biosynthèse des hormones stéroïdiennes. ....	96
<b>Figure 31:</b> La structure d'un follicule ovarien chez la femme. ....	97
<b>Figure 32:</b> La synthèse d'hormones selon la théorie Two-cell-two-gonadotrophin. ....	98
<b>Figure 33:</b> Le cycle menstruel chez la femme. ....	100
<b>Figure 34:</b> Le réseau alvéolaire de la glande mammaire. ....	101
<b>Figure 35:</b> Composition cellulaire des alvéoles de la glande mammaire. ....	102

<b>Figure 36:</b> Le développement de la glande mammaire sous l'influence des hormones.....	103
<b>Figure 37:</b> Les ligands de PR.....	105
<b>Figure 38:</b> La signalisation de PR selon le « dogme » des récepteurs stéroïdiens.....	106
<b>Figure 39:</b> uPR agit au sein d'un complexe répressif sur certains de ses gènes cibles. ....	107
<b>Figure 40:</b> Les effets non-génomiques de la progestérone et son récepteur.....	109
<b>Figure 41:</b> La liaison de PR, activé par son ligand, sur l'ADN.....	111
<b>Figure 42:</b> L'activation transcriptionnelle par PR et ses partenaires nucléaires.....	113
<b>Figure 43:</b> La répression transcriptionnelle « active » dépendante de PR.....	114
<b>Figure 44:</b> Les modifications post-traductionnelles de PR.....	115
<b>Figure 45:</b> La classification moléculaire des cancers du sein. ....	119
<b>Figure 46:</b> PR porte une arginine conservée dans sa région hinge. ....	125
<b>Figure 47:</b> PRMT1, un nouveau modulateur de l'activité de PR. ....	129
<b>Figure 48:</b> Un lien entre méthylation et acétylation du NLS de PR ? .....	136
<b>Figure 49:</b> PRMT1 est impliquée dans l'interaction entre ER $\alpha$ et PR.....	138

## ABRÉVIATIONS

### - A -

**AA:** Amino Acides  
**ADMA:** Asymmetric DiMethylArginine  
**ADN:** Acide DésoxyriboNucléique  
**ADNc:** ADN Complémentaire  
**AF:** Activation Function  
**ARN:** Acide RiboNucléique  
**ATP:** Adenosine TriPhosphate

### - C -

**CARM1:** Coactivator-Associated R (arginine) Methyltransferase 1  
**Chromo-:** CHRomatin Organization Modifier  
**CDS:** CoDing Sequence  
**CTD:** Carboxy-Terminal repeat Domain  
**CTE:** C-Terminal Extension

### - F -

**FAD:** Flavine Adenine Dinucleotide  
**FSH:** Follicle Stimulating Hormone

### - H -

**HAT:** Histone AcetylTransferase  
**HDAC:** Histone DeAcetylase  
**HKDM:** Histone K (Lysine) DeMethylase  
**HKMT:** Histone K MethylTransferase  
**hnRNP:** heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein  
**HP1 $\gamma$ :** Heterochromatin Protein 1 $\gamma$   
**hPR:** Human Progesterone Receptor  
**HRE:** Hormone Response Element  
**HSP:** Heat-Shock Protein

### - B -

**BAF:** BRG1-Associated Factor  
**BRCA1:** BReast CAncer type 1 susceptibility gene  
**BRCT:** BRCA1 Carboxy-Terminal  
**BUS:** B-Upstream Segment

### - D -

**db:** Double Brins  
**DBD:** DNA-Binding Domain  
**DR:** Directed Repeats  
**DSB:** Double Strand Breaks

### - E -

**EGF:** Epidermal Growth Factor  
**EGFR:** EGF Receptor  
**ER:** Everted Repeats  
**ERK:** Extracellular signal-Regulated Kinase

### - G -

**GAR:** Glycin- and Arginine-Rich  
**GNAT:** General control Non-derepressible 5 (Gcn5)-related N-AcetylTransferase  
**GR:** Glucocorticoid Receptor  
**GRIP1:** Glutamate Receptor Interacting Protein 1  
**GTF:** General Transcription Factor

### - I -

**ID:** Inhibitory Domains  
**IHC:** ImmunoHistoChimie  
**Inr:** Initiator Sequence  
**IR:** Inverted Repeats

- J -

**JHDM:** Jumonji Histone DeMethylases  
**JmJC:** Jumonji-C  
**JMJD:** JuMonJi Domain-containing protein

- L -

**LBD:** Ligand-Binding Domain  
**LDL:** Low-Density Lipoprotein  
**LH:** Luteinizing Hormone  
**LSD1:** Lysine-Specific Demethylase-1

- N -

**NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor-Kappa B  
**NES:** Nuclear Export Sequence  
**NLS:** Nuclear Localization Sequence  
**nm:** Nanomètres  
**N-R:** Non-Repeat  
**NR:** Nuclear Receptor  
**NTD:** N-Terminal Domain  
**NuRD:** Nucleosome Remodelling and Deacetylase  
**NuRF:** Nucleosome Remodelling Factor

- R -

**RAR:** Retinoic Acid Receptor  
**RBP:** RBP, RNA-Binding Protein  
**RNP:** RiboNucleoParticles  
**RPB1:** RNA Polymerase B 1  
**RXR:** Retinoid X Receptor

- K -

**KDM:** lysine (K)-specific DeMethylase  
**KO:** Knockout

- M -

**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MMA:** MonoMethylArginine  
**MMTV:** Mouse Mammary Tumor Virus  
**MR:** Mineralocorticoid Receptor  
**MRN:** Mre11/ Rad50/Nbs1  
**mRNP:** messenger RiboNucleoParticles  
**MSK:** Mitogen- and Stress-activated Kinase

- O -

**OC:** Oral contraceptive  
**OTF:** Octamer Transcription Factor

- P -

**P-450<sub>scc</sub>:** cholesterol side-chain cleavage enzyme  
**pb:** Paires de Bases  
**PBAF:** Polybromo-associated BAF  
**PCAF:** P300/CBP-Associated Factor  
**PH:** Pleckstrin Homology  
**PHD:** Plant HomeoDomain  
**PHF:** Plant Homeodomain Finger protein  
**PIC:** PreInitiation Complex  
**PPAR:** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  
**PR:** Progesterone Receptor  
**PRE:** Progesterone Response Elements  
**PRMT:** Protein R(Arginine) MethylTransferase  
**PXR:** Pregnane X Receptor

- S -

**SAGA:** Spt-Ada-Gcn5 Acetyltransferase  
**SAH:** S-Adénosyl-l-Homocystéine  
**SAM:** S-AdénosylMéthionine  
**SAM68:** SRC-substrate Associated in Mitosis of 68 kDa  
**SDMA:** Symmetric DiMethylArginine  
**SP1:** Specifity Protein 1  
**SR:** Steroid Receptor  
**SRA:** Steroid Receptor Activator  
**SRB:** Suppressor of RNA polymerase B  
**SRC-1:** Steroid Receptor Coactivator 1  
**STAT:** Signal Transducers and Activators of Transcription  
**SWI/SNF:** SWItch/Sucrose Non-Fermentable

- T -

**TBP:** TATA-Binding Protein  
**TD:** Transactivation Domain (AF)  
**TDRD:** Tudor Domain containing Protein  
**THW:** Threonine-Histidine-Tryptophan  
**TR:** Thyroid Receptor  
**TSS:** Transcription Starting Site

- U -

**UAS:** Upstream Activation Sequence  
**uORF:** upstream Open Reading Frame  
**uPR:** unliganded PR  
**URS:** Upstream Repression Sequence

- V -

**VDR:** Vitamin D Receptor



---

# **INTRODUCTION**

---

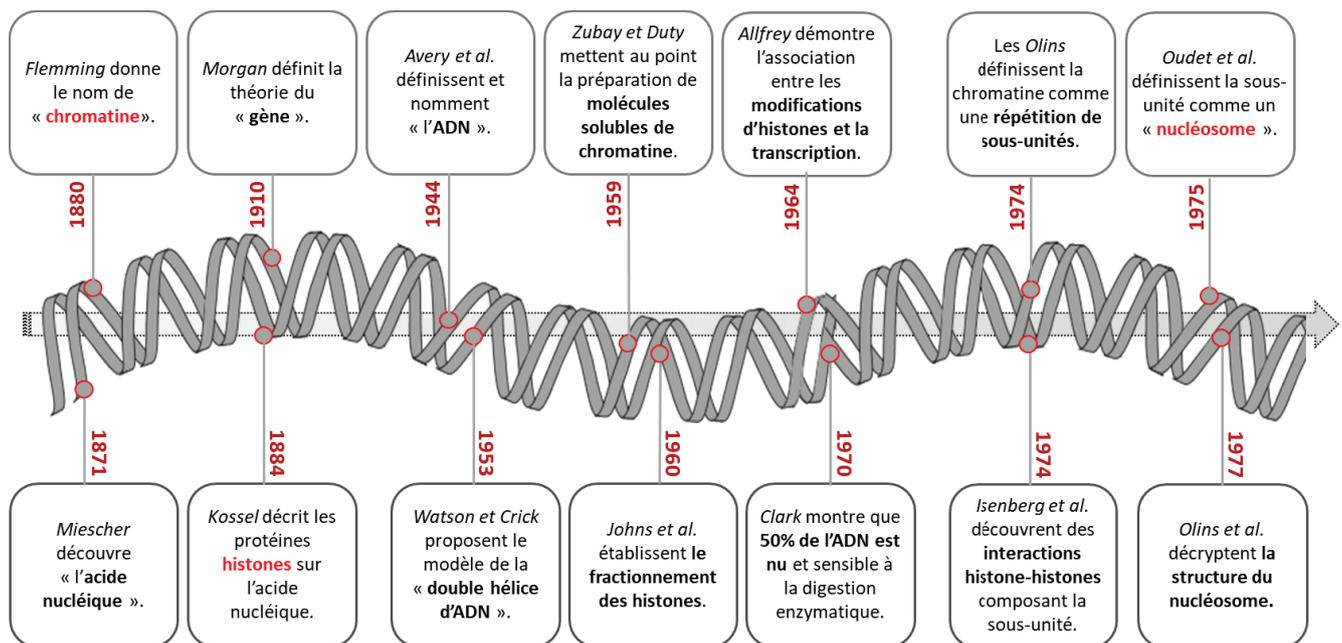


## **Chapitre 1 : La chromatine**

### **1. La découverte de la chromatine**

Fin des années 1870. Le médecin Alexander Flemming est un pionnier dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire. Il concentre notamment ses recherches sur les mécanismes régulant la division des cellules. C'est d'ailleurs lui qui donna le nom de « mitose ». Lors de ses nombreux travaux, il développa plusieurs méthodes expérimentales qui lui permirent de mettre en évidence un échafaudage fibreux nucléaire qu'il appela la chromatine, pour « matériau colorable » (pour revue : Paweletz, 2001). Les années suivantes, les avancées en microscopie, en disponibilité de fixateurs et colorants et en techniques de préparation d'échantillons ont permis d'affiner et de comprendre ce qu'était la chromatine et quel était son rôle dans le noyau. En figure 1 sont listées les découvertes majeures XX<sup>ème</sup> du siècle.

La première moitié du siècle a permis la caractérisation de l'ADN, avec notamment la notion de « gène » comme support de l'hérédité génétique. Bien que Kossel a mis en avant la présence « d'histones » en 1884, il a fallu attendre l'année 1953, et la caractérisation de la structure de l'ADN en double hélice, pour relancer l'intérêt et les recherches sur la composition de la chromatine. Le travail de Zubay et Doty sur la mise au point d'une technique pour solubiliser les molécules de chromatine a permis une avancée technique forte dans le domaine (Zubay and Doty, 1959). On a assisté par la suite au fractionnement des histones et surtout à la démonstration selon laquelle les modifications d'histones étaient corrélées à la transcription de la chromatine (Allfrey et al., 1964). Après que *Clark et Rosenfeld* aient montré que les histones ne sont pas distribuées de manière uniforme sur l'ADN, le groupe des Olins a décrypté l'organisation structurale de la chromatine, composée d'une succession de sous-unités, chacune formées de quatre paires d'histones, complexées à environ 200 paires de base d'ADN double brin (Clark and Felsenfeld, 1971; Olins and Olins, 1974). La même année fut établie l'existence d'interactions entre histones au sein de ces sous-unités, essentielles au maintien de la structure, qui sera nommée « nucléosome » par le groupe de Chambon (Kornberg and Thomas, 1974; Oudet et al., 1975).



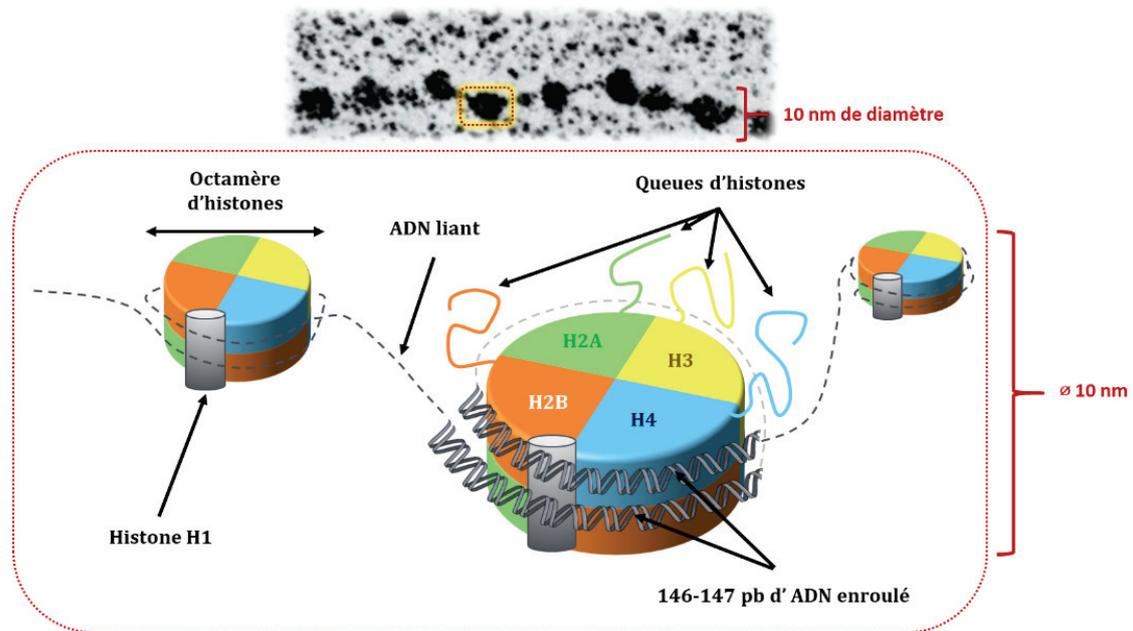
**Figure 1:** Historique des avancées majeures sur l'étude de la chromatine.

Liste non exhaustive des découvertes importantes dans le domaine de l'ADN, avec l'année et les chercheurs correspondants. *Adapté de Olins et Olins, 2003.*

## 2. La structure de la chromatine

### 2.1. Le nucléosome

La chromatine est le premier niveau de compaction de l'ADN chromosomique. Dans cet état, l'ADN est complexé à des protéines, les histones, formant un complexe nucléoprotéique. Son unité de base, le nucléosome, est constituée d'environ 200 paires de bases (bp) d'ADN double brin (la longueur exacte dépend de l'espèce eucaryote), enroulées autour d'un noyau d'octamère d'histones (McGhee and Felsenfeld, 1980). Ce cœur a une structure générale très conservée parmi les espèces. En son sein, 146 pb d'ADN sont enroulées autour d'histones (H2A, H2B, H3 et H4), arrangées sous forme de quatre paires. Chaque nucléosome est lié au suivant par de petits fragments d'ADN de liaison (*DNA linker*) qui, étant dénués de protéines, sont plus sensibles à la digestion par la nucléase. Ces ADNs liants sont associés à l'histone H1, nommée aussi l'histone liante (*H1 linker*) (**figure 2**). La liaison de l'ADN à H1 facilite la condensation de la chromatine en fibres chromatiniennes de 30 nm (Robinson and Rhodes, 2006).



**Figure 2:** La structure d'un nucléosome au sein de la fibre chromatinienne.

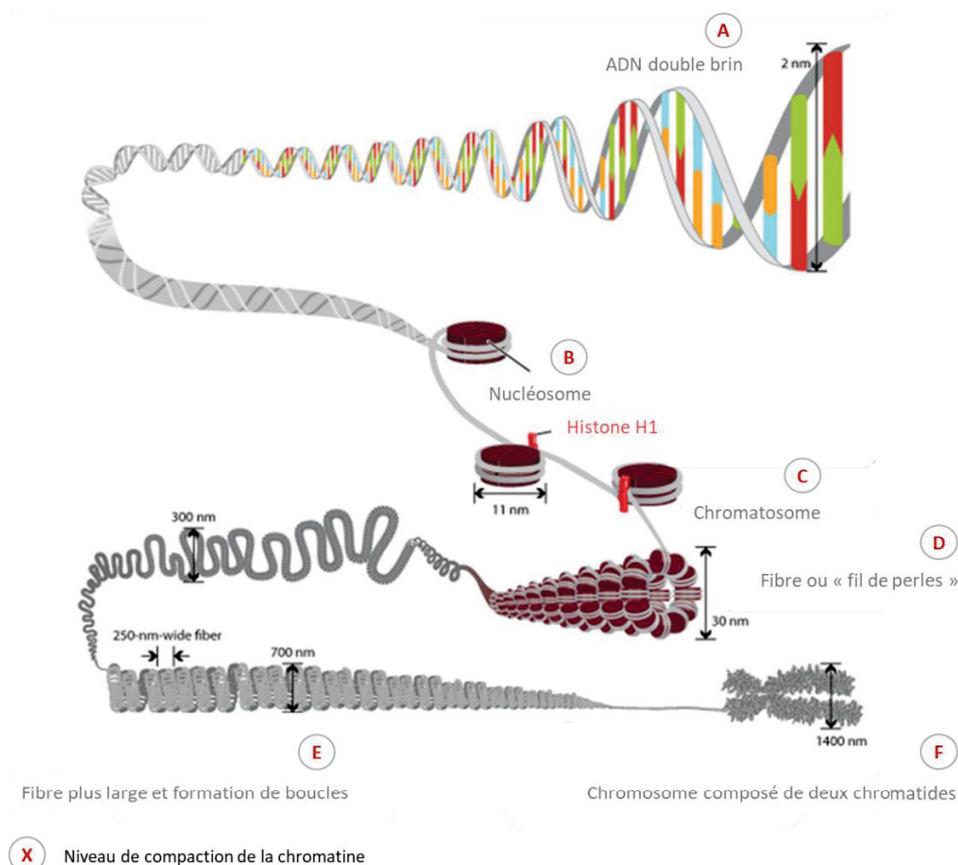
L'image de microscopie électronique représente une fibre de chromatine composée d'une succession de nucléosomes. L'encadré rouge représente un agrandissement schématique d'un nucléosome et de son environnement proche. *Adapté de Olins et Olins, 2003.*

Au sein du nucléosome, chaque octamère d'histones est formé de deux régions, un domaine globulaire et une queue N-terminale. Au cœur de la structure, les histones sont associées par leur domaine globulaire et ce domaine central permet la formation de dimères de type H2A-H2B et H3-H4 (Luger et al., 1997). Les queues d'histones font saillies hors du nucléosome. Elles sont riches en résidus basiques, chargés positivement, contrastant avec la charge négative totale de l'ADN. Elles interagissent avec l'ADN enroulé autour du nucléosome, mais aussi avec l'ADN liant les sous-unités. Ces interactions ADN-queues d'histones joueraient un rôle important dans la formation de structures chromatinienne supérieures (Dorigo et al., 2004).

## 2.2. Les niveaux de compaction de la chromatine

Dans son état le plus simple, la chromatine se présente sous la forme d'une double hélice d'ADN, d'un diamètre d'environ 2 nm (**figure 3A**). Le repliement total du double brin d'ADN (deux mètres de long) dans le noyau nécessite des étapes de compaction. L'ADN s'associe à un octamère d'histones et forme le nucléosome, qui constitue le second niveau d'organisation de la chromatine (**figure 3B**). L'enroulement de l'ADN dans les structures raccourcit d'environ six fois la longueur de la fibre. Chaque nucléosome a un diamètre de 11 nm et une hauteur d'environ 5,5 nm.

L'ajout d'une histone H1 enveloppe 20 nouvelles paires de bases, amenant à deux tours complets d'ADN enroulé de l'octamère et formant le chromatosome (Bharath et al., 2003) (**figure 3C**). Ces nucléosomes se replient pour former une fibre de chromatine de 30 nm de diamètre, qui forme des boucles d'une hauteur moyenne de 300 nm. Appelée aussi « structure d'ordre supérieur », cette fibre en structure hélicoïdale est formée d'une succession de nucléosomes dans leur forme la plus compacte, donnant l'impression d'un « fil de perles » en microscopie électronique (Olins and Olins, 2003) (**figure 3D**). L'histone H1 est très importante pour la stabilisation des structures d'ordre supérieur de la chromatine, les fibres de 30 nm se forment plus facilement en sa présence (Bednar et al., 1998). Ces fibres chromatiniennes continuent d'être comprimées et pliées pour produire une fibre de 250 nm de largeur (**figure 3E**). Le dernier niveau de compaction consiste en l'enroulement étroit et serré de ces fibres en une chromatide de chromosome. Dans son état final, la chromatine se retrouve dans une structure de 1400 nm de hauteur (**figure 3F**). Schématiquement, cela correspond par exemple à une corde aussi longue qu'un terrain de football qui finalement est compacter à moins d'un demi-pouce (Annunziato, A. (2008)).



**Figure 3:** Les différents niveaux de compaction de la chromatine.

*Adapté de Annunziato, 2008 (Nature Education).*

## 2.3. Les composants du nucléosome

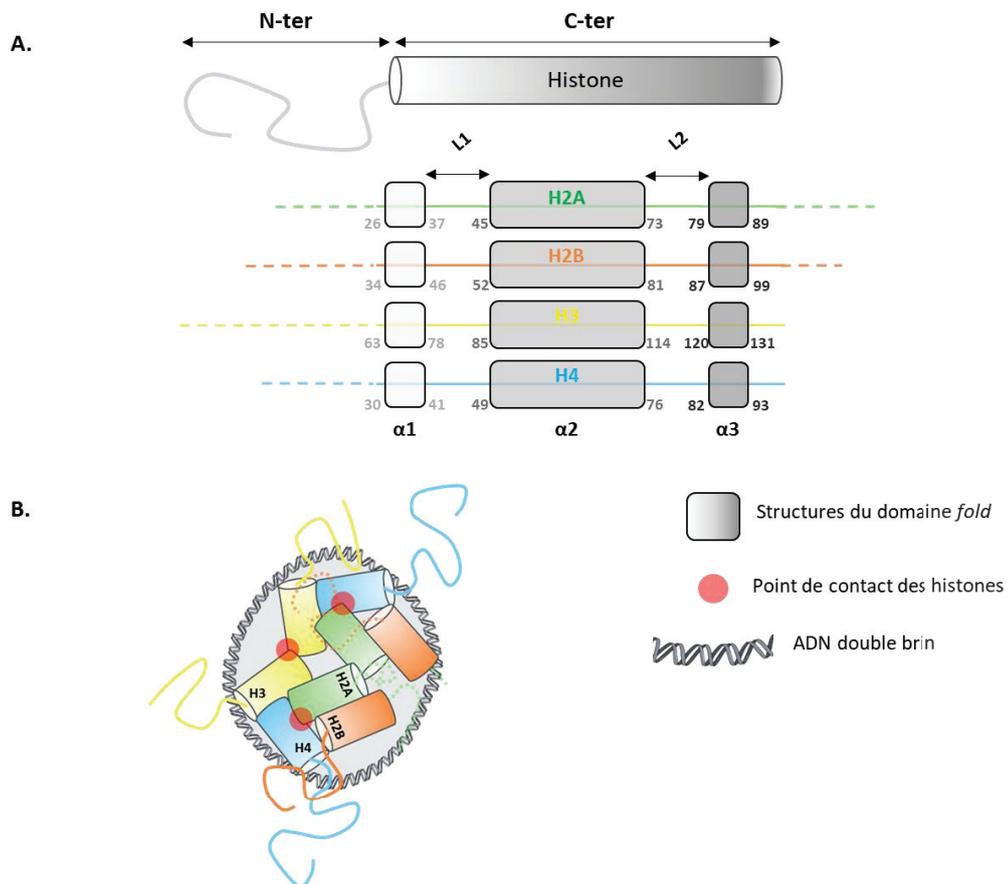
Un nucléosome est composé d'une région centrale formée d'histones, appelée aussi le « cœur », associée à de l'ADN de liaison et des histones H1. Elle reste relativement conservée et similaire entre les différentes espèces eucaryotes. Cette structure n'existe pas chez les procaryotes (Cutter and Hayes, 2015).

### 2.3.1. La structure du cœur octamérique d'histones

La structure interne du nucléosome est composée d'un tétramère d'histones (H3)<sub>2</sub> (H4)<sub>2</sub> et deux dimères H2A-H2B, autour desquels s'enroulent 146 pb d'ADN double brin (Richmond et al., 1984). L'analyse des séquences de ces domaines internes du nucléosome révèle que les histones H3 et H4 forment la paire d'histones la plus conservée parmi les nucléosomes des organismes pluricellulaires.

Les histones sont des protéines de petites tailles (environ 15 kDa maximum) et composées de deux parties. Le domaine N-terminal est extrêmement variable et non structuré en l'absence d'ADN (Davey et al., 2002). Cette région de l'histone est appelée sa queue. Elle fait saillie hors du nucléosome et ne fait donc pas partie de son cœur. À l'inverse, la majeure partie de la masse de l'histone réside dans le domaine C-terminal de la protéine, nécessaire aux interactions histones-histones qui façonnent l'octamère. Cette région permet également l'interaction entre la protéine et l'ADN. Les quatre protéines ont une séquence peptidique primaire peu conservée mais une structure secondaire homologue (**figure 4A**). En effet, elles portent toutes un motif d'environ 65 acides aminés, formé de trois hélices  $\alpha$  reliées par deux boucles, appelé le domaine de repli (ou *fold domain*) de l'histone (Luger et al., 1997). Ce motif de repliement (N-ter,  $\alpha 1$ , L1,  $\alpha 2$ , L2,  $\alpha 3$ , C-ter) est caractéristique de sa partie C-terminale. Il est également devenu une interface d'interaction conservée au cours de l'évolution et se retrouve dans un large répertoire de protéines, principalement liant l'ADN (Baxevanis et al., 1995).

Ce domaine hélicoïdal joue un rôle important dans les interactions entre les histones qui façonnent le cœur du nucléosome (Arents et al., 1991). Les histones H3 et H4 forment un tétramère, par le biais d'interactions entre les H3 (**figure 4B**). Des acides aminés histidine en position C-terminale de l'hélice  $\alpha 2$  reconnaissent des acides aspartiques de la partie N-terminale de l'hélice  $\alpha 3$  et forment des ponts d'hydrogène qui stabilisent la structure. Pour l'autre couple (H2A/H2B), la région L1 d'une histone est suffisamment proche de la région L2 de l'histone partenaire ; il peut alors se créer des ponts d'hydrogène. Enfin, l'octamère est assemblé par association entre l'histone H2B et l'histone H4. L'assemblage de cet octamère requiert la présence d'ADN (Rhodes, 1997).



**Figure 4:** La structure globulaire des histones au sein d'un nucléosome.

**En A**, schéma des structures secondaires de la partie globulaire de chacune des quatre histones composant un nucléosome. **En B**, représentation spatiale des histones, et de leurs interactions, au sein de l'octamère.

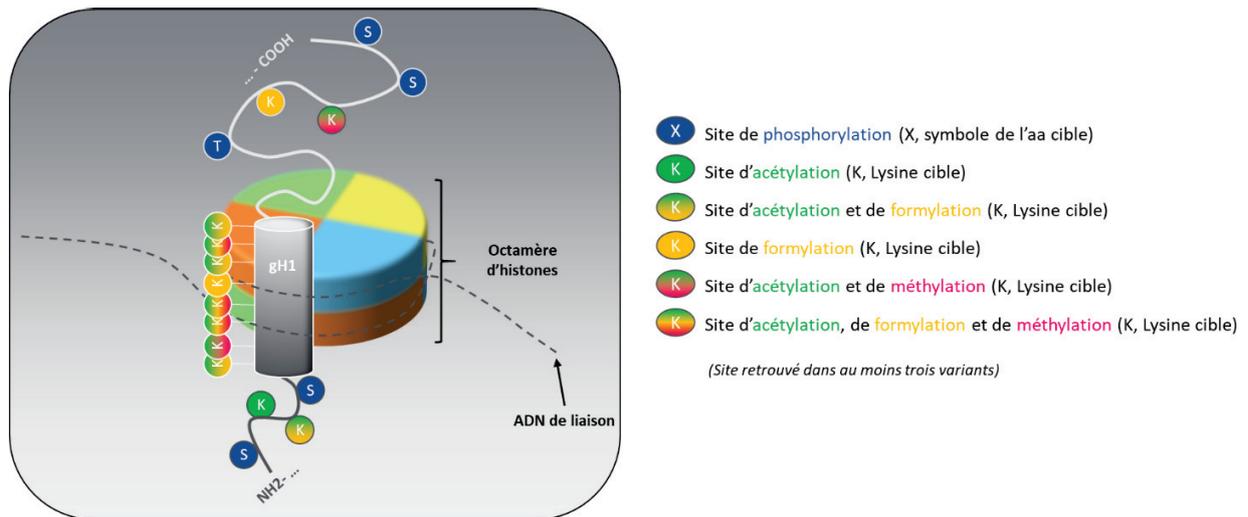
*Adapté de Dutnall et Ramakrishnan, 1997 et Cutter et Hayes, 2015.*

### 2.3.2. L'histone linker H1

#### 2.3.2.1. *Ses propriétés majeures*

L'histone H1 permet de « lier » et de stabiliser l'ADN autour de l'octamère d'histones, d'où son nom d'histone liante (histone *linker*). Elle est considérée comme un composant à part entière du nucléosome et constitue sa cinquième histone, amenant à une structure nommée le chromatosome (Böhm and Crane-Robinson, 1984) (**figure 3C**). Elle participe à la condensation de la fibre chromatinienne. De plus, il a été montré une corrélation entre la présence de H1 sur la chromatine et la présence à cet endroit d'une structure plus condensée, qui limite la liaison de composants de la machinerie de transcription (Weintraub, 1985). Ces protéines sont classiquement composées d'environ 200 acides aminés, structurés en trois parties.

Le domaine N-terminal est relativement court et riche en acides aminés basiques. Le domaine central est le plus conservé de la protéine et possède une structure secondaire de type globulaire, d'où son nom gH1 (**g**lobulaire). L'extrémité C-terminale est la partie la plus longue de H1, composée d'une centaine d'acides aminés et particulièrement enrichie en acides aminés basiques (lysines, prolines et sérines) (Allan et al., 1980) (**figure 5**).



**Figure 5:** La structure de l'histone H1.

Les trois domaines de la protéine sont représentés dans les tons de gris. Les sites majeurs de modifications post-traductionnelles de H1 sont notés et chaque couleur correspond à un type. L'acide aminé ciblé est représenté par son abréviation (Lysine : K ; Sérine : S ; Théronine : T).

*Adapté de Happel et Doenecke, 2009.*

### 2.3.2.2. Les variants H1

Le terme « histone H1 » regroupe en réalité une famille de protéines. Chez les mammifères, les histones H1 sont codées par des gènes qui dérivent tous d'un gène ancestral ayant subi des événements de duplication, pour arriver à la production de variants. Ces protéines paralogues possèdent très généralement la même structure tripartite (Happel and Doenecke, 2009). Il existe 11 sous-types de variants H1, dont cinq gènes majeurs regroupés dans un large *cluster* sur le chromosome 6, et qui codent pour cinq variants, notés H1.1 à H1.5 d'après la nomenclature d'Albig et Doenecke (Albig et al., 1997). Ces protéines sont présentes ubiquitairement dans les cellules somatiques. Les autres variants sont soit régulés par le développement, soit limités à des types cellulaires particuliers, soit encore induits à certains stades de différenciation.

### 2.3.2.3. Les modifications post-traductionnelles des H1s

Diverses modifications post-traductionnelles sur l'histone H1 ont été décrites et semblent réguler la fonction de celle-ci dans sa capacité à condenser la chromatine. Les résidus lysines sont majoritairement acétylés ou méthylés et les sérines sont largement phosphorylées (Wiśniewski et al., 2007) (**figure 5**).

La phosphorylation joue un rôle essentiel dans la structure de la chromatine de manière dépendante du cycle cellulaire. En effet, la forme phosphorylée de H1 colocalise *in vivo* avec l'ADN réplicatif de la phase S du cycle. Toutefois, en mitose, l'histone H1 est importante pour la condensation de la fibre de 30 nm, soit l'effet inverse de la phase réplivative, ainsi que pour l'architecture du chromosome (stade final de condensation de la chromatine) (**figure 3F**) (Maresca and Heald, 2006; Roth and Allis, 1992). L'acétylation du variant majoritaire humain H1.4 induit le recrutement de partenaires amenant à l'activation de la transcription et dans le même temps, réduit l'affinité de H1 sur la chromatine (Kamieniarz et al., 2012). La méthylation de H1 a été nettement moins étudiée. Celle du variant H1.4 fournit une surface de reconnaissance et d'interaction pour la protéine de l'hétérochromatine HP1 $\gamma$  (**Heterochromatin Protein 1 $\gamma$** ). Sa liaison conduit au recrutement de partenaires répressifs inhibant la transcription. De plus, la méthylation de H1.4 est requise pour le maintien du variant sur la chromatine (Trojer et al., 2009). Ainsi, la méthylation de l'histone *linker* semble jouer un rôle dans la répression de la transcription. Enfin, les variants H1s sont également sujets à la N-formylation de lysines. Cette classe d'histones est la plus fréquemment formylée, notamment sur une dizaine de résidus connus pour être impliqués dans la liaison de l'histone à l'ADN (Wiśniewski et al., 2008). De plus, les lysines formylées sont aussi généralement acétylées ou monométhylées et ces modifications sont également connues pour interférer avec la liaison à l'ADN.

En somme, les modifications post-traductionnelles des histones H1 contrôlent la dynamique de la chromatine (condensation et remodelage). Les histones du cœur octamérique sont également la cible de modifications, particulièrement au niveau de leurs extrémités N-terminales.

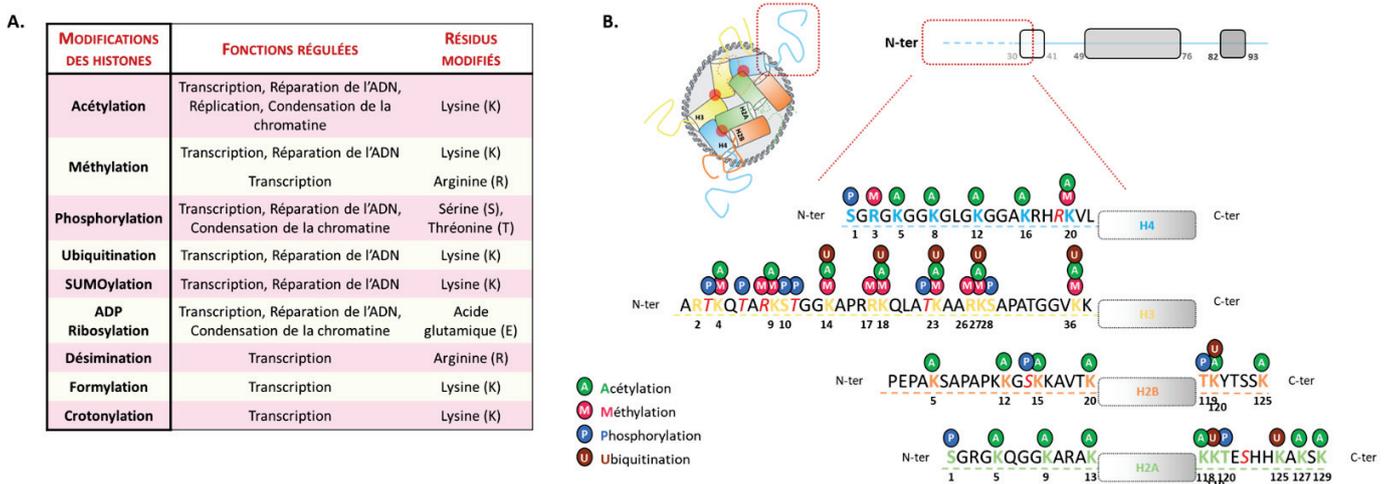
## 2.4. Les queues saillantes des histones

### 2.4.1. Leurs rôles sur la chromatine

Les queues d'histones participent aux interactions entre le nucléosome et l'ADN. En effet, ces extrémités sont chargées positivement et interagissent donc spécifiquement avec les charges négatives de l'ADN (Dutnall and Ramakrishnan, 1997). Ces interactions sont essentielles notamment dans la formation de la structure chromatinienne d'ordre supérieur.

## 2.4.2. Leurs modifications post-traductionnelles

Les queues sont riches en résidus basiques ciblés par de nombreuses modifications post-traductionnelles. Elles régulent majoritairement les interactions entre l'histone et l'ADN, ainsi qu'entre les nucléosomes, et sont impliquées dans d'importants processus cellulaires, comme la réplication et la réparation de l'ADN. De plus, ces modifications servent de signal pour le recrutement des complexes de remodelage de la chromatine et pour le recrutement de cofacteurs. Elles sont donc essentielles à la régulation de l'activation transcriptionnelle (Fischle et al., 2003a; Kouzarides, 2007). Il existe une dizaine de types de modifications post-traductionnelles sur les queues d'histones, dont majoritairement l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination (**figure 6**).



**Figure 6:** Les modifications post-traductionnelles majeures des queues d'histones.

**En A**, tableau non exhaustif des types de modifications répertoriées sur les queues d'histones ainsi que les fonctions cellulaires régulées. **En B**, sont représentés les résidus modifiés les plus étudiés de chacune des queues d'histones. *Adapté de Kouzarides et al., 2007 et Javaid et Choi, 2017.*

### 2.4.2.1. Introduction au « code histone »

Un résidu peut être ciblé par une ou plusieurs modifications. Ces dernières s'établissent de manière dynamique, de façon dépendante d'une multitude de signaux (réponse à un signal, stress, étape du cycle cellulaire, etc.). Cette dynamique est assurée par des enzymes qui modifient les résidus des queues d'histones, mais aussi par celles qui les retirent.

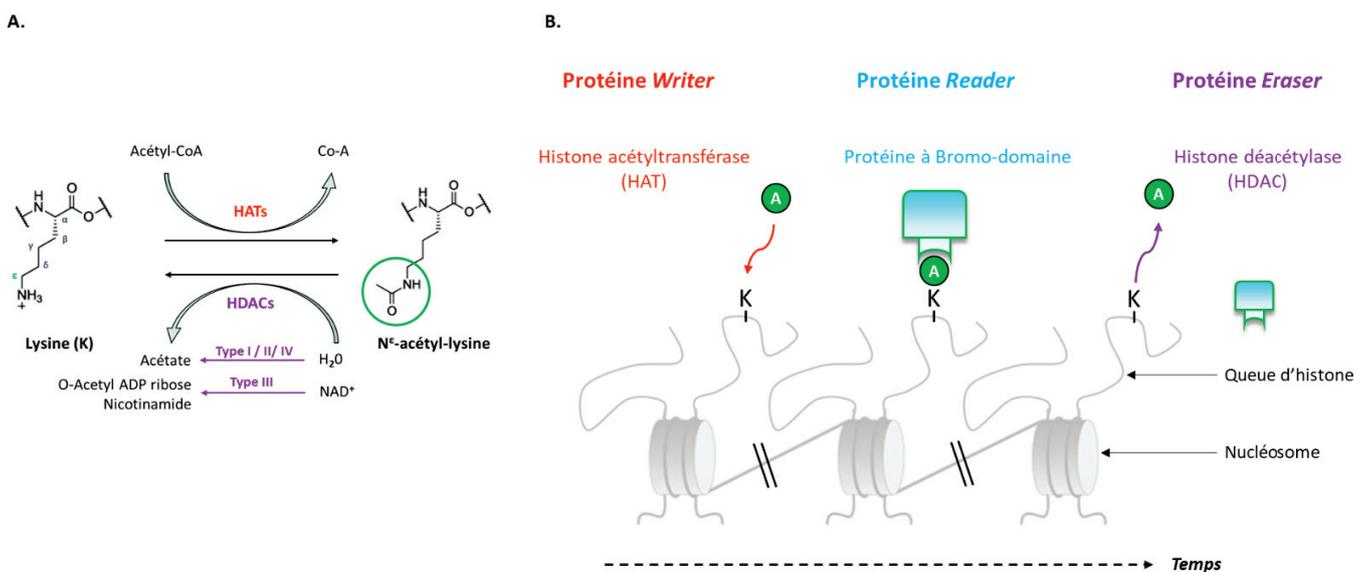
La grande majorité de ces modifications sont des événements transitoires, dépendants de l'action d'enzymes catalysant l'ajout du groupement, les dépositaires, appelées *writers*. Elles apposent la modification qui sera ensuite lue par une autre classe de protéines, les intermédiaires, ou *readers*. Ces dernières contiennent généralement des domaines spécifiques liant un type précis de modification et induisent le recrutement de partenaires permettant la diffusion du signal. Les enzymes *erasers* permettent de retirer le groupement ajouté et contribuent ainsi activement à la rythmique du signal porté par les queues d'histones. L'hypothèse d'un « code histone » prédit qu'une modification préexistante affecte les modifications ultérieures et que ces modifications servent de marques pour le recrutement de complexes protéiques, afin de réguler diverses fonctions sur la chromatine, telles que l'expression génique, la réplication de l'ADN ou la ségrégation chromosomique. Au final, la multitude de signaux sur une seule histone ou sur plusieurs au sein d'un même nucléosome amène à l'établissement d'un profil local et global d'état de la chromatine, qui conduit à la mise en place de fonctions cellulaires (Strahl and Allis, 2000).

#### 2.4.2.2. L'acétylation dynamique des lysines

L'acétylation fut la première modification découverte sur les histones (Allfrey et al., 1964). Elle consiste au transfert d'un groupement fonctionnel acétyle (-CO-CH<sub>3</sub>), d'une molécule substrat nommée acétyl-coenzyme A au groupe amine epsilon ( $\epsilon$ ) du résidu lysine (**figure 7A**) (Di Martile et al., 2016). Deux familles d'enzymes ont été identifiées dans ce processus dynamique, les histones acétyltransférases (HAT, **Histone AcetylTransferase**) qui catalysent cet ajout et les histones déacétylases (HDAC, **Histone DéAcétylases**), qui le retirent (**figure 7A**).

Les lysines acétylées, sur les queues H3 et H4 majoritairement, sont associées aux régions génomiques où la transcription est active, alors que les histones non acétylées se retrouvent généralement associées à des régions réprimées (Grunstein, 1997). La présence d'un groupe acétyle sur une lysine constitue une base de reconnaissance et d'interaction pour un groupe de protéines particulières, porteuses d'un bromo-domaine (**figure 7B**). Cette interaction avec la lysine acétylée constitue souvent le point de départ de formation d'un complexe multi-protéique amenant à l'activation de la transcription (Filippakopoulos et al., 2012). En effet, les protéines à bromo-domaine sont des protéines nucléaires, comme des HATs (PCAF - **P300/CBP-Associated Factor**), des hélicases (**SMARCA - SWI/SNF-related Matrix-associated Actin-dependent Regulator of Chromatin A**) ou encore des coactivateurs transcriptionnels (TIF1 $\alpha$  - **Transcriptional Intermediary Factor 1 $\alpha$** ), protéines retrouvées dans les complexes de remodelage de la chromatine.

L'acétylation joue donc un rôle essentiel dans le changement d'état de la condensation de la chromatine, un moyen efficace de réguler l'activité transcriptionnelle. La chromatine est divisée en deux états. L'euchromatine est caractérisée par une chromatine plus lâche et ouverte, où les gènes sont généralement actifs. A l'inverse, l'hétérochromatine est beaucoup plus compacte et structurée, avec une population clairsemée de gènes souvent réprimés transcriptionnellement (Grunstein et al., 1995). Parmi les lysines acétylées des queues d'histones, H4K16 est essentielle dans la régulation de ce processus d'ouverture. Elle est acétylée dans l'euchromatine et permet de maintenir un état ouvert et propice à la liaison de facteurs transcriptionnels. A l'inverse, sa déacétylation dans les régions hétérochromatiques participe à la condensation de la chromatine et donc à la répression de la transcription (Shahbazian and Grunstein, 2007). Les déacétylases HDACs sont donc elles aussi des acteurs importants dans la condensation/décondensation de la chromatine. Elles sont regroupées en deux familles, en fonction du type de cofacteur enzymatique utilisé (**figure 7A**) (Seto and Yoshida, 2014).



**Figure 7:** L'acétylation dynamique des lysines.

**En A**, schéma de la réaction enzymatique conduisant d'une lysine (K) non modifiée à une lysine acétylée, et réciproquement. Les enzymes impliquées sont indiquées (HAT : Histone AcétylTransférase ; HDAC : Histone DéACétylase). **En B**, schéma représentant le dynamisme de l'acétylation et l'implication des diverses enzymes intervenant dans le « code histone » (une couleur par étape).

Les gènes codant ces protéines sont reportés comme étant mutés dans un grand nombre de cancers, et peuvent agir comme suppresseurs de tumeurs ou comme oncogènes. Les HATs sont également impliquées dans la régulation de cellules souches cancéreuses et jouent donc un rôle évident dans l'initiation tumorale (Di Martile et al., 2016). Ainsi, ces protéines ont fait l'objet d'études pharmacologiques en vue d'établir des thérapies ciblées, dans le traitement de la leucémie, du cancer de la prostate ou encore du cancer du poumon (Uttarkar et al., 2016; Zhong et al., 2014)

#### 2.4.2.3. La méthylation dynamique des queues d'histones

La méthylation est une modification post-traductionnelle retrouvée abondamment sur les queues des histones 3 et 4 (Allfrey et al., 1964). Elle consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>), fourni par le donneur de méthyl SAM (**S-AdénosylMéthionine**, ou AdoMet), sur la chaîne latérale des lysines, mais aussi des arginines, un autre acide aminé basique. Contrairement à l'acétylation, qui n'existe que sous un seul état, il existe plusieurs niveaux de méthylation (simple, double ou triple, symétrique ou asymétrique), ajoutant un niveau supplémentaire de complexité dans le signal (**figures 8A et 9A**) (Javaid and Choi, 2017).

##### 2.4.2.3.1. Le dynamisme de la méthylation des lysines

Ce processus cellulaire dynamique est rythmé par deux catégories d'enzymes, les lysines méthyltransférases ou HKMT (**Histone K (Lysine) MethylTransferase**), qui catalysent l'ajout de groupements méthyles, et les histones lysines déméthylases (HKDM, **Histone K (Lysine) DeMethylase**) qui les retirent. Les HKMTs catalysent le transfert du groupement méthyle sur le groupe amine  $\epsilon$  de la lysine. Le résidu peut être mono-méthylé (ajout d'un seul groupement méthyle sur la lysine), di-méthylé (deux groupes) ou tri-méthylé (trois groupes) (**figure 8A**) (Paik and Kim, 1971).

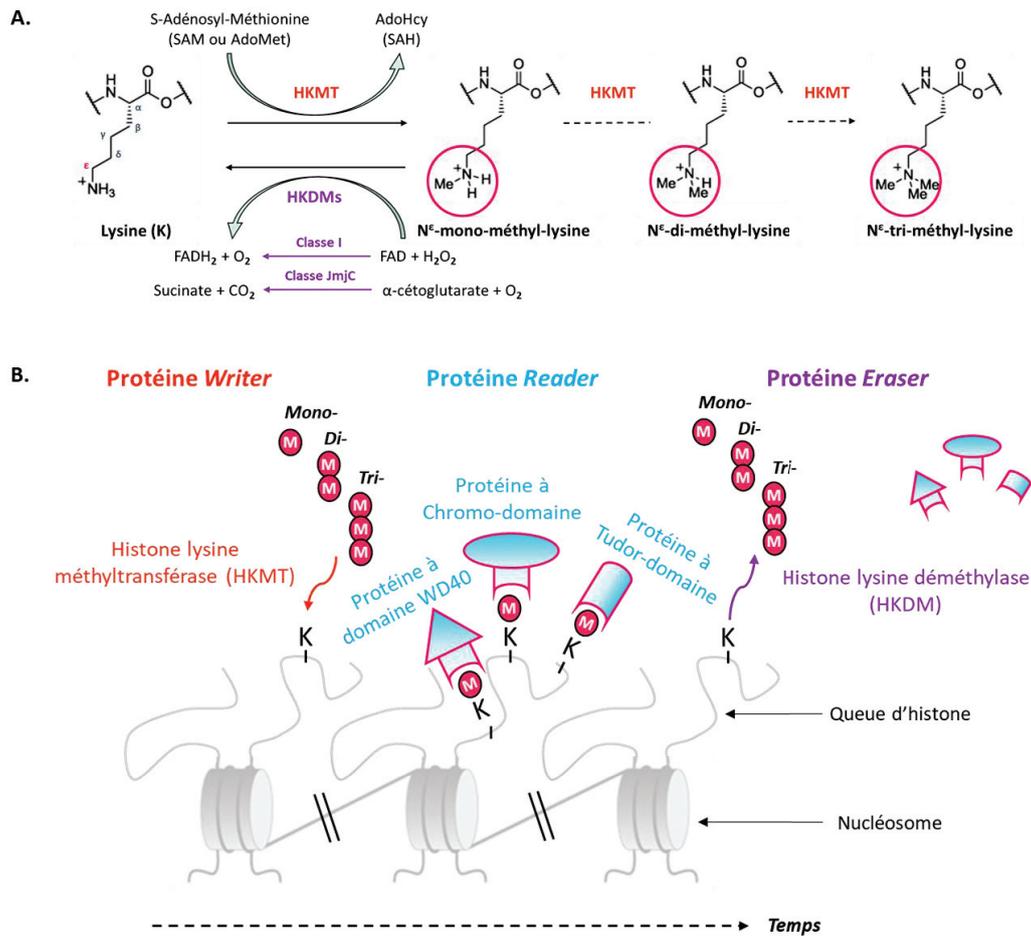
La première HKMT identifiée fut SUV39H1, une enzyme possédant un domaine catalytique SET (**Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax**), domaine découvert chez la Drosophile. La découverte d'autres membres dépendants de SET a conduit à la création de la famille de lysines méthyltransférases aux domaines SET. Cette famille compte une centaine de membres chez les eucaryotes, dont G9a et MLL par exemple (Dillon et al., 2005).

Les lysines méthylées sont reconnues par des régulateurs portants des domaines spécifiques, à savoir le chromo-domaine, le Tudor domaine et le domaine à répétition WD40 (**figure 8B**) (Bannister et al., 2001; Fischle et al., 2003b; Huyen et al., 2004; Wysocka et al., 2005).

Contrairement à l'acétylation qui neutralise la charge négative du résidu, la méthylation n'impacte pas la charge. C'est donc majoritairement par la liaison de *readers* que la méthylation de lysines induit ses effets. Ces domaines spécifiques de reconnaissance sont retrouvés dans des protéines impliquées dans la régulation de l'activation de la transcription, de la réplication de l'ADN, de sa réparation, etc. Par exemple, la tri-méthylation (me<sub>3</sub>) de l'histone 3 sur la lysine 4 (H3K4me<sub>3</sub>) est lue par le domaine PHD (**Plant HomeoDomain**) de la protéine BPTF (**Bromodomain and PHD domain Transcription Factor**). Cette dernière est une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine NuRF (**Nucleosome Remodelling Factor**) et est généralement liée à l'activation de la transcription (Li et al., 2006).

Toutefois, contrairement à l'acétylation, la méthylation de lysines est également impliquée dans la répression génique et dans la formation de l'hétérochromatine. SUV39H1 et G9a sont responsables de la tri-méthylation de H3K9. Cette marque est reconnue par le chromo-domaine de la protéine HP1 $\gamma$ , retrouvée sur les régions hétérochromatiques (Platero et al., 1995). L'association H3K9me<sub>3</sub>/HP1 $\gamma$  joue un rôle majeur dans l'assemblage et le maintien d'une chromatine compacte (Nakayama et al., 2001). Le résidu H3K9 est d'ailleurs un bel exemple de la dynamique des modifications post-traductionnelles des queues d'histones. En effet, sa tri-méthylation est une marque d'hétérochromatine et se trouve associée à la répression de la transcription, alors que son acétylation est corrélée aux régions transcriptionnellement actives. Sa méthylation par SUV39H1 est dépendante de l'activité préalable d'histones déacétylases, événement prérequis libérant la lysine de son groupe acétyle et permettant ainsi l'accès à la méthyltransférase. Elle peut alors participer à la condensation du chromosome et donc à la répression de la transcription (Park et al., 2011).

La dynamique du signal induite par la méthylation est assurée par l'intervention des déméthylases, retrouvées dans de larges complexes protéiques. La première histone déméthylase, LSD1 (**Lysine-Specific Demethylase-1**), aussi appelée KDM1A (**lysine (K)-specific DeMethylase 1A**) fut découverte en 2004 seulement, et catalyse le retrait de groupements mono- et di-méthyles sur H3K4 (Shi et al., 2004). Elle appartient aux enzymes de classe 1, les amines oxydases, qui utilisent la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur (**figure 8A**). Les enzymes de la seconde classe se distinguent des KDM1 par leur dépendance au fer et à l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique comme cofacteurs pour leur activité. Notées KDM2 à KDM6, elles possèdent toutes un domaine catalytique particulier nommé Jumonji-C (abrégé JmjC, mot japonais désignant la forme « cruciforme ») (**figure 8A**). On les nomme histones déméthylases à domaine Jumonji, ou JHDM (**Jumonji Histone DeMethylases**) (Takeuchi et al., 1995; Tsukada et al., 2006). Certaines sont capables de coopérer avec LSD1 dans la déméthylation de résidus, c'est le cas notamment pour la marque H3K9me<sub>3</sub>.



**Figure 8:** La méthylation dynamique des lysines.

**En A**, schéma de la réaction enzymatique conduisant d'une lysine (K) non modifiée à une lysine méthylée, et réciproquement. Les enzymes impliquées sont indiquées (HKMT: Histone K MethylTransferase ; HKDM: Histone K (Lysine) DeMethylase). Il existe trois états de méthylation pour la lysine. **En B**, schéma représentant le dynamisme de la méthylation et les diverses protéines du « code histone » (une couleur par étape).

La méthylation d'histones est impliquée dans des évènements cellulaires variés, incluant notamment la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN ou encore la régulation du cycle cellulaire (Pedersen and Helin, 2010). Des mutations ou des défauts dans la régulation et l'activité de ses acteurs sont souvent corrélés à une augmentation de l'incidence de pathologies, et notamment les cancers. Par exemple, la lysine méthyltransferase EZH2, qui catalyse la tri-méthylation de H3K27, est généralement considérée comme une protéine oncogène, son activation aberrante étant associée au développement de lymphome à cellules B ou à une augmentation de l'agressivité de cancer du sein (Bachmann et al., 2006; Kleer et al., 2003; Visser et al., 2001).

De plus, les gènes codant les méthyltransférases et déméthylases se trouvent souvent sur des sites de translocations chromosomiques et donnent lieu à la formation de protéines fusions aux propriétés cancérigènes. C'est le cas par exemple de la protéine MLL (**Mixed-Lineage Leukemia**), qui méthyle le résidu H3K4 notamment. Son gène codant, *MLL1*, subit une translocation chromosomique dans environ 80 % des leucémies infantiles, résultant en une protéine fusion incapable de contrôler la régulation transcriptionnelle de ses gènes cibles, et participant ainsi à la transformation tumorale (Ayton and Cleary, 2001).

#### 2.4.2.3.2. La méthylation d'arginines

##### 2.4.2.3.2.1. Introduction

L'arginine est le second acide aminé méthylé sur les queues d'histones. Il peut être mono- ou di-méthylé. De plus, contrairement aux lysines, il existe la possibilité d'une double conformation de di-méthylation, soit symétrique, soit asymétrique (Bedford and Clarke, 2009). En effet, l'arginine est méthylable sur le groupement guanidine du ou des atome(s) d'azote(s), à l'extrémité de sa chaîne latérale. Il en résulte ainsi trois conformations possibles de méthylation : de la mono-méthylation (MMA, **MonoMethylArginine**), de la N<sup>G</sup>-N<sup>G</sup>-di-méthylation (les deux groupes méthyles sont ajoutés sur le même atome d'azote), appelée di-méthylation asymétrique (ADMA, **Asymmetric DiMethylArginine**), et de la N<sup>G</sup>-N<sup>G'</sup>-di-méthylation, ou di-méthylation symétrique (SDMA, **Symmetric DiMethylArginine**). Dans ce dernier cas, chacun des deux atomes d'azote reçoit un groupement méthyle (**figure 9A**).

##### 2.4.2.3.2.2. Les histones arginine méthyltransférases (PRMTs)

Basé sur la nature des réactions qu'elles catalysent, les arginines méthyltransférases ou PRMTs (**Protein R(Arginine) MethylTransferases**) ont été divisées en trois groupes. Les PRMTs de type I permettent la mono-méthylation et la di-méthylation asymétrique, tandis que les PRMTs de type II sont également responsables de mono-méthylation, mais aussi de di-méthylation symétrique. Les PRMTs de type III génèrent uniquement des arginines mono-méthylées (**figure 9A**). Toutes ces enzymes utilisent le SAM comme donneur de groupes méthyles pour catalyser la méthylation du groupe guanidine de l'arginine, groupe qui lui confère son caractère très basique. La récupération du groupe méthyle par déméthylation du SAM entraîne la formation d'un dérivé enzymatique, le SAH (**S-Adénosyl-l-Homocystéine** ou AdoHcy) (**figure 9A**) (Gary et al., 1996). À l'heure actuelle, neuf PRMTs ont été identifiées et caractérisées chez les mammifères (PRMT1-9) (Krause et al., 2007). Cette famille de protéines est hautement conservée parmi les eucaryotes (*S. cerevisiae*, *Arabidopsis* ou encore *Caenorhabditis elegans* possèdent des gènes codant les PRMTs). Ces gènes représentent plus de 1% de leur génome total (Katz et al., 2003).

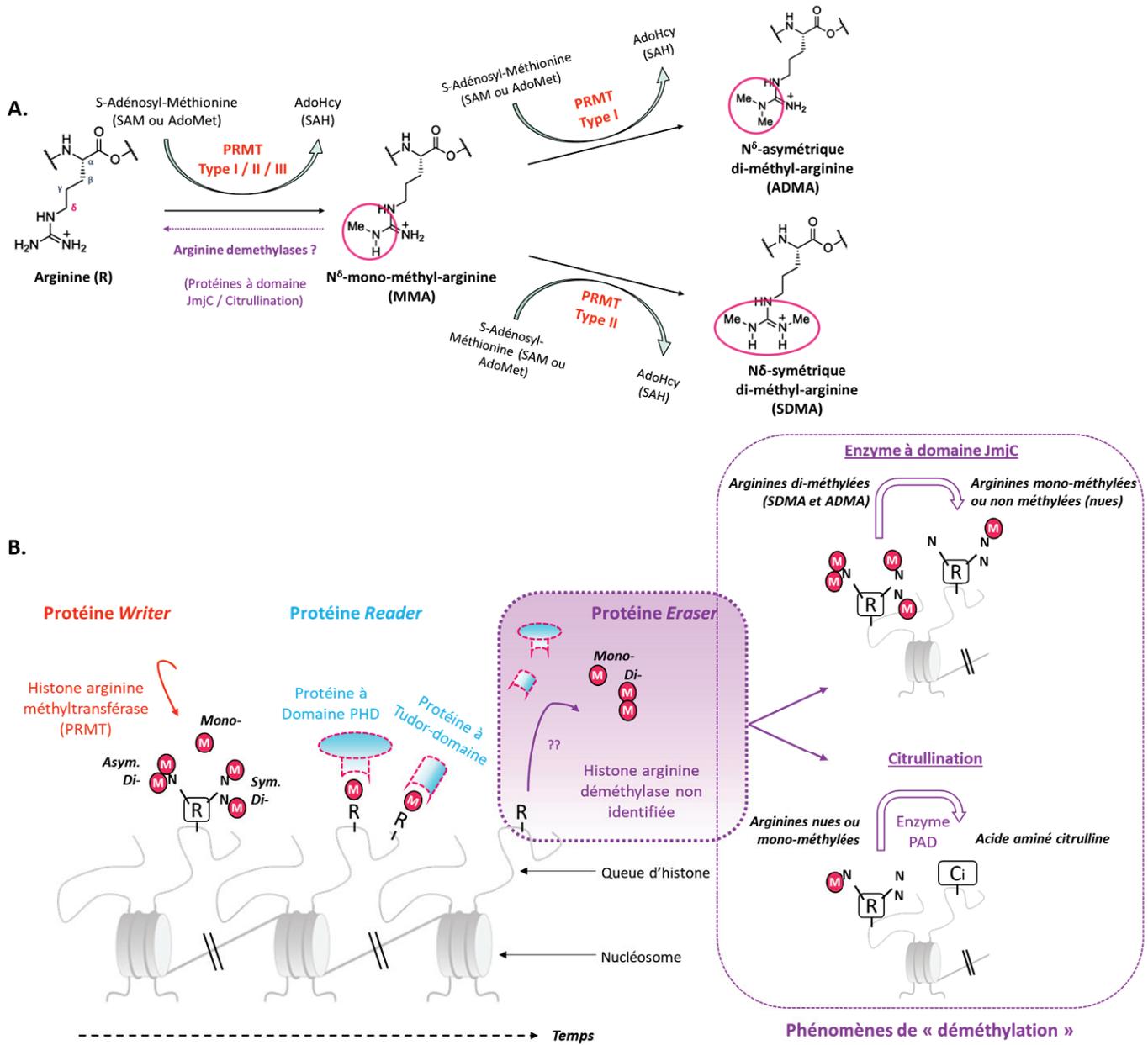
La sous-famille de PRMT de type I est la plus large et regroupe les PRMTs 1, 2, 3, 4, 6 et 8. PRMT1 fut la première enzyme découverte chez les mammifères, par recherche d'homologie avec l'arginine méthyltransférase de levure Hmt1/Rmt1. Elle est l'enzyme de type I prédominante dans les cellules de mammifères, responsable à elle-seule d'environ 85% du niveau total d'arginines di-méthylées asymétriquement (Tang et al., 2000). Elle di-méthyle *asymétriquement* l'histone H4 sur l'arginine 3 (H4R3me<sub>2</sub>as) (Strahl et al., 2001). L'autre PRMT majeure de ce groupe est PRMT4, notée également CARM1 (**C**oactivator-**A**ssociated **R**(arginine) **M**ethyltransferase **1**), qui méthyle préférentiellement l'histone 3 sur les arginines 17 et 26 et, en moindre mesure, sur l'arginine 2. PRMT6 est une autre PRMT de type I qui méthyle *in vivo* l'arginine 2 de l'histone H3 (H3R2). *In vitro*, il a été démontré sa capacité à méthyle l'arginine 3 de l'histone 4 (H4R3), mimant ainsi PRMT1. Enfin, comme PRMT1, PRMT2 semble être impliquée dans la méthylation de la queue de l'histone 4 mais le(s) résidu(s) cible(s) n'a(ont) pas encore été identifié(s) (Lakowski and Frankel, 2009). PRMT3 est localisée dans le cytoplasme et ne semble donc pas jouer de rôle dans les modifications d'histones. PRMT8 elle, est majoritairement restreinte au cerveau (Lee et al., 2005a).

La majeure PRMT de type II exprimée dans les cellules de mammifères est PRMT5. Elle est responsable de la di-méthylation symétrique du résidu H4R3 (H4R3me<sub>2</sub>s), la même cible que PRMT1 (ainsi que H2AR3), mais méthyle également H3R8 (Fabrizio et al., 2002). L'autre PRMT de ce groupe est PRMT9 mais celle-ci est nettement moins bien caractérisée. À l'origine, la nomenclature « PRMT9 » référerait au produit du gène *FBXO11*, bien que ce dernier ne code probablement pas pour une PRMT. Un des isoformes de PRMT9/FBXO11, le plus court en taille (isoforme 4), possède une activité méthyltransférase de type II et serait capable de di-méthyle *in vitro* H2A et H4 (Cook et al., 2006).

La troisième sous-famille de PRMT est responsable de mono-méthylation uniquement. PRMT7 est à l'heure actuelle le seul membre de ce groupe. Elle méthyle H4R3 et H2AR3, les mêmes cibles que PRMT5 (Lee et al., 2005b).

Deux dernières PRMTs ont été identifiées, PRMT10 et PRMT11, basées sur leur homologie de séquences avec PRMT7 et PRMT9, respectivement (Krause et al., 2007). Leur activité méthyltransférase et leurs fonctions dans la cellule ne sont encore pas connues.

Enfin, il existe un quatrième sous-groupe de PRMT, chez la levure uniquement, les PRMTs de type IV, capables de mono-méthylation du groupement guanidine de l'azote interne de l'arginine (Niewmierzycka and Clarke, 1999). Cependant, aucun homologue n'a été encore découvert chez les mammifères.



**Figure 9:** Le mécanisme de méthylation des arginines.

**En A**, schéma de la réaction enzymatique conduisant d'une arginine (R) non modifiée à une arginine méthyliée, et réciproquement. Les PRMTs catalysent trois types de méthylation pour l'arginine (MMA, ADMA ou SDMA). **En B**, schéma représentant le dynamisme de la méthylation et l'implication des diverses protéines intervenant dans le « code histone » (une couleur par étape).

Nous nous focaliserons sur PRMT1 dans la suite du manuscrit (cf. page 74).

#### 2.4.2.3.2.3. Les protéines adaptatrices

Les *readers* liant les arginines modifiées possèdent des domaines Tudor (**figure 9B**). Ces derniers sont généralement constitués d'environ 60 acides aminés, structurés en quatre feuillets  $\beta$  antiparallèles. Ils forment une sorte de cage aromatique, créant la poche de liaison qui permet une interaction forte avec le carbone cationique de l'arginine modifiée (Pek et al., 2012). Par leur similarité de séquences et de structures, ces domaines sont liés aux domaines chromo- (**CHR**omatin **OR**ganization **MO**difier), MBT- (**M**alignant **B**rain **T**umor) ou encore PWWP, composant tous la « superfamille des domaines royaux », reconnaissant spécifiquement les lysines et arginines méthylées (Maurer-Stroh et al., 2003). En effet, les domaines Tudors ne sont pas spécifiques des arginines puisqu'ils reconnaissent aussi les lysines méthylées. Néanmoins, il semblerait que la cage formée par les domaines Tudors liant les arginines soit plus étroite que celle formée par les domaines reconnaissant les lysines, permettant la spécificité de substrat (Gayatri and Bedford, 2014). TDRD3 est une protéine *reader* à domaine Tudor qui, par sa capacité à lire les marques H4R3me2a, H3R17me2a et H3R2me2a, participe activement à la dynamique de la chromatine (Yang et al., 2010).

De plus récentes études laissent penser que d'autres domaines protéiques soient capables de lier les arginines méthylées. La marque H4R2me2s, déposée par PRMT5, serait lue par le domaine PHD de la méthyltransférase DNMT3A (Zhao et al., 2009). Cette étude est appuyée par celle du groupe de Wang, qui publie que cette même marque serait également reconnue par le domaine PHD de PHF1 (**P**lant **H**omeodomain **F**inger **p**rotein **1**) (Liu et al., 2018) (**figure 9B**). PRMT5 méthyle également H3R2me2s, marque reconnue par le domaine WD40 de la protéine WDR5, un composant de complexes activateurs de la transcription, dont MLL (Migliori et al., 2012).

#### 2.4.2.3.2.4. Les rôles sur la chromatine

Comme pour la méthylation de lysine, l'ajout covalent d'un groupe méthyle sur arginine ne modifie pas la charge du résidu, mais plutôt sa forme. La di-méthylation donne une chaîne latérale plus volumineuse et augmente l'hydrophobicité globale du résidu (Fuhrmann et al., 2015). Ces deux conséquences peuvent notamment interférer dans ses interactions avec l'ADN et avec d'autres protéines, dont ses *readers*, qui lient uniquement l'arginine si elle est modifiée. Certaines d'entre elles ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque, mais permettent la liaison de complexes protéiques. C'est le cas par exemple de TDRD3 qui, par sa capacité à lier les arginines di-méthylées, agit comme un coactivateur transcriptionnel, et régule le potentiel invasif des cellules tumorales mammaires (Morettin et al., 2017).

PRMT5, à l'inverse, est considérée comme un répresseur de la transcription notamment parce qu'elle participe à des complexes de remodelage de la chromatine, associée à des répresseurs d'histones déacétylases, comme le complexe NuRD (**N**ucleosome **R**emodelling and **D**eacetylase) (Le Guezennec et al., 2006). De plus, les deux marques qu'elles déposent (H4R3me2s et H3R8me2s) sont retrouvées, par expériences de ChIP, dans des régions répressives sur de nombreux gènes cibles (Wang et al., 2008). H4R3me2s est reconnue par la méthyltransférase DNMT3a qui, une fois liée, méthyle l'ADN et renforce localement la répression génique (Zhao et al., 2009).

De plus, il existe une communication fonctionnelle forte entre modifications. Par exemple, la présence de la marque H4R3me2as, déposée par PRMT1, facilite et induit l'acétylation de cette même queue par la lysine acétyltransférase p300, l'acétylation étant associée à l'activation de la transcription médiée par les récepteurs nucléaires (Wang et al., 2001). Cette relation fait de PRMT1 un coactivateur transcriptionnel. PRMT2, *in vitro*, méthyle l'histone H4 comme PRMT1, ce qui suggère que cette enzyme puisse également agir comme coactivateur (Lakowski and Frankel, 2009). Cette hypothèse est vérifiée par l'étude de Meyer et al., démontrant que PRMT2 est impliquée dans l'activation de la transcription dépendante du récepteur à l'androgène (**A**ndrogen **R**eceptor, AR) (Meyer et al., 2007). Ainsi, la méthylation d'histones sur arginines participe largement au « code histone » et à la dynamique de la chromatine, notamment par une communication entre les marques des queues d'histones.

#### 2.4.2.3.2.5. La méthylation d'arginines, un phénomène réversible ?

Contrairement à la méthylation de lysines, la méthylation d'arginines semble être une modification permanente. Aucune arginine déméthylase n'a pour le moment été clairement identifiée, ou acceptée unanimement par la communauté scientifique, bien que plusieurs travaux publiés suggèrent l'inverse.

L'hydroxylase JMJD6 (**JuMonJi Domain-containing protein 6**), une enzyme au domaine Jumonji, est capable de retirer des groupements méthyles des formes mono- et di-méthylées de H3R2 et H4R3, *in vitro* et *in vivo* (Chang et al., 2007). Cependant, ces résultats restent controversés, d'autres équipes ayant testé cette hypothèse et ne parvenant pas à la même conclusion que le groupe de Chang (pour revue: Böttger et al., 2015). De plus, l'étude de la structure de cette enzyme ne permet pas de conclure avec certitude sur ses capacités de déméthylation. Enfin, JMJD6 ne serait pas capable de déméthyliser les autres marques (H3R8me2s, H3R17me2as, ...), ce qui suggère que d'autres enzymes soient impliquées. Néanmoins, l'hypothèse de déméthylation par les protéines à domaine Jumonji n'est pas à exclure totalement.

Un travail plus récent a démontré que des formes recombinantes des lysines déméthylases (KDM) à domaine Jumonji possèdent également une activité de déméthylation d'arginines (Walport et al., 2016). Les auteurs de cette étude ont remplacé les lysines méthylées par des arginines méthylées sur les substrats habituels des KDM (H3K9R et H3K4R par exemple). Les KDM3A, KDM4E et KDM5C catalysent la déméthylation de ces arginines di-méthylées symétriquement et asymétriquement, et donnent un ensemble de résidus mono-méthylés et non méthylés (**figure 9B**). Ainsi, cette étude relance la question sur l'existence d'une ou plusieurs arginines déméthylases fonctionnelles pour les queues d'histones. Néanmoins, la capacité de JMJD6 à déméthyler des arginines de protéines non-histones ne fait aucun doute, et sera abordée ultérieurement (cf. page 85).

Un second processus enzymatique a été démontré comme capable de « bloquer » la méthylation d'arginine, la désimination ou citrullination. Cette réaction consiste en la conversion d'arginines « nues » (non méthylées) ou mono-méthylées, en citrulline, un acide aminé non conventionnel, et non méthylable (**figure 9B**) (Cuthbert et al., 2004). Les arginines sont reconnues par une famille de protéines appelées les PADs (**P**eptidyl-**A**rginine **D**eiminases). PAD4 est localisée dans le noyau et cible les mêmes arginines que les PRMTs. Il a d'ailleurs été démontré un rôle de cette enzyme, par sa capacité à désaminer H3 et H4, dans la décondensation de la chromatine (Wang et al., 2009). Toutefois, bien que ces enzymes soient capables d'empêcher la méthylation d'arginines en les modifiant par citrullination, elles ne peuvent pas « déméthyler » des résidus di-méthylés et ne sont donc pas considérées comme de véritables arginines déméthylases.

#### 2.4.2.3.2.6. Ouverture : implication dans la tumorigénèse

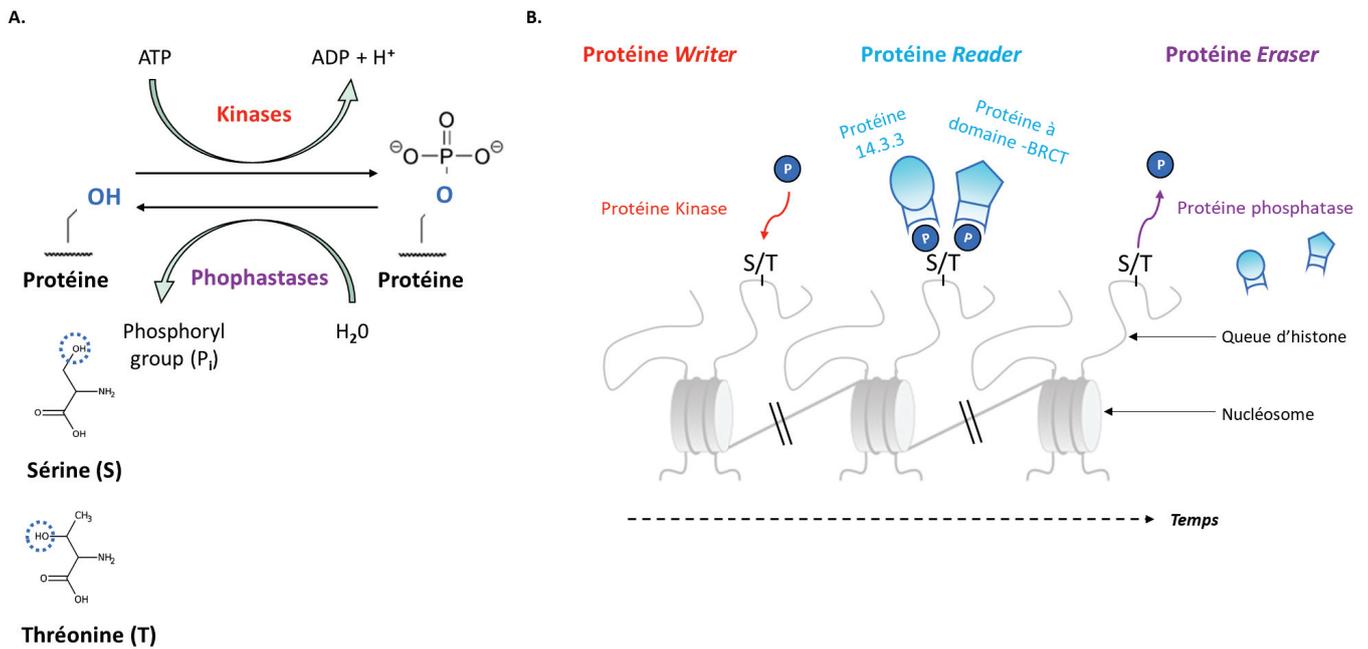
De nombreuses études sur des souris transgéniques dans lesquelles les gènes spécifiques des PRMTs ont été mutés ont permis de mieux comprendre leur rôle dans le développement physiologique. L'inhibition totale de PRMT1 et PRMT5 engendrent une létalité embryonnaire chez la souris, ces deux enzymes étant essentielles au maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires. PRMT5 notamment, réprime l'expression de gènes codant pour la différenciation (Tee et al., 2010). CARM1/PRMT4 est aussi impliquée dans la régulation épigénétique de la pluripotence et de l'auto-renouveaulement des cellules par sa capacité à méthyler les résidus de l'histone H3. En effet, la surexpression de cette enzyme engendre une augmentation du niveau de la transcription de gènes comme *Nanog* et *Sox2* (Torres-Padilla et al., 2007). Les souris délétées des gènes codant pour PRMT2, PRMT3, PRMT6 et PRMT8 sont viables mais présentent divers effets phénotypiques (pour revue: Blanc and Richard, 2017).

L'implication des PRMTs dans le développement suggère également un rôle important de ces enzymes dans l'apparition et/ou la progression de pathologies, et notamment les cancers. En effet, elles sont surexprimées dans différents types tumoraux. Par leur capacité à méthyler les queues d'histones mais aussi des protéines non-histones (cette partie sera discutée plus loin dans le manuscrit, cf. page 80), les PRMTs sont devenues d'intéressantes cibles thérapeutiques et plusieurs inhibiteurs pharmacologiques ont vu le jour. PRMT5 est l'une des enzymes impliquées dans le plus grand nombre de types tumoraux différents (leucémie, lymphome, glioblastome, cancer du poumon, etc.) (Blanc and Richard, 2017). Un inhibiteur spécifique de son activité, le GSK3235025, a été mis au point et devrait permettre de mieux comprendre son rôle, notamment dans le développement de lymphomes.

PRMT1 est aussi dérégulée dans divers types de cancers. Elle est notamment impliquée dans la progression et le développement de métastases d'un sous-type de cancer du poumon (NSCLC, **Non-Small-Cell Lung Carcinoma**), la méthylation étant liée à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, **Epithelial-to-Mesenchymal Transition**). Dans le sein, le dépôt de la marque H4R3me2as entraîne l'activation transcriptionnelle du gène *Zeb1* dans les cellules tumorales mammaires et confirme que PRMT1 soit un régulateur de l'EMT (Gao et al., 2016). Le groupe d'*Eram et al.* a développé le premier inhibiteur sélectif de la diméthylation asymétrique, capable de traverser la membrane plasmique et d'agir dans la cellule, le MS023 (Eram et al., 2016). Cette découverte va permettre le lancement d'un grand nombre d'études, *in cellulo* et *in vivo*, visant à décrypter l'implication de la méthylation dépendante de PRMTs de type I dans le développement des cancers et autres pathologies.

#### 2.4.2.4. *La phosphorylation dynamique des histones*

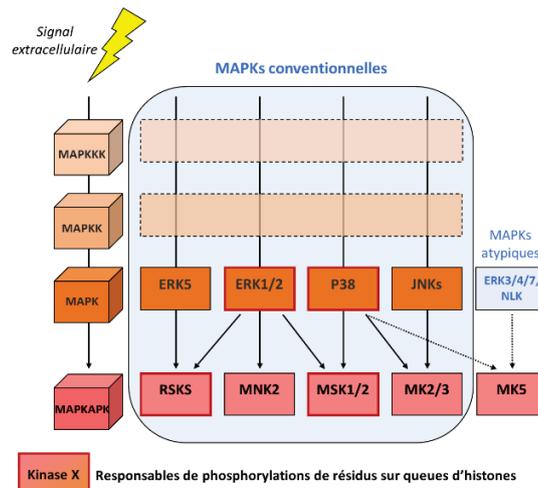
La phosphorylation est un phénomène dynamique, dépendant de l'action de deux classes d'enzymes. Les premières, les kinases, permettent le transfert d'un groupement phosphate ( $-PO_3^{2-}$ ), de l'ATP (le donneur) aux différents acides aminés receveurs des queues d'histones, à savoir les sérines (Ser, S) et les thréonines (Thr, T). Ce processus modifie la charge du résidu, par l'ajout d'une charge négative emmenée par le phosphate, ce qui influence la structure de la chromatine (North et al., 2011). La seconde classe d'enzymes impliquées dans cette modification regroupe les phosphatases, qui catalysent le retrait des groupes phosphates (**figure 10A**).



**Figure 10:** La phosphorylation dynamique des résidus de queues d'histones.

**En A**, schéma de la réaction enzymatique conduisant d'une sérine (S) ou thréonine (T) non modifiée à un résidu phosphorylé, et réciproquement. **En B**, schéma représentant le dynamisme de la phosphorylation et l'implication des diverses protéines intervenant dans le « code histone » (une couleur par étape).

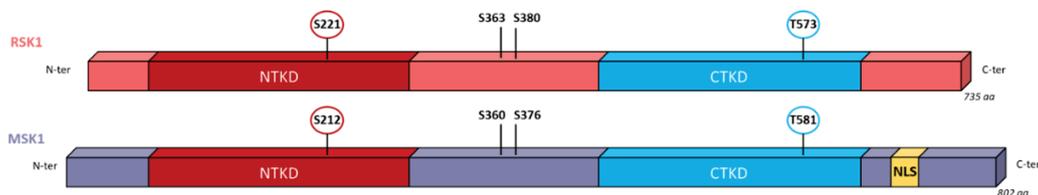
Les kinases majoritairement impliquées dans la phosphorylation des résidus de queues d'histones appartiennent à la famille des MAPKs (**Mitogen-Activated Protein Kinases**). Chez les mammifères, on comptabilise quatre sous-groupes de kinases dites « conventionnelles » : les enzymes ERK1/2 (**Extracellular signal-Regulated Kinases 1 & 2**), les kinases JNK (**c-Jun N-terminal Kinase**), ERK5 (**Extracellular signal-Regulated Kinases 5**) et le dernier qui regroupe les isoformes de la MAPK p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) (Josefowicz et al., 2016). Il existe également des MAPK dites « atypiques » (**figure 11**). L'activation des MAPKs conventionnelles est un processus séquentiel en trois étapes (**figure 11**) (Cargnello and Roux, 2011). Les enzymes de cette voie régulent un large répertoire de substrats, dont d'autres Ser/Thr kinases regroupées sous le nom de MAPKAPKs (**MAPK-Activated Protein Kinases**). Elles sont divisibles en cinq sous-groupes et parmi elles se trouvent RSKs (**p90 Ribosomal S6 Kinases**) et les MSKs (**Mitogen- and Stress-activated Kinases**), toutes deux responsables de la phosphorylation des queues d'histones (**figure 11**).



**Figure 11:** L'activation séquentielle des kinases de la voie MAPK.

*Adapté de Cargnello et Roux, 2011.*

Le groupe des RSKs compte quatre paralogues, notés RSK1, RSK2, RSK3 et RSK4, qui partagent jusqu'à 80% d'homologie de séquences entre eux. Ces enzymes ont la particularité de posséder deux domaines kinases, le catalytique NTKD (**N (amino)-Terminal Kinase Domain**) et le régulateur CTKD (**Carboxyl-Terminal Kinase Domain**), localisés à chacune des deux extrémités de la protéine (**figure 12**) (Fisher and Blenis, 1996). Une fois activées par ERK1/2, elles régulent une variété de substrats différents, dont des facteurs de transcription comme CREB (**Cyclic AMP Response Element-Binding protein**), c-Fos ou ER $\alpha$  (**Estrogen Receptor  $\alpha$** ) (Gille et al., 1995). MSK1, appelée aussi **RSL-Like Protein Kinase** (RLPK), et MSK2 sont identiques entre elles à près de 60% et partagent, comme leurs noms le suggèrent, une forte homologie de séquences avec les kinases RSKs (**figure 12**). Les deux sous-classes d'enzymes partagent plusieurs caractéristiques communes, dont la conservation des deux domaines catalytiques et celle des quatre mêmes sites phosphorylés essentiels pour leur activation. Ces similarités soulignent un modèle de fonctionnement sensiblement semblable. D'ailleurs, les MSKs et les RSKs partagent certains substrats, dont CREB, p65 et surtout l'histone H3 (Ikuta et al., 2007).



**Figure 12:** La structure conservée des kinases RSK et MSK.

Schéma d'un isoforme de chacune des deux sous-familles de kinases (RSK et MSK) impliquées dans la phosphorylation des queues d'histones. Les deux domaines catalytiques sont colorés (rouge, NTKD et bleu, CTKD) et les résidus essentiels à l'activation de kinases sont notés. *Adapté de Cargnello et Roux (Revue), 2011.*

Les protéines 14-3-3 sont les protéines adaptatrices majeures dans la reconnaissance de résidus sérines phosphorylés des histones (Chen and Wagner, 1994; Muslin et al., 1996) (**figure 10B**). Ces *readers* représentent une large famille de protéines, composée de plusieurs isoformes ( $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$  et  $\zeta$ ). La protéine 14-3-3 se lie à H3S10-p et H3S28-p. Dans les deux cas, la lysine en amont est modifiée, par méthylation et/ou acétylation. Il a d'ailleurs été montré que l'acétylation de la lysine 9 stabilise l'interaction entre H3S10-p et les protéines adaptatrices 14-3-3 (Winter et al., 2008). Les sérines phosphorylées des queues d'histones sont également reconnues par des domaines BRCT (**BRCA1 Carboxy-Terminal**) (**figure 10B**). La protéine MDC1 (**M**ediator of **DNA Damage Checkpoint protein 1**) possède ce domaine, qui lie spécifiquement l'extrémité C-terminale de l'histone H2AX, un variant de H2A chez l'Homme. Ce médiateur impliqué dans la réparation de l'ADN reconnaît spécifiquement la sérine 139 phosphorylée de H2AX (notée  $\gamma$ H2AX). La mutation spécifique de ce résidu perturbe l'interaction de H3 avec MDC1, et ce dernier n'est plus recruté ensuite sur les zones de dommage de l'ADN (Stucki et al., 2005).

La phosphorylation modifie la charge du résidu cible. La baisse de charge positive de la queue perturbe les interactions électrostatiques entre histones et ADN. Ceci amène à une structure chromatinienne plus lâche, facilitant l'accès sur l'ADN aux machineries protéiques et donc, à l'activation de la transcription (Cheung et al., 2000). La phosphorylation la plus étudiée est celle de H3S10. Elle est impliquée dans l'activation transcriptionnelle, permettant notamment l'expression transitoire de gènes précoces immédiats tels que *c-Fos* et *c-Jun* (Mahadevan et al., 1991). Il a été démontré que MSK1, MSK2 et RSK2 chez les mammifères étaient capables de phosphoryler ce résidu (Soloaga et al., 2003; Thomson et al., 1999). Parallèlement, il a été montré l'enrichissement local des protéines 14-3-3 dans des régions transcriptionnellement actives. De plus, les gènes IE activés sont aussi hyper-acétylés (Thomson et al., 2001). Cela confirme que les deux modifications soient couplées. La phosphorylation de H3S10 bloque la tri-méthylation de H3K9 et induit l'éviction de HP1 $\gamma$  (cf. page 37). L'existence de ce *phospho-switch* sur la queue H3 souligne la dynamique des modifications et renforce l'idée de l'existence d'un « code histone » (Fischle et al., 2005). La réparation d'ADN est également régulée par la phosphorylation d'histones, principalement celle de H2A.X ( $\gamma$ H2AX), en réponse à des radiations ionisantes, amenant au recrutement de protéines du complexe hétéro-trimérique MRN (Mre11/ Rad50/Nbs1) (Chapman and Jackson, 2008).

L'état de phosphorylation est maintenu par un équilibre modulé par l'activité dynamique de kinases, de protéines adaptatrices et de phosphatases (**figure 10**). PP1, PP2A et PP4 (PP, **P**rotein **P**hosphatase) sont impliquées dans la déphosphorylation des queues d'histones et participent ainsi à la dynamique de la chromatine.

Des études chez la levure ont démontré que PP1 était capable de cibler la marque H3S10-p, contrebalançant ainsi les effets induits par MSK et jouant un rôle dans la répression transcriptionnelle (Hsu et al., 2000). La marque  $\gamma$ H2AX permet de localiser sur la chromatine le lieu où la machinerie de réparation doit être recrutée. *Chowdhury et al.* ont analysé la déphosphorylation de cette marque chez la levure et les mammifères et ont démontré que la famille des phosphatases PP2A était impliquée. Un des isoformes, PP2AC, co-localise avec les foyers nucléaires. Son inhibition induit une augmentation du niveau de  $\gamma$ H2AX, une persistance des foyers et une perturbation de la réparation de cassures double brins (Chowdhury et al., 2005).

La régulation de l'activation transcriptionnelle et la réparation des dommages sur l'ADN sont deux mécanismes essentiels au maintien de l'intégrité de l'information génétique. L'implication de la phosphorylation dans ces processus physiologiques l'amène à être ciblée dans des thérapies visant à contrecarrer ses activations abusives dans certaines pathologies. Les marques H3S10-p et H3S28-p sont associées à l'activation de la transcription de gènes précoces immédiats, qui sont aussi caractérisés comme des proto-oncogènes. Ces gènes, activés en réponse à des signaux extracellulaires, sont impliqués dans certaines pathologies comme l'inflammation et le cancer. L'EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor) par exemple, un inducteur de tumeur, induit la phosphorylation de H3S10 par RSK2 et MSK1 (Clarke et al., 1998; Sassone-Corsi et al., 1999). L'augmentation du niveau de la marque H3S10-p est un facteur aggravant dans l'établissement d'une instabilité chromosomique et donc, favorise la carcinogénèse.

Une réparation aberrante d'ADN est également un facteur initiateur de tumeurs. En réponse à des dommages excessifs ou non réparables, la cellule induit son apoptose et évite ainsi la propagation de défauts génétiques. Ce processus de mort cellulaire est essentiel à l'élimination efficace de l'ADN et permet donc d'éviter l'auto-immunisation. En effet, les patients dont le traitement de l'ADN apoptotique est défectueux sont prédisposés aux maladies auto-immunes (développement d'anticorps anti-ADN fragmenté) (Erbacher et al., 2007). La marque  $\gamma$ H2AX est présente sur l'ADN fragmenté lors de l'apoptose. Le rôle de cette phosphorylation lors de la mort cellulaire n'est pas encore complètement compris mais  $\gamma$ H2AX pourrait faciliter la condensation de l'ADN en recrutant des facteurs impliqués dans la modification de la chromatine (clivage, condensation etc.). Ainsi, l'apoptose étant essentielle à l'élimination des cellules tumorales (induction par chimiothérapie ou radiothérapie, mécanismes de résistance à la mort, etc.), moduler cet événement par le biais de la phosphorylation de H2AX s'avère être une autre piste thérapeutique pertinente dans le traitement du cancer (Sekhar et al., 2019).

#### 2.4.2.5. Autres modifications des queues d'histones

##### 2.4.2.5.1. L'ubiquitination

L'ubiquitination consiste en l'ajout d'une ou plusieurs protéines ubiquitines sur des résidus lysines. C'est la modification qui impacte le plus le résidu en terme de taille ; en effet, l'ubiquitine possède un poids moléculaire de 8,6 kDa (contrairement au groupement phosphate par exemple, d'environ 95 Da seulement) (Hershko et al., 1979). Les histones H2A et H2B sont les deux protéines nucléaires les plus ubiquitinées dans les cellules. Comme la méthylation, l'ubiquitination de lysines peut être simple (mono-) ou multiple (poly-). Toutefois, les formes mono-ubiquitinées de H2A et H2B sont les plus largement représentées. Deux résidus lysines, très conservés, sont mono-ubiquitinés, la Lys-119 (K119) pour H2A et la Lys-120 (K210) sur H2B (**figure 6B**).

La protéine d'ubiquitine est attachée à l'extrémité C-terminale de la lysine par un processus séquentiel dépendant de l'activité de trois complexes enzymatiques (E1, E2 et E3), permettant l'activation (E1), la conjugaison (E2) et enfin la ligation (E3) des ubiquitines sur leur substrat. RING1B (**Really Interesting New Gene 1B**) est l'ubiquitine ligase (E3) majeure responsable de la modification de l'histone H2A sur K119, chez les mammifères (Wang et al., 2004a). BRCA1 (**BR**east **C**Ancer type **1** susceptibility gene) a été également suggérée comme capable de mono-ubiquitiner H2AK119 (Zhu et al., 2011). L'ubiquitination est un phénomène réversible grâce aux enzymes peptidases, appelées enzymes de désubiquitination, ou DUB (**DeUB**iquitinating enzymes). Certaines de ces enzymes sont spécifiques de H2A, comme USP21 (**U**biquitin **S**pecific **P**eptidase **21**) ou BAP1 (**BRCA1** **A**ssociated-**P**rotein **1**) (Scheuermann et al., 2010). D'autres ne peuvent modifier que H2B, c'est le cas de l'enzyme Ubp8 (Henry et al., 2003), et d'autres encore ciblent les deux marques.

Les lysines mono-ubiquitinées de H2A et H2B sont impliquées dans la régulation de la transcription. En effet, H2B(K120)ub est corrélée à l'activation génique alors que H2Aub a un effet contraire. Cette dernière interfère notamment avec la marque d'activation H3K4 méthylée. H2Bub elle, renvoie généralement à un signal positif d'expression génique, cette modification étant retrouvée, par expériences de ChIP-on-ChIP notamment, dans des régions actives où les gènes sont fortement exprimés (Minsky et al., 2008). Les ubiquitinations de H2A, H2B et H2AX sont également impliquées dans d'autres processus, dont la réparation d'ADN après cassures double brins par exemple, en participant à la reconnaissance et au recrutement des complexes de réparation (Moyal et al., 2011). Il n'est donc pas surprenant de retrouver ces marques nettement diminuées dans certains types tumoraux, dont le sein (Prenzel et al., 2011).

De plus, le gène suppresseur de tumeur *BRCA1* étant à la fois largement impliqué dans la carcinogénèse mammaire, et responsable de la modification de H2A, sa dérégulation est préjudiciable pour les cellules. Sachant que toutes les histones sont ubiquitinées sur au moins un résidu, l'approfondissement du rôle de cette modification post-traductionnelle s'avère essentiel pour décrypter son impact dans la physiologie de la cellule.

#### 2.4.2.5.2. La SUMOylation

La sumoylation est une modification étroitement liée à l'ubiquitination. Ces deux voies évolutives conservées présentent d'importantes similitudes dans leurs mécanismes. La sumoylation consiste en l'ajout covalent d'une protéine SUMO (**S**mall **U**biquitin-**l**ike **M**Odifier), d'environ 100 acides aminés, à la structure tridimensionnelle proche de l'ubiquitine, sur des résidus lysines, grâce à l'action séquentielle de trois enzymes (E1, E2 et E3) (Nathan et al., 2006). Comme pour l'ubiquitination, les enzymes E1 et E2 sont peu nombreuses comparées aux ligases E3, bien plus diversifiées. Bien que cette modification ait été identifiée sur les quatre histones de l'octamère, son rôle est encore peu compris. Un rôle dans la régulation de l'expression génique a été démontré pour l'histone H4. Sa sumoylation induit le recrutement *in vivo* de l'histone déacétylase HDAC1 et de la protéine HP1 $\gamma$  et participe ainsi à la répression transcriptionnelle (Shiio and Eisenman, 2003). Outre cette coopération avec l'acétylation/déacétylation, la sumoylation interfère avec l'ubiquitination. Ces deux évènements agiraient en synergie lors de la réparation de l'ADN, suite au dépôt de la marque  $\gamma$ H2AX sur les cassures double brins (Morris et al., 2009).

#### 2.4.2.5.3. La crotonylation

La crotonylation est une modification post-traductionnelle découverte il y a peu de temps (Tan et al., 2011). Cette marque d'environ 68 Da se lie au groupe amine  $\epsilon$  de la lysine. Les premières études publiées suggèrent un rôle de cette modification dans la régulation de la structure de la chromatine et dans l'initiation de la transcription puisque les histones crotonylées sont largement associées à des régions de chromatine active. De manière intéressante, l'étude de *Tan et al.* a mis en avant que la majorité des lysines crotonylées étaient aussi acétylées. Cependant, ils ont démontré que les enzymes impliquées étaient différentes des acétyltransférases et déacétylases, la surexpression de protéines comme p300/CBP n'affectant pas le niveau de crotonylation sur les lysines identifiées (Tan et al., 2011). Ces deux modifications pourraient donc agir en synergie dans l'ouverture de la chromatine et dans l'activation génique.

Peu d'informations sont disponibles sur cette nouvelle modification mais les études les plus récentes confirment un rôle de la crotonylation dans l'activation de la transcription (Li et al., 2016). Il semblerait néanmoins que certaines acétyltransférases soient finalement capables de modifier par crotonylation des lysines, que certaines HDAC pourraient retirer cette modification et que des protéines à bromo-domaine seraient capables de lire les lysines crotonylées (Bao et al., 2014; Sabari et al., 2015). Ces deux modifications de lysines semblent donc étroitement liées.

### 3. La régulation de la transcription

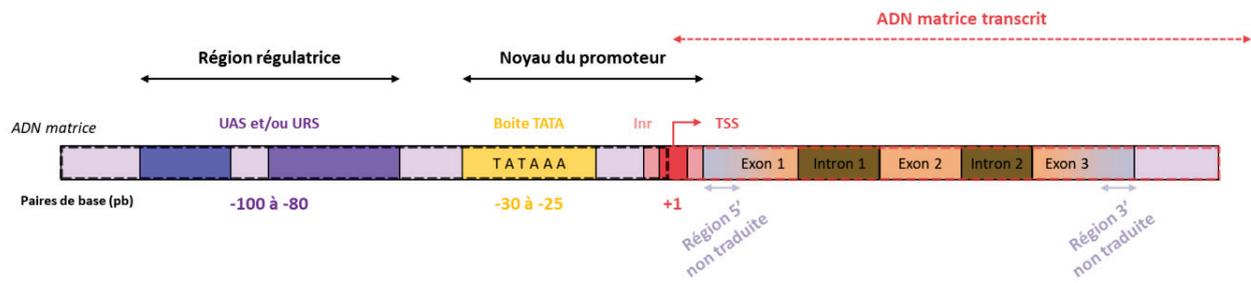
L'explosion des études réalisées sur la chromatine depuis sa caractérisation en 1974, a mis en évidence que sa structure et sa composition avaient des effets majeurs sur une multitude de processus liés à l'ADN, et notamment sur la transcription génique.

#### 3.1. **Le mécanisme de transcription de gènes eucaryotes**

La transcription consiste en la synthèse d'ARN (**Acide RiboNucléique**) à partir d'une matrice d'ADN (**Acide DésoxyiboNucléique**). Ce mécanisme est fortement conservé entre procaryotes et eucaryotes. Il requiert l'activité de l'ARN Polymérase II (abrégée ARN Pol II) et la présence de facteurs généraux de transcription (GTFs, **General Transcription Factors**) (Matsui et al., 1980). Ces derniers sont notamment impliqués dans la reconnaissance des promoteurs des gènes à transcrire. En effet, les gènes sont empaquetés dans les nucléosomes et doivent être rendus accessibles pour pouvoir être transcrits en ARN. Pour cela, les promoteurs contiennent des sites reconnus par des facteurs de transcription. Le contexte chromatinien influence positivement ou négativement le recrutement d'enzymes de remodelage et de modification de la chromatine, permettant ou non son ouverture et donc, la liaison ou non de l'ARN Pol II (Richmond and Davey, 2003).

##### 3.1.1. Les promoteurs de gènes eucaryotes

Les promoteurs des gènes eucaryotes ont une structure sensiblement similaire. Ils possèdent un site d'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription, ou PIC (**PreInitiation Complex**), une séquence TATA localisée en amont du site TSS et une séquence initiatrice qui englobe le TSS, notée Inr (**Initiator Sequence**). Ces trois éléments appartiennent au noyau du promoteur (*core element*). Ils sont associés à des éléments régulateurs, qui sont des séquences spécifiques de gènes localisées en amont de ce noyau, et qui contrôlent le taux d'initiation de la transcription. On retrouve notamment des séquences d'activation (UAS, **Upstream Activation Sequences**) et de répression (URS, **Upstream Repression Sequences**), qui servent de sites de liaison pour les activateurs et répresseurs de la transcription (**figure 13**) (Wray et al., 2003).



**Figure 13:** Structure schématique d'un promoteur de gène eucaryote.

*Adapté de Wray et al, 2003*

La boîte TATA est une séquence riche en adénines (A) et thymine (T), située entre 25 et 30pb en amont du TSS, chez les eucaryotes. Elle sert de site de liaison pour les protéines TBP (**TATA-Binding Protein**). L'association entre les protéines TBPs et la séquence TATA engendre l'assemblage du complexe PIC. Ce dernier est composé au minimum de l'ARN Pol II, localisée sur une matrice d'ADN double brin au niveau d'un promoteur, de quatre GTFs nommés TFIIB, -E, -F et -H et d'une protéine TBP (Murakami et al., 2015). Elle permet notamment de modifier la conformation de l'ADN (Kim et al., 1993). Les facteurs généraux servent à aider l'ARN Pol II à bien se localiser, TFIIB possède en plus une activité hélicase qui participe à la séparation des brins matrice et non matrice de l'ADN. Dans cet état, l'enzyme et les facteurs GTFs sont tous liés au promoteur mais ne sont pas dans une conformation active pour commencer la transcription. Il doit se produire un changement brusque de conformation de l'ADN, lors duquel environ une dizaine de paires de base entourant le TSS sont fondues (Pan and Greenblatt, 1994). Le brin matrice du gène codant se positionne alors dans la fente du site actif de l'ARN Pol II et la transcription peut débuter.

### 3.1.2. L'ARN Polymérase II

L'ARN Polymérase II est responsable de la synthèse des ARN pré-messagers chez les eucaryotes. Elle possède une dizaine de sous-unités protéiques, dont la plus grande, d'environ 220 kDa, est nommée RPB1 (**RNA Polymerase B 1**). Elle est caractérisée par la répétition de six acides aminés, à son extrémité C-terminale. Ce domaine, noté CTD (**Carboxy-Terminal repeat Domain**), à la séquence consensus Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro (YSPTSP), est très conservé parmi les eucaryotes (Nonet and Young, 1989; Wintzerith et al., 1992).

Le CTD de l'ARN Pol II assure un rôle essentiel dans l'élongation de la transcription. Il est présent sous deux formes. La première, notée IIO, est fortement phosphorylée au niveau des sérines en position 2 et 5 (YSPTSP) et participe au complexe d'élongation de la transcription. La seconde forme de l'ARN Pol II, non modifiée, est appelée IIA, et se retrouve dans le complexe d'initiation (PIC) (Dahmus, 1996; Lu et al., 1991). L'existence de ces deux

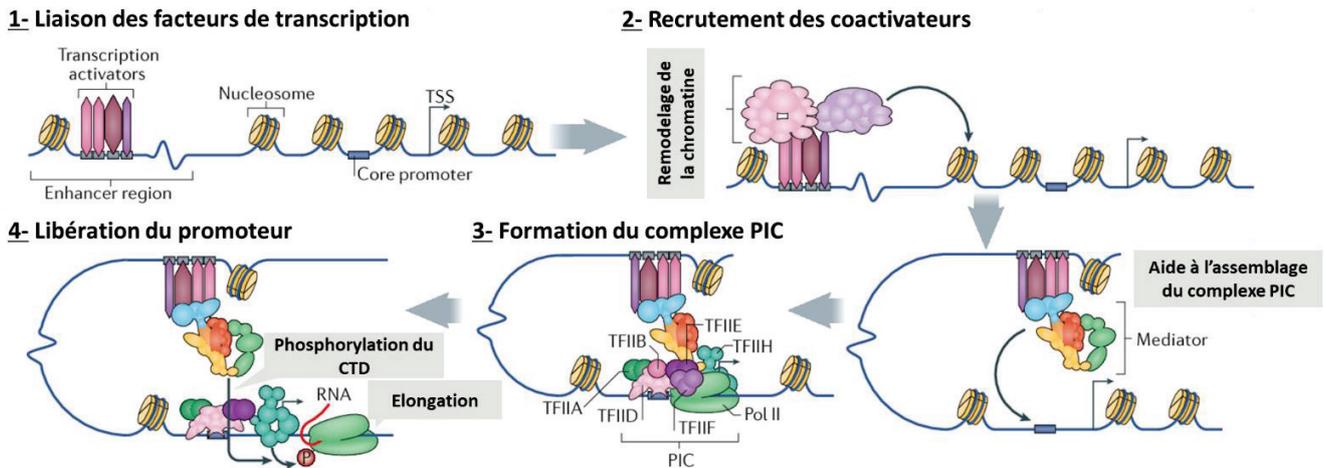
formes sous-entend l'intervention d'une phosphatase, qui régule l'activité de l'enzyme. En effet, sachant que la forme non phosphorylée (IIA) est retrouvée dans le complexe de pré-initiation, l'existence d'une phosphorylation réversible concorde avec l'idée que la déphosphorylation de IIO à la fin de la transcription permette de régénérer la forme IIA pour la formation du complexe PIC et participe ainsi au recyclage de l'enzyme (Dahmus, 1996).

### 3.1.3. Le cycle de transcription de l'ARN Pol II

La transcription suit un « scénario », au cours duquel différents complexes protéiques vont se former et se dissocier pour arriver à l'initiation de la transcription par l'ARN Pol II (Buratowski et al., 1989) (**figure 14**).

L'initiation débute par la reconnaissance des séquences régulatrices au niveau du promoteur par des activateurs/répresseurs transcriptionnels. Ils agissent en coopération avec le facteur général de transcription TFIID, qui lui reconnaît le noyau du promoteur au niveau de séquences TATA (Kassavetis et al., 1992). L'ARN Pol II et les GTFs associés sont suffisants pour l'induction de la transcription mais sont incapables de répondre aux signaux envoyés par les régulateurs. Cette déficience a conduit à la découverte du complexe *Mediator*, qui transfère les informations provenant des activateurs (ou répresseurs) géniques au système central de la machinerie.

Le *Mediator* est composé d'une vingtaine de protéines dont les protéines SRB (*Suppressor of RNA polymerase B*) qui composent son noyau. Seul, il est incapable de se lier à l'ADN matrice mais il interagit physiquement avec l'ARN Pol II et forme ainsi l'ARN Pol II holoenzyme (Soutourina, 2018). L'addition de nouveaux facteurs généraux conduit à la formation du complexe PIC et à la liaison de cet ensemble sur le noyau du promoteur, au niveau du TSS (**figure 14**). TFIIH, à activité hélicase, catalyse ensuite l'ouverture de la double hélice d'ADN entre les positions -9 et +2 de part et d'autre du site d'initiation de la transcription pour former la bulle transcriptionnelle (Douziech et al., 2000). Il s'en suit la fusion de cette région du promoteur, permettant l'amorçage du brin matrice par l'ARN Pol II et donc, le début de la transcription. Le facteur TFIIH phosphoryle ensuite le domaine CTD, permettant la libération du promoteur et la progression de la transcription le long du brin d'ADN codant (Hampsey and Reinberg, 1999).



**Figure 14:** L'initiation de la transcription d'un promoteur eucaryote par l'ARN Polymérase II et ses cofacteurs.

Schéma d'un modèle simplifié des principales étapes d'initiation de la transcription par l'ARN Polymérase II dans son contexte chromatinien. *Adapté de Soutourina, 2018.*

### 3.2. La relation fonctionnelle entre transcription et chromatine

#### 3.2.1. Le remodelage de la chromatine

Les contacts étroits entre histone et ADN, associés à l'organisation de la chromatine en fibre de 30 nm, limitent grandement l'accès des protéines de la machinerie transcriptionnelle aux séquences d'ADN matrices à transcrire. Il est donc nécessaire de perturber la structure compacte des nucléosomes pour permettre la liaison (Richmond and Davey, 2003). L'initiation de la transcription débute donc par une réorganisation locale de la structure de la chromatine. Elle est rendue possible par deux mécanismes fondamentaux retrouvés dans presque tous les organismes : les modifications covalentes des queues d'histones (cf. page 33) et le remodelage local de la chromatine dépendant de complexes enzymatiques multi-protéiques. L'acétylation et la déacétylation des queues d'histones jouent un rôle majeur dans ce processus, les  $\gamma$ SAGA (*Spt-Ada-Gcn5 Acetyltransferase*), hPCAF et hCBP/p300 étant des histones acétyltransférases décrites comme essentielles dans le remodelage local (Brownell et al., 1996). Elles sont directement recrutées sur le promoteur par les facteurs activateurs, mais peuvent aussi être dépendantes de la présence d'autres facteurs de transcription, comme les récepteurs nucléaires (Blanco et al., 1998). Le second processus nécessite la présence et l'activité de complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP, qui utilisent l'énergie pour modifier la structure de la chromatine de manière non covalente. Chez l'Homme, hSWI/SNF est le complexe majeur responsable de ce processus.

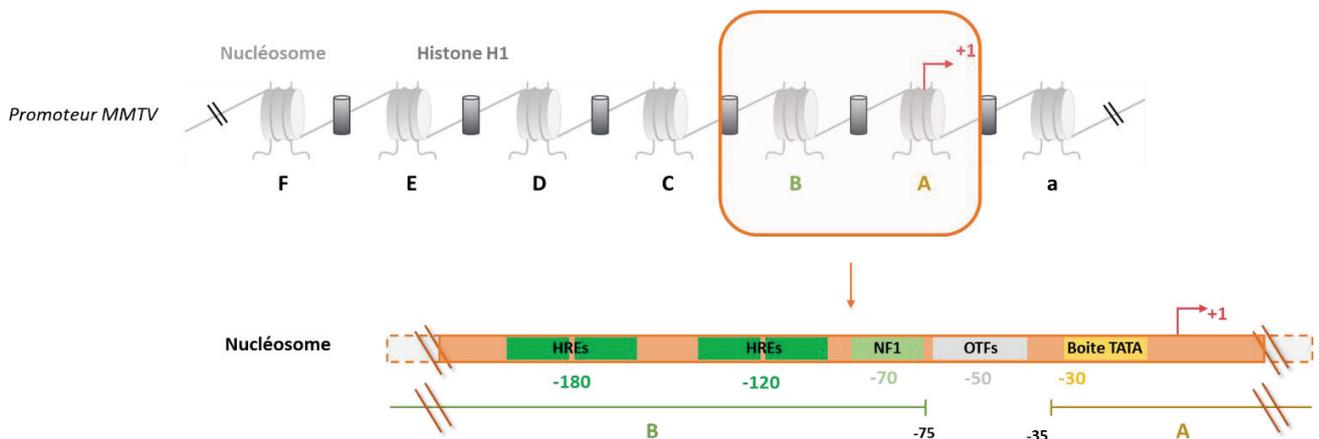
Les protéines le composant activent l'expression génique en soulageant la répression transcriptionnelle induite par la structure compacte de la chromatine *in vivo* (Hirschhorn et al., 1992). Ces deux processus de remodelage sont complémentaires dans l'altération locale la chromatine.

### 3.2.2. La transcription dépendante des récepteurs nucléaires

Les facteurs de transcription sont des protéines capables de lire et de lier l'ADN matrice à transcrire, et en conséquence de leur liaison, d'induire un programme transcriptionnel dépendant de l'ARN Polymérase II. Les facteurs généraux de transcription sont essentiels à la formation du complexe de pré-initiation. Ils sont également capables de recruter les enzymes impliquées dans le remodelage de la chromatine (SWI/SNF) et celles responsables de la modification des histones (P300/CBP, Gcn5, PRMT, etc.).

Il existe d'autres facteurs de transcription, dit « spécifiques », par opposition à « généraux », dans le sens où leur présence varie en fonction des séquences de reconnaissance (Dyran and Tjian, 1983). Parmi eux, CREB, AP-1, Sp1, p53 ou encore les récepteurs nucléaires sont capables de lier l'ADN et de recruter des enzymes de modification et des complexes de remodelage, en vue de la restructuration locale de la chromatine pour la transcription. Ils sont également capables de coopérer avec les GTFs et de participer à la stabilisation du complexe PIC, c'est le cas de la majorité des récepteurs nucléaires (Deroo and Archer, 2001; Schulman et al., 1995; Schwerk et al., 1995).

La caractérisation des récepteurs nucléaires comme facteurs de transcription a été grandement étudiée grâce au modèle du promoteur du virus de la tumeur mammaire chez la souris, ou MMTV (**M**ouse **M**ammary **T**umor **V**irus) (Archer et al., 1997). Cet outil permet de prédire avec précision comment la structure chromatinienne peut influencer l'activation transcriptionnelle. Le fragment MMTV-LTR (**L**ong **T**erminal **R**epeat) de l'ADN rétroviral compte environ 1300 paires de bases et s'organise en six nucléosomes, notés de A à F (**figure 15**). Les nucléosomes A et B englobent la région proximale du promoteur et contiennent quatre sites de liaison aux récepteurs nucléaires, notés HREs (**H**ormone **R**esponse **E**lements). La liaison des récepteurs à ces sites est induite par la stimulation de l'hormone correspondante. La région proximale du promoteur compte aussi des sites de liaison pour le facteur nucléaire NF1 (*Nuclear Factor 1*), juste en aval des HREs, pour des octamères de facteurs de transcription (OTFs, **O**ctamer **T**ranscription **F**actors) et pour des protéines TBPs (**figure 15**). En absence d'hormone, ces trois régions sont rendues inaccessibles par la structure répressive de la chromatine du promoteur MMTV (Archer et al., 1991).



**Figure 15:** La structure du promoteur MMTV.

*Adapté de Archer et al., 1997.*

Le premier récepteur nucléaire étudié avec cet outil fut le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) (Archer et al., 1997). La stimulation hormonale induit le recrutement du récepteur sur ses HREs. Dans le même temps, le traitement rend la région du nucléosome B hypersensible aux endonucléases. Cette chromatine devenue sensible, et remodelée, est caractéristique des régions de la chromatine dite « actives » (cf. page 35). Ce changement structural du nucléosome B permet donc aux facteurs NF1, OTF et TBP de se lier. Tous ces événements conduisent à la formation du complexe PIC et au départ de la transcription.

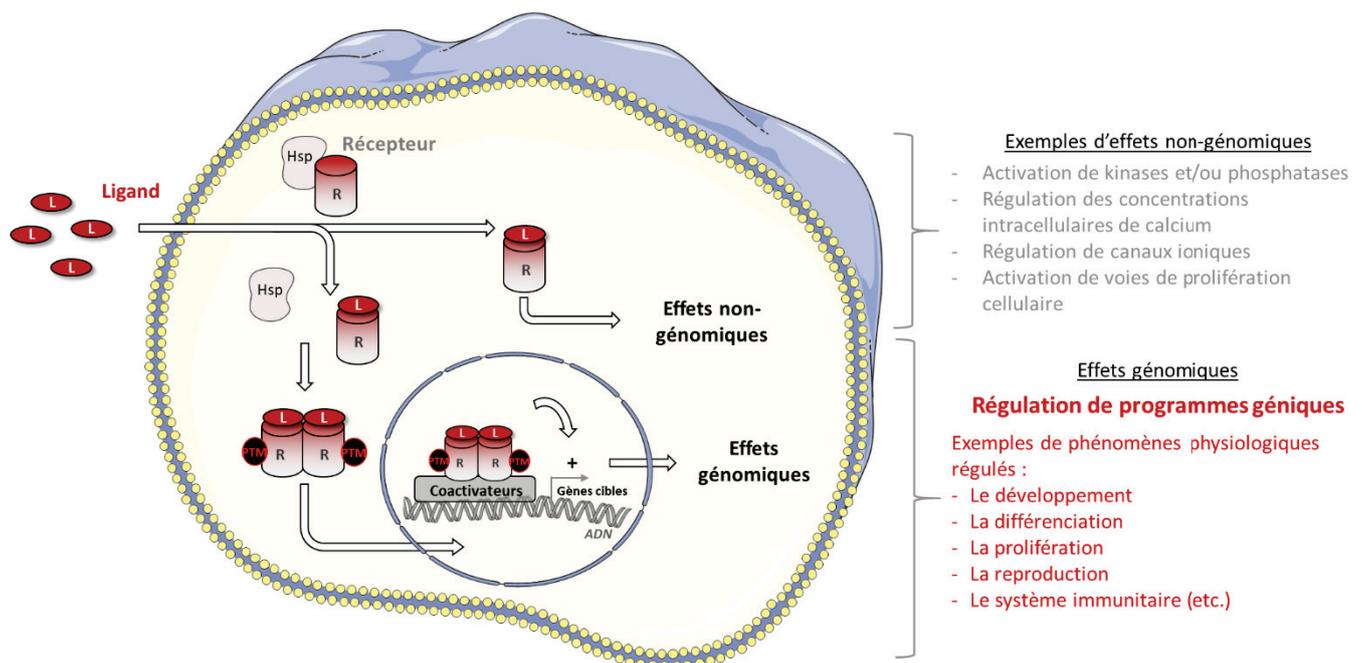
Ainsi, les études basées sur l'utilisation du modèle du promoteur MMTV ont démontré un modèle d'activation bimodale du récepteur GR, dans lequel la liaison du récepteur induite par un ligand conduit au remodelage de la chromatine et à l'accès des facteurs de transcription à leurs sites de liaison.

## **Chapitre 2 : Les récepteurs nucléaires comme modèle d'étude de la régulation transcriptionnelle**

### **1. Introduction sur les récepteurs nucléaires**

Chez de nombreux organismes pluricellulaires (mammifères, plantes, nématodes, levures, etc.), les récepteurs nucléaires (NRs) sont regroupés dans une superfamille de protéines, structurellement apparentées, et constituent le groupe le plus important de facteurs de transcription. Ils favorisent le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaires, en réponse à la liaison de leur(s) ligand(s) spécifique(s). *Via* leurs récepteurs, ces molécules lipophiles, telles que les hormones stéroïdiennes, les vitamines ou encore les lipides alimentaires, induisent la régulation de programmes d'expression de gènes de manière précise, synchronisée et cohérente. Ceux-ci codent pour la régulation du développement, de la prolifération cellulaire, de la reproduction et d'une multitude d'autres phénomènes physiologiques importants pour la cellule (Mangelsdorf et al., 1995; Trotter and Archer, 2007). La capacité de ces ligands à facilement transiter à travers les membranes cellulaires a très tôt suscité l'intérêt de scientifiques quant à leur potentiel thérapeutique. En effet, plusieurs troubles sont traités par liaison de molécules sur les récepteurs, comme la mifépristone pour le récepteur à la progestérone (PR) dans les cas de fertilité, la dexaméthasone (ligand du récepteur aux glucocorticoïdes, GR) en traitement de maladies inflammatoires ou encore le tamoxifène, liant le récepteur aux œstrogènes, pour lutter contre la progression des cancers du sein hormono-dépendants. Aujourd'hui, environ 15% des composés pharmaceutiques sont des ligands ciblant des récepteurs nucléaires (Overington et al., 2006).

Les différents récepteurs nucléaires fonctionnent de manière similaire (**figure 16**). Lorsqu'ils sont non activés, car non liés à leur ligand, ils sont complexés à des protéines chaperonnes dans le cytoplasme. La molécule lipophile entre dans la cellule par diffusion passive à travers la membrane plasmique et interagit spécifiquement avec son récepteur. Cette liaison induit des changements du NR, comme la dissociation de sa chaperonne, sa dimérisation ou encore son changement de localisation subcellulaire. L'activation du récepteur lui permet d'induire des effets rapides, et souvent cytoplasmiques (dits « non-génomiques »), et des effets nucléaires, dits « génomiques », par son interaction avec l'ADN sur ses gènes cibles. Il va alors recruter des partenaires de la machinerie de transcription et coordonner l'ensemble des événements modulant la synthèse d'ARN messagers et de protéines cibles, qui sont responsables des effets phénotypiques dans la cellule (Giguère, 1999; Mazaira et al., 2018).



**Figure 16:** Le modèle d'action du récepteur nucléaire.

*Adapté de Giguère, 1999.*

## 2. La découverte des récepteurs nucléaires

Dès la fin des années 1940, les récepteurs nucléaires et leurs ligands sont devenus une cible d'étude pour de nombreux médecins. Les glucocorticoïdes ont été les premiers stéroïdes à être utilisés en clinique. Le médecin Philip Hench a utilisé de la cortisone pour traiter, avec succès, les symptômes de la polyarthrite rhumatoïde (pour revue : Kadmiel and Cidlowski, 2013). Cette découverte lui valut d'ailleurs le prix Nobel de médecine en 1950. Toutefois, la caractérisation et l'étude du mode de fonctionnement des NRs n'a réellement débuté qu'au début des années 1960. Le développement de protéines marquées par radioactivité a mis en lumière la capacité des « récepteurs » de ces protéines à migrer du cytoplasme au noyau, révélant ainsi un probable lien entre le contrôle de la transcription et la physiologie de la cellule (Mangelsdorf et al., 1995). Cette intuition a été appuyée et prouvée par l'étude d'*Ashburner et al.* en 1974, sur des glandes salivaires de la *Drosophile*. Ils ont démontré que l'ajout de l'hormone est responsable de l'activation d'un groupe de gènes spécifiques (Ashburner et al., 1974). Ce modèle hormonal démontré en 1974, appelé « modèle Ashburner », est la base de nos connaissances actuelles en matière de régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires et s'avère encore aujourd'hui, très pertinent.

Nous nous focalisons dans ce manuscrit sur les récepteurs nucléaires humains mais des études phylogénétiques ont montré l'émergence de ces protéines bien avant la divergence entre les vertébrés et les invertébrés (pour revue : Germain et al., 2006).

Cette découverte s'est avérée intéressante pour les scientifiques qui ont vu en cette universalité, la possibilité d'étudier les principes fondamentaux qui régissent la régulation de la transcription dans la physiologie d'organismes simplifiés (par comparaison à l'Homme).

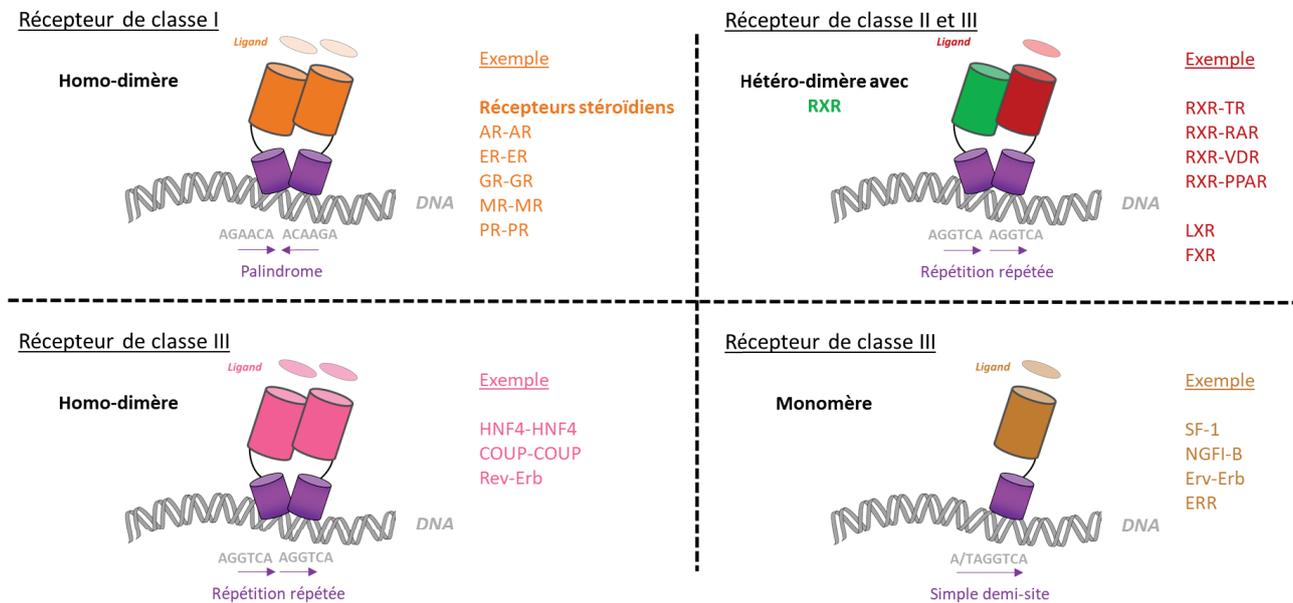
### 3. La superfamille des récepteurs nucléaires

Depuis les années 1980, de nombreux récepteurs ont été caractérisés et cela a permis de renforcer l'idée selon laquelle il existait un groupe important de protéines structurellement apparentées. Désormais, on compte 48 membres dans cette superfamille (Robinson-Rechavi et al., 2001). La moitié d'entre eux ont des ligands caractérisés et identifiés, mais les autres, appelés récepteurs « orphelins », sont des récepteurs sans ligand naturel identifié à l'heure actuelle, comme par exemple SF-1 (**Steroidogenic Factor-1**) ou PPAR (**Peroxisome Proliferator-Activated Receptor**).

Basé sur de nombreuses recherches, un dogme fut établi selon lequel, après être activé par son ligand, le récepteur nucléaire se dimérise et migre dans le noyau. Le dimère se lie à l'ADN, spécifiquement sur des éléments de réponse appelés demi-sites, en amont du promoteur. Ces séquences portent toutes le motif consensus 5'-AGGTCA-3', décliné en plusieurs combinaisons possibles. On retrouve des répétitions directes (**Directed Repeats**, DR), des palindromes (**Inverted Repeats**, IR), des palindromes répétés (**Everted Repeats**, ER) ou une absence de répétition (**Non-Repeat**, N-R) (**figure 17**). Ces demi-sites sont séparés par un nombre X de nucléotides, allant de 0 à 8 selon les récepteurs (IR-3, DR-4 par exemple). Le type d'association du récepteur sur l'ADN (homo/hétéro-dimère ou monomère) ainsi que le site de fixation qu'il reconnaît (DR, IR, ER ou NR) ont permis de définir trois sous-classes de récepteurs nucléaires, à l'intérieur de la superfamille (Mangelsdorf et al, 1995) (**figure 17**).

#### 3.1. La classification des récepteurs nucléaires

La classe I regroupe les récepteurs dits stéroïdiens (**Steroid Receptor**, SR), incluant le récepteur aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR), aux androgènes (AR), aux glucocorticoïdes (GR) et aux minéralocorticoïdes (MR). La classe II, regroupant la famille des récepteurs thyroïdiens (TR) et de l'acide rétinoïque (RAR), comprend également le récepteur à la vitamine D (VDR) et le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR). Enfin, la classe III représente les récepteurs dits « orphelins ». Elle peut être subdivisée en deux groupes : les récepteurs orphelins dimériques, comme le récepteur X de rétinoïde (RXR), et les récepteurs monomériques, tels qu'ERR (**figure 17**) (Rastinejad et al., 2013).



**Figure 17:** Les différentes classes de récepteurs nucléaires.

En haut est schématisé le domaine de liaison à l'ADN (violet) et le domaine de liaison au ligand (blanc) au sein de la structure complète d'un RN. *Adapté de Mangelsdorf et al., 1995.*

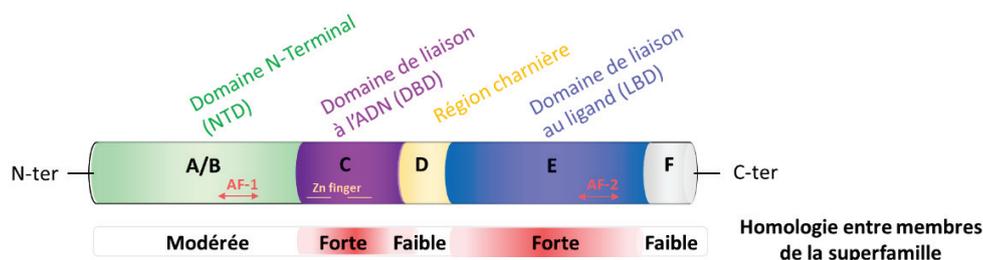
Le récepteur stéroïdien possède, par définition, une hormone stéroïdienne pour ligand, chacune d'elle étant composée d'un noyau stéroïde dérivé du cholestérol (cf. page 98). Une fois lié, le récepteur se dimérise généralement sous forme d'homo-dimère et se lie à l'ADN sur des séquences spécifiques aux récepteurs stéroïdiens. Elles consistent en deux répétitions inversées du motif consensus 5'-AGAACA-3' (5'-AGGTCA-3' pour ER $\alpha$ ), appelée aussi palindrome, séparées par trois nucléotides ; ce motif est couramment abrégé IR-3 (Robinson-Rechavi et al., 2003) (**figure 17**). La principale différence avec les récepteurs de classe II est que ces derniers fonctionnent généralement sous forme d'hétéro-dimères. En effet, TR, RAR, VDR et PPAR s'associent avec RXR. De plus, ils se lient à l'ADN sur des séquences directes, non inversées, de type DR1 à DR5. Le nombre de nucléotides détermine la spécificité du couple élément de réponse/hétérodimère (Renaud and Moras, 2000) (**figure 17**). Par exemple, TR se lie sur des demi-sites en configuration DR-4, VDR en DR-3 et PPAR, en DR-1.

Les récepteurs de la troisième et dernière classe ont été identifiés par analyse de comparaison de séquences. Contrairement aux membres des deux familles précédentes, ils n'ont pas de ligand connu. Les « orphelins de la classe III » se lient soit en tant qu'hétérodimère associé à RXR et lisent des séquences directes répétées (comme par exemple LXR, configuration DR-4), soit se lient à l'ADN comme monomère. Dans ce cas, tel  $ERR\alpha$ , un seul motif nucléique est reconnu, dont la séquence consensus est 5'-AGGTCA-3', précédée d'une séquence riche en A/T en 5'. Enfin, un troisième mode de fixation existe, celui où le récepteur orphelin forme un homo-dimère et se lie à des séquences directes répétées, comme pour Rev-Erb (Mangelsdorf et al., 1995) (**figure 17**).

Ces études structurales ont permis de poser les bases dans la compréhension du mode d'action nucléaire des RNs et de définir des sous-groupes dans cette superfamille. Nous nous focaliserons pour la suite du manuscrit sur les récepteurs stéroïdiens hormonaux.

### 3.2. Structure des récepteurs nucléaires

Structurellement parlant, les membres de cette superfamille ont une organisation de base similaire (Trotter and Archer, 2007). Ils partagent sept domaines fonctionnels, notés de A à F, plus ou moins conservés (**figure 18**). Le domaine de liaison à l'ADN, ou DBD (**DNA-Binding Domain**) et le domaine de liaison du ligand, LBD (**Ligand-Binding Domain**) sont les deux domaines les plus conservés de la protéine (Escriva et al., 2004). Comme leur nom le suggère, ils lient respectivement les séquences d'ADN et le ligand. Outre ces deux régions conservées, le récepteur nucléaire est formé d'un troisième grand domaine, à l'extrémité amino-terminale, d'où son nom de domaine amino-terminal d'activation (**N-Terminal Domain**, NTD). Sa nature en acide aminé et sa taille sont variables parmi les différents membres. Il permet principalement le recrutement de corégulateurs (enzymes modificatrices de la chromatine, autres récepteurs nucléaires, coactivateurs et corépresseurs, etc.) et se trouve sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles, essentielles pour la signalisation du récepteur (Kumar and McEwan, 2012).



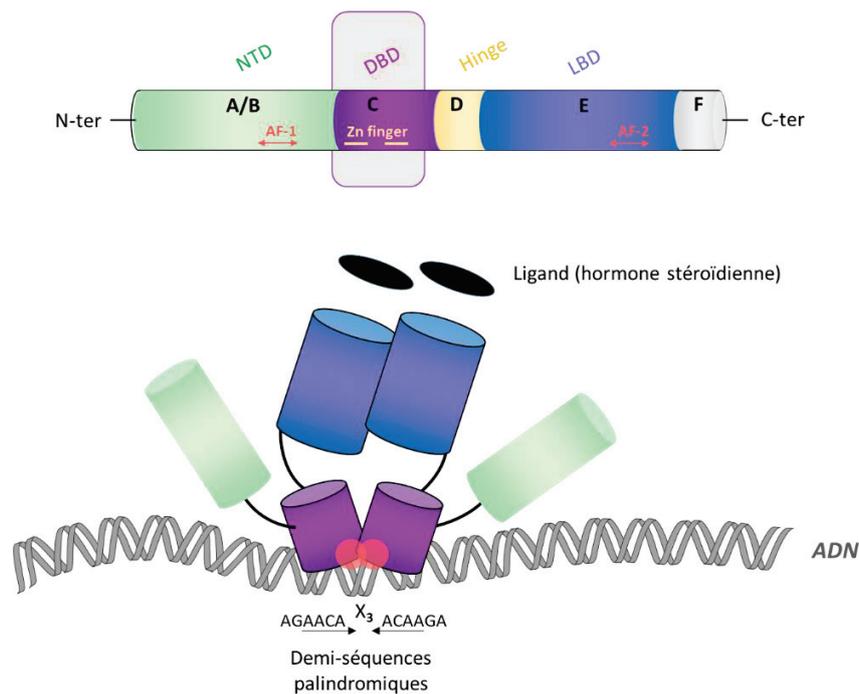
**Figure 18:** La structure d'un récepteur stéroïdien humain.

*Adapté de Robinson-Rechavi et al., 2003.*

### 3.2.1. Le domaine de liaison à l'ADN (Domaine C)

L'étude du DBD du récepteur aux glucocorticoïdes a permis de mieux comprendre la structure et les fonctions de ce domaine (Hard et al., 1990). Constitué d'environ 70 acides aminés, il est localisé au centre de la protéine. Sa fonction majeure consiste à médier l'association du facteur de transcription à des séquences d'ADN qui lui sont spécifiques, ses « éléments de réponse à l'hormone » (HREs) (**figure 19**). En forme libre (non lié à l'ADN), le récepteur existe sous forme monomérique.

D'un point de vue plus structurel, chaque DBD contient huit cystéines, hautement conservées, positionnées de manière tétraédrique autour de deux ions de zinc, pour former deux doigts de zinc (*Zn finger*). Ces deux modules donnent au DBD une structure globulaire stable et assurent le bon repliement du récepteur ainsi que sa liaison à l'ADN (Freedman et al., 1988). À l'extrémité C-terminale de chaque doigt de zinc se trouve une hélice  $\alpha$ , impliquée dans l'interaction du domaine à l'ADN (Baumann et al., 1993; Khorasanizadeh and Rastinejad, 2001).



**Figure 19:** Liaison d'un homo-dimère stéroïdien sur l'ADN.

En haut, le schéma modélise un récepteur stéroïdien. En bas, est représenté son mode de liaison sur l'ADN, après dimérisation. À noter que chaque SR possède sa spécificité de liaisons et de séquences.

*Adapté de Rastinejad et al., 2013.*



La présence de mutations dans les demi-séquences nucléiques et la variabilité de la longueur d'espacement entre elles amènent à la création d'un vaste répertoire d'éléments de réponses possibles. Ceci permet à un dimère donné de lier plusieurs gènes cibles avec une affinité variable, conduisant à une complexité de régulation génique en aval de la fixation du récepteur sur l'ADN.

### 3.2.2. Le domaine de liaison au ligand (Domaine E)

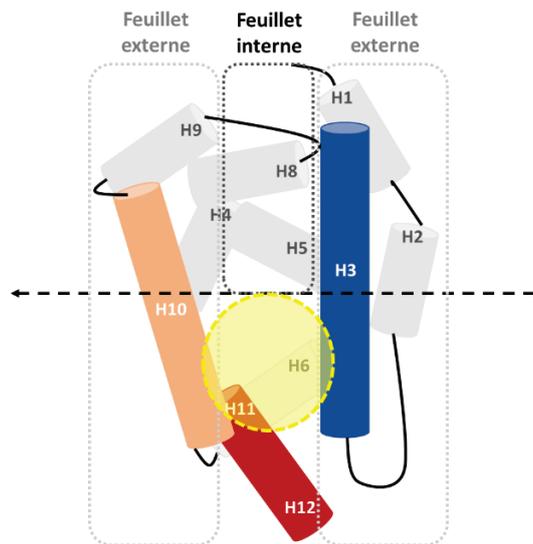
Le LBD, ou domaine E, est le second domaine le plus conservé parmi les récepteurs nucléaires. Localisé en partie C-terminale, il forme la plus grosse partie de la molécule, soit environ 200-300 acides aminés. Sa fonction principale est de lier le ligand. De plus, ce domaine représente une interface importante d'interactions entre le récepteur monomérique et son partenaire de dimérisation, ainsi qu'avec ses corégulateurs nécessaires à l'activation de la transcription ; il est donc essentiel à l'activité de la protéine.

#### 3.2.2.1. *La liaison du ligand*

Bien qu'il soit hautement conservé dans la superfamille des NRs, ce domaine porte une séquence propre à chaque membre qui le distingue des autres et lui permet ainsi de lier spécifiquement son ligand (Moras and Gronemeyer, 1998). Cette caractéristique a permis le développement de nombreuses molécules thérapeutiques pour cibler précisément un récepteur et ses effets. Le développement de molécules agonistes (activatrices de la signalisation) ou antagonistes (bloquant de l'activation de la voie) a permis le contrôle de voies physiologiques, comme l'inflammation ou la reproduction, mais aussi le traitement de différentes maladies, telles que le diabète et certains cancers (pour revues : Huang et al., 2010; Volle, 2016). De plus, la capacité d'un ligand à induire l'activation préférentielle d'un isoforme de récepteur comparé à un autre a été utilisée pour le développement de médicaments, permettant ainsi l'activation sélective de voies de signalisation tout en évitant les effets secondaires indésirables. Par exemple, le domaine de liaison du ligand de chacun des trois isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de RAR diffère de quelques acides aminés seulement mais ces derniers suffisent à contrôler et induire des voies de signalisation différentes en aval de la liaison du ligand ATRA (Willson et al., 2000).

Grâce à la cristallographie de la structure de RXR, nous savons qu'un LBD est formé de douze hélices  $\alpha$  (notées H1 à H12) et d'un feuillet  $\beta$ . En structure tertiaire, les hélices se positionnent en trois feuillets, un central et deux externes, formant la structure en « sandwich d'hélices  $\alpha$  » caractéristique du LBD. Cette structure hélicoïdale peut être divisée en deux parties (**figure 21**) (Bourguet et al., 1995).

En partie inférieure, le feuillet central est plus court que les hélices externes. Cette disposition forme une cavité hydrophobe, bordée par H3, H6 et H10, façonnant la poche où se fixe le ligand (Nagy and Schwabe, 2004) (**figure 21**). Cette partie du LBD a une composition en acides aminés très variable d'un récepteur à l'autre, corrélant avec la diversité de substrats existants.



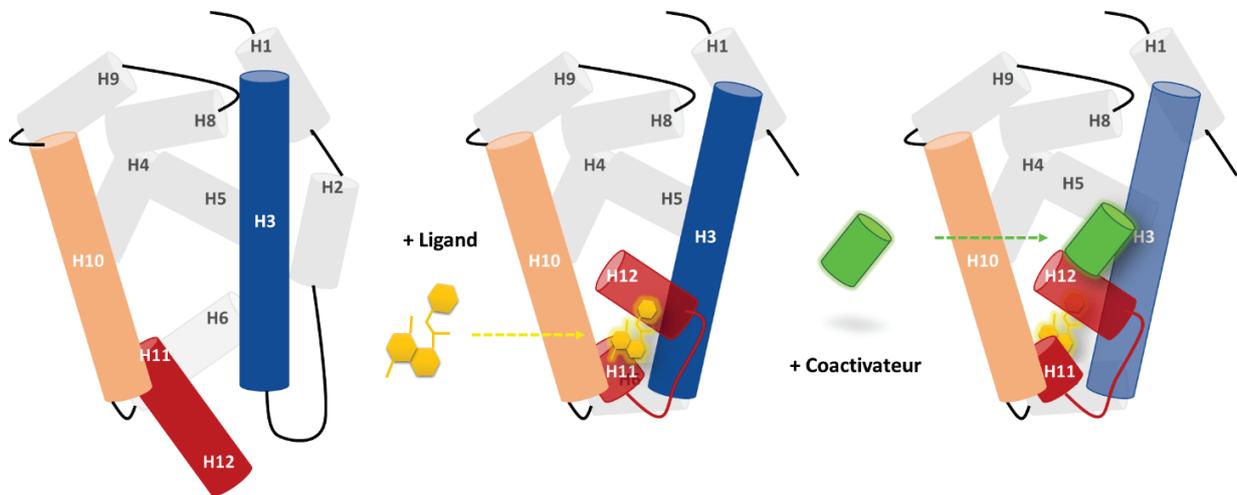
**Figure 21:** Hélices  $\alpha$  composant le LBD.

Les hélices sont numérotées de 1 à 12 (H1-H12). Les trois impliquées dans la poche de liaison au ligand sont colorées. *Adapté de Nagy and Schwabe, 2004 et Huang et al., 2010.*

Dans le cas des récepteurs stéroïdiens, les régions hydrophobes de la poche de liaison contournent de manière très précise le ligand et les groupements polaires servent à les orienter dans le site. Ainsi, les récepteurs sont capables de bien différencier les différentes structures stéroïdiennes de chacun des ligands (Brzozowski et al., 1997). En outre, cette poche de fixation présente des caractéristiques de taille et de forme très variables et inductibles. On sait notamment que les récepteurs liant leur ligand spécifique avec une forte affinité (ER $\alpha$  par exemple) ont une petite poche de fixation. À l'opposé, des récepteurs capables de lier plusieurs ligands, avec une affinité moindre, ont une cavité nettement plus grande, permettant de s'accommoder de différentes structures de molécules. Cette flexibilité dans la taille et la forme de la cavité est principalement due à l'hélice  $\alpha$  C-terminale du domaine, nommée H12. Très mobile, elle se stabilise lors de la liaison du ligand dans une position qui participe à la surface de reconnaissance du récepteur pour les corégulateurs (Nagy and Schwabe, 2004).

### 3.2.2.2. La liaison des corégulateurs

Regroupant plus de 200 membres, la famille des corégulateurs joue un rôle majeur dans l'activation de la transcription du récepteur (coactivateur) ou dans sa répression (corépresseur). D'après le modèle du « piège à souris » (*mousetrap model*), décrit suite à la cristallisation du LBD de RAR, l'hélice 12, appelée aussi hélice activatrice, joue un rôle fonctionnel central dans la liaison de corégulateurs (Renaud et al., 1995). Elle se caractérise par une forte mobilité induite par le ligand agoniste. En son absence, H12 n'est pas associée au feuillet central d'hélices. L'arrivée du ligand induit un changement de positionnement de l'hélice 12 qui va se placer tel un couvercle sur la poche de liaison et ainsi former une plateforme propice à la liaison des corégulateurs (**figure 22**).



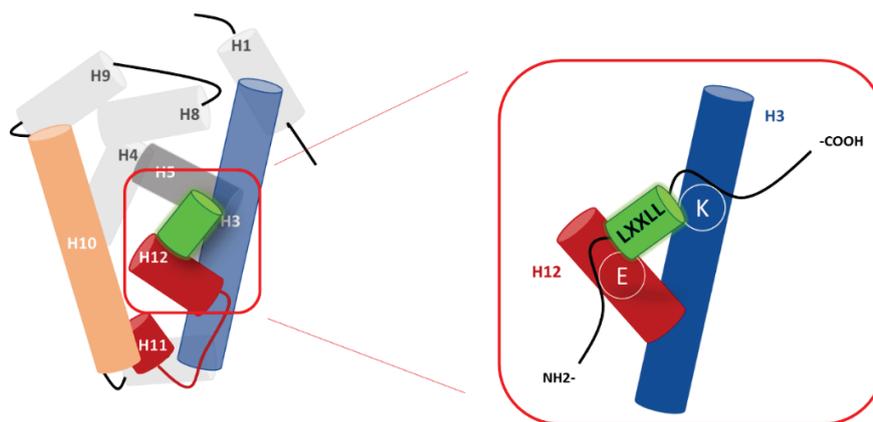
**Figure 22:** La position centrale de l'hélice  $\alpha$  n°12 dans la fonction du LBD.

*Adapté de Nagy and Schwabe, 2004 et Huang et al., 2010*

Cette conformation forme alors le domaine d'activation transcriptionnelle AF-2, en partie C-terminale du LBD (**figure 18**). Ce segment conservé est essentiel dans la liaison de partenaires. En effet, des mutations dans cette partie du LBD n'impactent pas la liaison du ligand mais affectent fortement l'activation de la transcription (Baretino et al., 1994). Plus particulièrement, il permet le recrutement de corégulateurs au motif consensus LxxLL. Cette séquence de cinq résidus, où L correspond à une leucine et x tout autre acide aminé, appelée « boîte NR », est hautement conservée parmi les corégulateurs nucléaires (GRIP1, SRC-1, RIP-140, etc.) (Horwitz et al., 1996). La liaison d'un ligand antagoniste peut bloquer la fixation d'un agoniste en empêchant l'hélice 12 de s'associer à la partie centrale du DBD, et donc en inhibant la formation du domaine AF-2 (Kojetin and Burris, 2013; Wurtz et al., 1996).

Ainsi, le DBD peut être sous-divisé en deux parties : une fixe, et une région plus mobile et dynamique, avec H12. L'arrivée du ligand agoniste va permettre la relocalisation de cette dernière en une position permettant d'accueillir et de maintenir les coactivateurs transcriptionnels associés au récepteur.

Au niveau de la « boîte NR » du corégulateur (LxxLL), trois leucines sont conservées (position +1, +4 et +5) et interagissent avec les résidus hydrophobes du LBD, tandis que les deux acides aminés moins conservés (position +2 et +3) font face au ligand, d'où leur variabilité parmi les récepteurs. Le corégulateur se retrouve ainsi confiné dans la structure hélicoïdale du domaine. Un résidu lysine (K) de l'hélice H3 et un résidu d'acide glutamique (E) de H12, tous les deux très conservés dans les séquences des NRs, se rapprochent par attraction de charges, enfermant le régulateur à l'intérieur du domaine AF-2 du LBD (Savkur and Burris, 2004) (**figure 23**). À noter que les corépresseurs portent eux aussi le motif d'interaction LxxLL et sont donc capables de reconnaître et de lier les résidus du domaine AF-2. Toutefois, contrairement aux coactivateurs, ils n'induisent pas le repositionnement de l'hélice 12 en une conformation active (Xu et al., 2002).



**Figure 23:** Modélisation de l'interaction entre corégulateurs et LBD.

Le corégulateur est représenté par son motif LxxLL (vert) et le LBD par ses hélices  $\alpha$  n°3 (bleue) et n° 12 (rouge). Les résidus impliqués dans cette interaction (E et K) sont indiqués. *Adapté de Savkur et Burris, 2004.*

### 3.2.2.3. La dimérisation des récepteurs

Outre la fixation du ligand et l'interaction avec ses partenaires, le LBD possède une troisième fonction, à savoir son implication dans la dimérisation du récepteur. En effet, le LBD dispose d'interfaces permettant aux monomères d'interagir et constitue la principale surface de dimérisation pour le récepteur nucléaire. Contrairement au DBD, cette dimérisation est indépendante de l'ADN. Les mêmes hélices de chaque monomère sont réquisitionnées pour former les interfaces d'interaction, à savoir H7, H9, H11 et surtout H10 (pour revue : Moras and Gronemeyer, 1998).

### 3.2.3. La région charnière (Domaine D)

#### 3.2.3.1. *Son rôle dans la localisation du récepteur*

Entre les deux domaines les plus conservés du récepteur se trouve une région charnière (ou *hinge*), appelée domaine D (**figure 18**). La comparaison des séquences peptidiques de cette région entre les membres de la superfamille reflète peu de similarités de résidus (Escriva et al., 2004). Située entre deux domaines très importants d'un point de vue fonctionnel et structurel, cette région a été d'abord perçue comme le reflet d'altérations des deux domaines voisins. Néanmoins, principalement grâce à des expériences de délétions et mutagénèses dirigées, ce domaine D est désormais considéré comme un véritable domaine important pour les fonctions nucléaires du récepteur.

Composées d'environ 12 à 25 acides aminés, ces régions charnières partagent des caractéristiques communes, comme notamment la présence d'un signal NLS (**Nuclear Localization Sequence**). Il est formé d'environ 5 acides aminés basiques (RKxKK), majoritairement des lysines. Son rôle est de permettre la translocation du récepteur dans le noyau, pour agir en tant que facteur de transcription sur l'ADN. Le nombre de NLS varie d'un récepteur à l'autre mais tous sont généralement situés dans des régions flexibles de la protéine, telles que le DBD, le domaine D et le LBD (Cutress et al., 2008). Sa présence dans la séquence du récepteur est essentielle pour son activité transcriptionnelle.

#### 3.2.3.2. *Son rôle dans l'activité nucléaire du récepteur*

Outre son rôle dans la localisation du récepteur et sa position qui lui permet de lier le DBD et le LBD, ce domaine D joue également un rôle important dans l'interaction avec les corégulateurs ainsi que dans la dimérisation du récepteur (Haelens et al., 2007). La délétion du LBD du récepteur à la progestérone (PR) rend le récepteur mutant incapable de se dimériser avec son partenaire ; l'ajout de la région charnière permet de restaurer cette capacité (Tetel et al., 1997). Des mutations spécifiques de ce domaine, notamment en partie C-terminale, proche du LBD, résultent en une perte de liaison de corépresseur, tel N-Cor, participant donc à la régulation de la transcription (Pissios et al., 2000).

Toutefois, d'après les études publiées, le rôle majeur de cette région reste la régulation de la liaison du récepteur à l'ADN. Elle correspond en réalité au CTE, l'hélice  $\alpha$  qui participe directement à l'interaction avec les demi-sites (cf. page 64). Des travaux ont notamment démontré que les deux doigts de zinc du DBD ne permettent pas à eux seuls une forte et spécifique affinité de liaison à l'ADN. La région *hinge* est nécessaire (Melvin et al., 2002).

En effet, bien que peu conservé parmi la superfamille, ce domaine joue un rôle important dans chacune des sous-classes de récepteur, en augmentant la surface d'interaction entre le récepteur et l'ADN (Roemer et al., 2006). De plus, cette région permettrait de « mesurer » la distance entre éléments de réponse pour s'assurer qu'un dimère est bien associé à sa séquence d'ADN. En modifiant uniquement l'espacement des demi-séquences reconnues par la « boîte P », le CTE du récepteur thyroïdien agit comme une « règle » moléculaire qui régule l'occupation des éléments de réponse à l'ADN par les récepteurs, et évite ainsi des conflits de mauvais positionnement de facteurs de transcription sur la chromatine (Rastinejad et al., 1995). Ainsi, bien que moins conservée, cette région joue un rôle essentiel dans la fonction nucléaire du récepteur, notamment grâce à sa grande flexibilité, permettant au domaine DBD de pivoter pour former des dimères de récepteurs sur les éléments de réponse (Giguère, 1999; Green and Chambon, 1987).

En conclusion, le DBD peut être divisé en deux parties : un corps central, qui se lie aux éléments de réponse à l'ADN, et la partie C-terminale (*hinge*), qui permet des contacts supplémentaires entre le récepteur et l'ADN, pour stabiliser leur interaction.

#### 3.2.4. Le domaine amino-terminal d'activation (A/B)

Le domaine N-Terminal (**N-Terminal Domain**, NTD), appelé aussi domaine modulateur ou domaine A/B, est le plus variable parmi les récepteurs nucléaires, tant dans sa séquence peptidique que dans sa taille, pouvant aller d'environ 25 acides aminés à plus de 500 (52 acides aminés pour NTD-TR $\alpha$ , 184 pour NTD-ER $\alpha$ , 420 pour NTD-GR et 566 résidus pour NTD-PR par exemple). Ceci s'explique en partie par le fait que la plupart des isoformes des récepteurs nucléaires soient des variants N-terminaux issus de l'utilisation de différents promoteurs (pour revue : Lavery and McEwan, 2005).

Par des expériences de gènes rapporteurs notamment, des études ont montré que la délétion du domaine de liaison à l'ADN des récepteurs stéroïdiens amène à une activation constitutive des récepteurs. Ceci a permis de mettre en évidence l'existence d'un second domaine d'activation transcriptionnel. Il est localisé au niveau du NTD, nommé AF-1 (**figure 18**). Il est opérationnel indépendamment de la présence du ligand et s'oppose ainsi au domaine AF-2 du LBD (dépendant). Des études de la structure d'AF-1 de plusieurs récepteurs ont mis en avant une flexibilité importante de cette région, capable d'adopter des conformations plus propices à des interactions protéine-protéines (McEwan, 2004). De même que AF-2, AF-1 est reconnu par les corégulateurs du récepteur ainsi que par les autres facteurs de transcription. Ces deux régions encadrent le domaine de liaison à l'ADN et jouent un rôle important dans l'activation de la transcription. En effet, sous l'impulsion de la liaison du ligand, ces deux domaines AF interagissent et agissent en synergie.

Ainsi, leur interaction amène à l'assemblage complet de la fonction d'activation du récepteur, permettant la mise en place de la transcription régulée par l'hormone (Kraus et al., 1995). De plus, la liaison du récepteur aux demi-sites d'ADN semble augmenter la stabilité de la région AF-1. Le DBD agirait donc comme un médiateur allostérique de la communication entre la liaison à l'ADN et l'activation transcriptionnelle du récepteur (Kumar et al., 2001).

Bien que le rôle des acides aminés positionnés en amont de la région AF-1 ne soit pas encore bien établi, ils pourraient être impliqués dans la modulation de l'activation transcriptionnelle, comme pour PR (Giangrande et al., 1997). Cet effet peut notamment être médié par les nombreuses modifications post-traductionnelles qui ciblent majoritairement les sérines et les lysines du NTD. Elles peuvent impacter les interactions récepteur-machinerie transcriptionnelle, la stabilité du récepteur et/ou sa localisation intracellulaire. Nous étudierons plus en détail le cas de PR (cf. page 117).

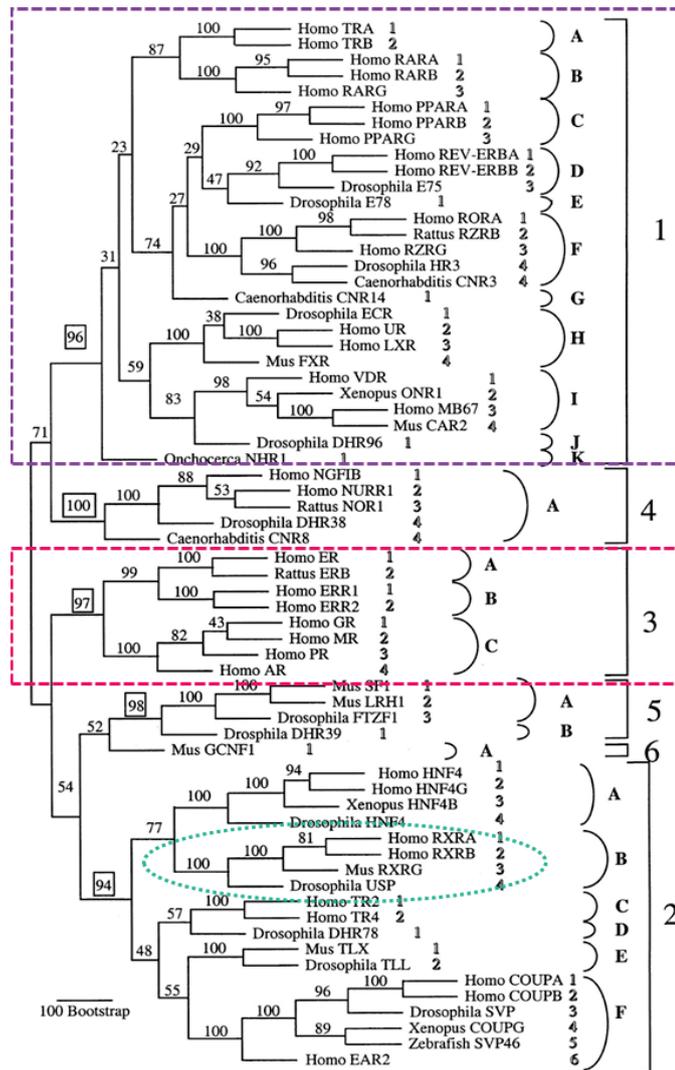
### 3.2.5. La partie extrême carboxy-terminale (F)

Il existe à l'extrémité C-terminale de certains récepteurs uniquement, un domaine F pour lequel peu d'informations sont disponibles (**figure 18**). Bien que les deux isoformes de ER (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) portent tous les deux une région F, leur séquence peptidique ne présente que très peu d'homologie, soulignant le fait que ce domaine est l'un des plus variables de la protéine. Environ 30 à 40 acides aminés composent cette région dans ER, et cette longueur peut atteindre une centaine de résidus chez d'autres récepteurs, comme HNF4 $\alpha$ . Le domaine ne possède pas d'activité indépendante (Schwartz et al., 2002). Toutefois, différentes expériences de mutation et délétion du domaine F d'ER $\alpha$  ont montré une réduction de l'activité transcriptionnelle du récepteur, une augmentation de l'affinité de l'estradiol (le ligand d'ER), une diminution de l'interaction avec le coactivateur SRC-1 ou encore un défaut de dimérisation (Safe and Kim, 2008).

## 3.3. La phylogénie des récepteurs nucléaires

L'alignement de séquences des domaines les plus conservés des récepteurs (DBD et LBD) a permis la construction d'un arbre phylogénétique. 65 membres connus, chez les vertébrés, les nématodes et les arthropodes, ont été analysés. Il a été mis en évidence six groupes évolutifs de récepteurs nucléaires (Escriva et al., 2004; Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999) (**figure 24**).

Le groupe 1 est le groupe le plus large et comprend notamment TR, VDR et certains récepteurs orphelins, comme les Rev-erbs et les LXRs (**figure 24** – encadré violet). Fait notable, tous les récepteurs stéroïdiens sont retrouvés dans le même groupe (n°3), associés phylogénétiquement à l'orphelin ERR (encadré rose).

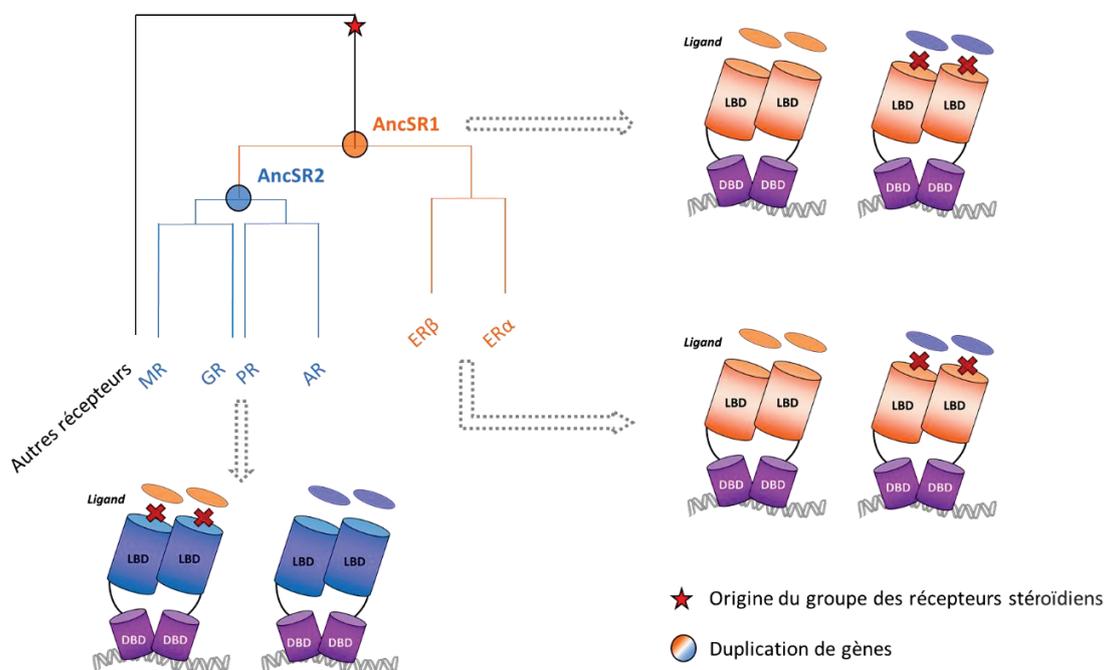


**Figure 24:** L'arbre phylogénétique de la superfamille des récepteurs nucléaires.

De droite à gauche est noté le n° de la sous-famille (1-6), le groupe (en lettres majuscules) et le n° de chaque récepteur au sein de son groupe (1 pour ER et GR, 3 pour PR par exemple). L'encadré violet délimite la sous-famille 1. L'encadré rose délimite la sous-famille 3 qui comprend les récepteurs stéroïdiens. En vert sont entourés les homologues RXRs. *Arbre issu et adapté de Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999.*

L'étude phylogénétique des récepteurs a permis de mettre en évidence que les récepteurs aux ligands connus (stéroïdiens et classe II) n'ont, pour la majorité, pas d'homologue chez les arthropodes et nématodes, contrairement aux récepteurs orphelins. Cela suggérerait que ces derniers soient les récepteurs les plus primitifs. Le récepteur RXR possède lui un homologue chez la Drosophile, nommé USP (**figure 24** – encadré vert). Cependant, RXR lie un ligand uniquement chez les Vertébrés. Ces données démontrent que la capacité du récepteur à lier un ligand est apparue tardivement dans l'évolution et que l'ancêtre commun des RNs était très probablement un récepteur orphelin (Laudet, 1997).

Parmi les six groupes phylogénétiques, les récepteurs stéroïdiens forment un groupe apparenté, présent uniquement chez les Vertébrés (**figure 24** – encadré rose). La conservation de leurs séquences démontre que les six SRs résultent d'un récepteur commun ancestral, appelé AncSR1 (Thornton, 2001) (**figure 25**). Ce dernier partage une structure très proche des isoformes d'ER. Les diverses duplications et divergences du gène du récepteur ancestral au cours de l'évolution ont généré de nouveaux récepteurs, expliquant l'existence de deux sous-groupes phylogénétiquement distincts au sein du groupe n°3, l'un comprenant les deux isoformes d'ER (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) et l'autre regroupant les autres récepteurs (**figure 24** – encadré rose) (Eick and Thornton, 2011). De plus, le travail de Thornton a permis la découverte d'un nouveau concept clé dans l'évolution des récepteurs stéroïdiens, celui de la *ligand exploitation*. On sait que les récepteurs divergents des isoformes d'ER (PR/AR/MR/GR) sont activés par des ligands différents des œstrogènes. Or, si l'hypothèse selon laquelle ER et AncSR1 étaient étroitement liés est vraie, ces ligands existaient déjà, car ce sont des composants intermédiaires dans la voie de biosynthèse des œstrogènes (cf. pages 97 et 99). Ainsi, ces stéroïdes étaient présents avant la genèse de leur récepteur. Après duplication génique, les « nouveaux » récepteurs redondants auraient divergé, s'appuyant sur les métabolites déjà existants comme ligand (Eick and Thornton, 2011) (**figure 25**). Ce concept suggère que les récepteurs « orphelins » pourraient avoir finalement des ligands existants, retrouvés dans les intermédiaires de biosynthèse de métabolites de récepteurs phylogénétiquement proches.



**Figure 25:** La phylogénie des récepteurs stéroïdiens.

Adapté de Eick et Thornton, 2011.

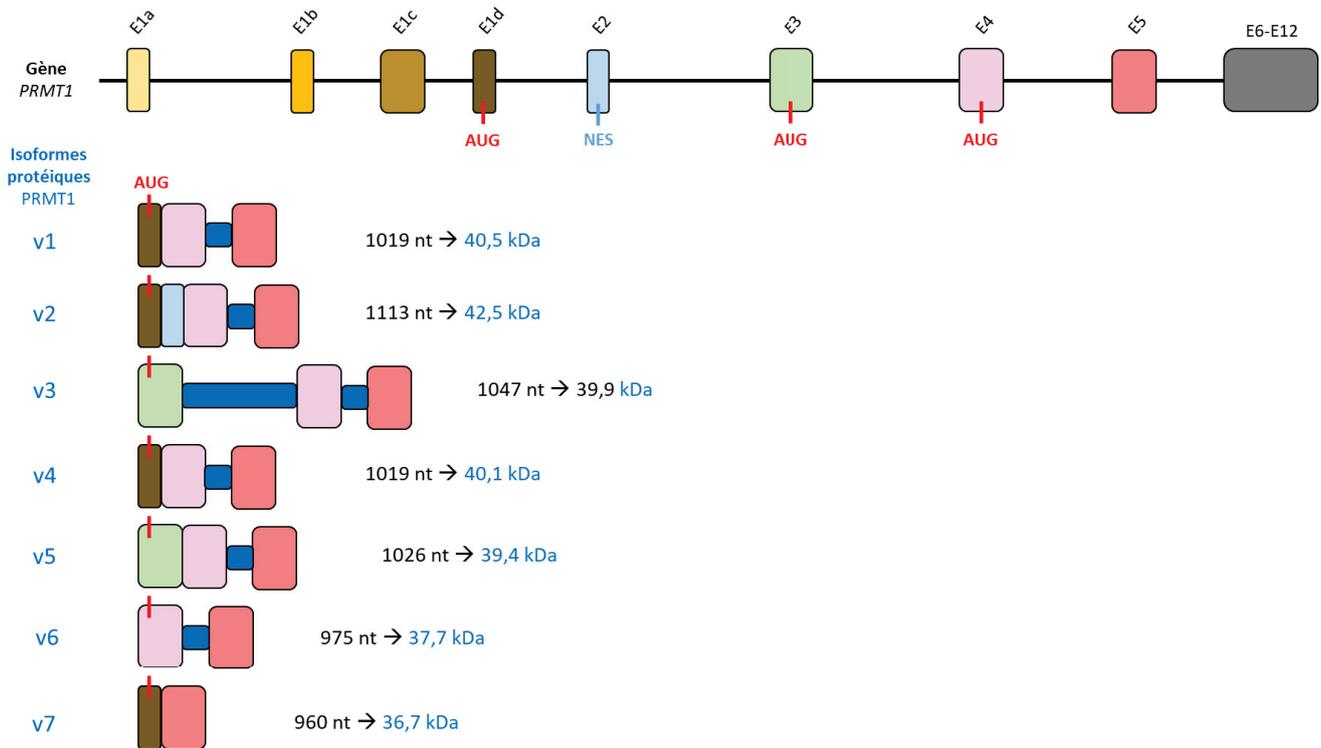
### **Chapitre 3 : La méthylation d'arginines par PRMT1**

La méthylation d'arginines est une modification post-traductionnelle retrouvée fréquemment sur les queues d'histones et participant notamment au remodelage de la chromatine et à la régulation de l'activation de la transcription. Elle est régulée par l'activité des arginines méthyltransférases (PRMTs), les enzymes impliquées dans la déméthylation n'étant encore pas clairement identifiées. Outre les effets sur la chromatine, cette modification est impliquée dans un grand nombre d'autres processus cellulaires, comme la transduction de signalisation dépendante de récepteurs nucléaires, la prolifération cellulaire, la navette nucléo-cytoplasmique de protéines ou encore l'épissage des ARN messagers (Bedford and Richard, 2005). Ces effets sont dépendants de la méthylation de protéines, non histones. Grâce au développement d'outils permettant l'identification des résidus modifiés et des enzymes impliquées, la méthylation d'arginines est apparue comme un processus essentiel à la physiologie de la cellule, mais participe aussi au développement de pathologies.

#### **1. Le gène PRMT1**

PRMT1 est la PRMT de type I responsable de la majorité de la diméthylation asymétrique dans les cellules de mammifères (cf. page 40). L'enzyme est codée par le gène *PRMT1*, localisé sur le bras long du chromosome 19 (19q13.33). Il est hautement conservé parmi tous les eucaryotes. Il couvre une région d'environ 11,3 kb d'ADN génomique et comprend 12 exons et 11 introns (Adamopoulos et al., 2019). D'après le HGNC (**HUGO Gene Nomenclature Committee**), le gène *PRMT1* peut également être retrouvé sous le nom de *HMT1L2* (**H**nRNP (**H**eterogeneous **n**uclear **R**ibo**N**ucleo**P**rotein) **M**ethyl**T**ransferase **1**, *S. Cerevisiae*-**L**ike **2**), *IR1B4* (**I**nterferon **R**eceptor **1**-**B**ound **P**rotein **4**), *ANM1* ou encore *HCP1*.

PRMT1 est généralement considérée dans la littérature comme une seule protéine mais son message est soumis à un épissage alternatif intense. En 2000, trois variants ont été décrits : l'isoforme 1 ([NM 001536](#)), l'isoforme 2 ([NM 198319](#)) et l'isoforme 3 ([NM 198318](#)) (Scorilas et al., 2000). Toutefois, la base de données NCBI *Nucleotide* a supprimé la séquence de l'isoforme 2 car elle serait incapable d'induire l'initiation de la traduction d'un ARN message. Peu de temps après la découverte de ces deux/trois isoformes, l'équipe de Jocelyn Côté a étudié en détail l'organisation génomique de l'extrémité 5' du gène *PRMT1* et a démontré l'existence d'exons en amont de celui qui abrite le codon d'initiation AUG pour les deux premiers variants (**figure 26**). Ces nouveaux exons ont été nommés e1a, e1b, e1c et e1d et amènent à sept, le nombre total de possibilités de variants de *PRMT1* (Goulet et al., 2007). Les régions codantes prédites de ces différents transcrits ainsi que les polypeptides associés sont schématisés en figure 26.



**Figure 26:** Les différents isoformes de PRMT1.

Les exons sont représentés sous forme de rectangles colorés. Les séquences des limites d'introns sont représentées en rectangle bleu. Les sites d'initiation de la traduction sont représentés par des traits rouges. Le signal d'exportation nucléaire localisé dans l'exon 2 et retenu uniquement dans l'isoforme PRMT1v2 est noté en bleu clair. *Adapté de Goulet et al., 2007.*

Enfin, une étude publiée cette année a permis la découverte, grâce à l'utilisation de techniques de séquençage haut-débit, de 58 nouveaux transcrits de *PRMT1*, dont 34 sont des ARN messagers pouvant coder pour de nouveaux isoformes protéiques (Adamopoulos et al., 2019).

## 2. La protéine PRMT1

La structure protéique de PRMT1 partage de très fortes homologies avec les autres membres de sa famille. La protéine de 42 kDa en moyenne compte environ 361 acides aminés, répartis en plusieurs motifs et domaines nécessaires à son activité. Au centre, un domaine catalytique conservé est commun à toutes les PRMTs. Toutes possèdent aussi d'autres motifs importants notamment pour la liaison du donneur de méthyle SAM et pour ses substrats (Zhang and Cheng, 2003).

## 2.1. Les isoformes PRMT1 v1-v7

A l'exception de PRMT1v7, les variants de PRMT1 (v1-v6), sont biochimiquement actifs, c'est-à-dire capables de méthylation *in vitro* sur des substrats connus de PRMT1. De plus, ces formes diffèrent uniquement les unes des autres au niveau de leur partie aminoterminale, partie conférant sans aucun doute une spécificité de substrat. Le travail de *Goulet et al.* a démontré que chaque isoforme possède des caractéristiques distinctes, que ce soit au niveau de la spécificité de substrat, de l'activité enzymatique ou encore de la localisation dans la cellule, soulignant clairement que ces isoformes soient fonctionnellement différents. Par exemple, les variants 4 à 7 semblent spécifiques à certains tissus, comme le cœur, le pancréas ou le muscle, alors que les trois autres sont exprimés de manière ubiquitaire. Fait notable, PRMT1v2 est le seul variant à être exclusivement cytoplasmique. L'analyse de sa séquence génomique a mis en avant une rétention de l'exon 2, codant pour un insert de 18 acides aminés, dans lequel se trouve une séquence d'exportation nucléaire (NES, **Nuclear Export Sequence**) qui, lorsqu'elle est mutée, provoque la rétention nucléaire de la protéine (Goulet et al., 2007) (**figure 26**). Dans la suite du manuscrit, nous considérerons « PRMT1 » comme une entité et les articles cités, s'ils ne le précisent pas, considèrent PRMT1 par son isoforme majeur, PRMT1v1.

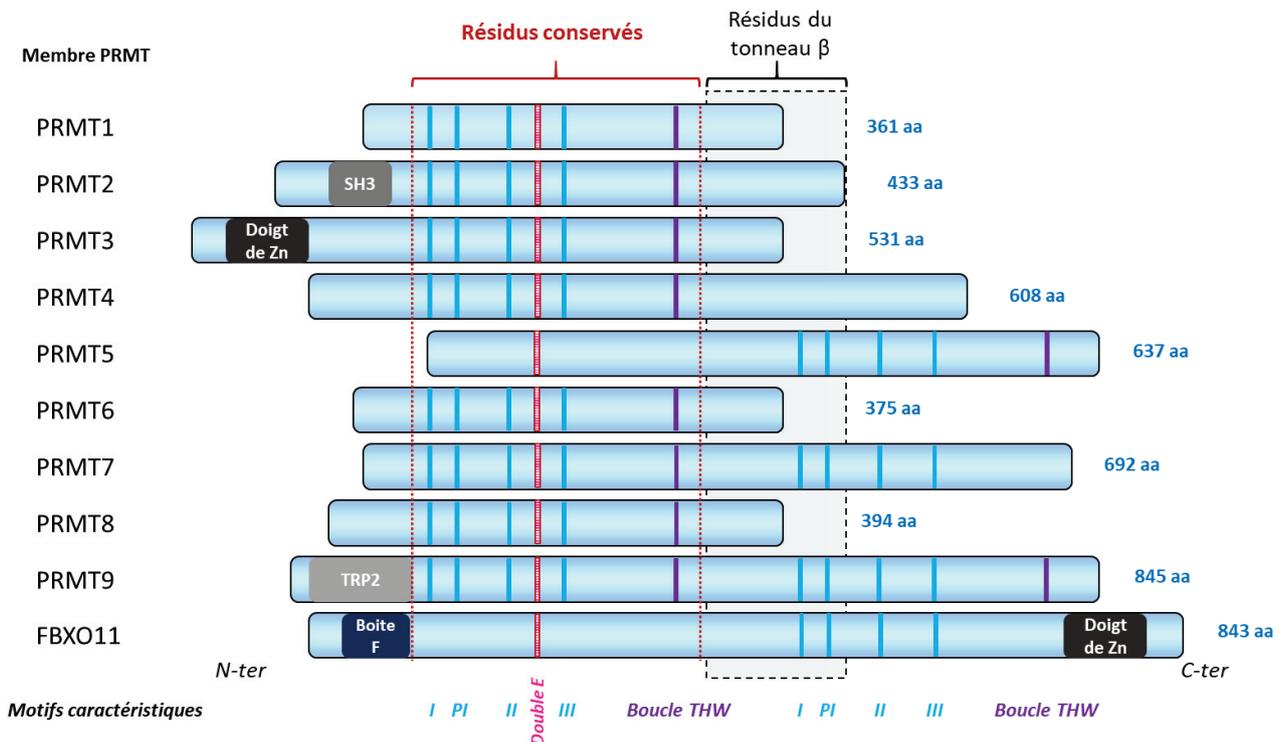
## 2.2. La structure de la protéine

Au début des années 2000, la structure cristalline du noyau catalytique de PRMT1 (acides aminés 22 à 348) a été déterminée chez la levure (Weiss et al., 2000). Cette étude, associée à celles des autres structures de PRMTs, a mis en évidence une conservation structurelle de leur noyau enzymatique. Elles possèdent toutes un domaine catalytique commun d'environ 300 acides aminés en partie centrale de la protéine, ainsi que des sous-domaines importants pour la liaison du donneur de méthyle et pour les substrats. La structure monomérique du noyau enzymatique de PRMT1 est constituée de trois segments structurels importants, que sont le domaine méthyltransférase et le tonneau  $\beta$ , à partir duquel un bras de dimérisation fait saillie (Zhang and Cheng, 2003).

### 2.2.1. Le domaine méthyltransférase (MTase)

Le domaine MTase possède un pli caractéristique (pli Rossman) formant une poche profonde pour la liaison du cofacteur SAM. Ce site consensus est conservé dans toutes les enzymes dépendantes de ce cofacteur (Cheng and Roberts, 2001). Outre cette structure, on retrouve quatre motifs conservés, notés motif I, Post I, motif II et motif III. Ils sont toujours positionnés dans le même ordre sur la chaîne polypeptidique et sont séparés par des intervalles réguliers (Kagan and Clarke, 1994) (**figure 27**).

Ces motifs structurels, caractéristiques des PRMTs, ont notamment été utilisés pour scanner le génome de la levure *S. cerevisiae* à la recherche de nouvelles potentielles méthyltransférases. Le motif I (YFxxY), le motif Post I (DVGxGxG) et un troisième, la « boucle THW » (**T**hreonine-**H**istidine-**T**ryptophan), composent la poche de liaison de l'AdoMet et participent à l'interaction avec le donneur (Jain et al., 2016).



**Figure 27:** Les motifs conservés des PRMTs.

Les différents membres de la famille des PRMTs sont représentés. Tous possèdent les motifs propres aux PRMTs (I, post-I, II et III, en bleu turquoise) ainsi que la boucle THW (en violet). La boucle « double E », importante pour l'activité catalytique, est représentée en rose. Le domaine catalytique, très conservé parmi les PRMTs, est délimité par des lignes en pointillés rouges. Les résidus impliqués dans la structure du tonneau β sont délimités en gris. Certaines protéines disposent également de domaines leur permettant des interactions protéine-protéines. *Adapté de Bedford et Richard, 2005.*

### 2.2.2. La partie C-terminale

Le tonneau β (grand feuillet β enroulé formant une structure quasiment cylindrique au cœur hydrophobe), est localisé en position C-terminale et participe à la liaison du substrat (Zhang et al., 2000). Cette région de la protéine est plus variable que le domaine méthyltransférase.

A l'aide de son bras de dimérisation, PRMT1 a la capacité de former des dimères, ainsi que de plus larges oligomères, l'oligomérisation étant un phénomène conservé parmi les PRMTs (Zhang and Cheng, 2003). La dimérisation semble essentielle à la liaison du donneur de méthyl SAM et donc à son activité enzymatique. Il a notamment été décrit que la formation de dimères de PRMT1 permettrait la production d'arginines asymétriquement diméthylées de manière processive ou semi-processive. En effet, les études semblent s'accorder sur un mécanisme au cours duquel le produit de la première réaction, à savoir l'arginine mono-méthylée, va pénétrer dans le site actif de la seconde molécule de PRMT1 du dimère, sans que le substrat soit libéré ni que le SAM soit reconstitué, permettant une efficacité accrue de la réaction (Osborne et al., 2007).

### 2.2.3. Le site catalytique

Le site catalytique est une profonde poche acide où se loge l'arginine cible de l'enzyme. Les résidus qui constituent ce site actif sont hautement conservés dans la famille des PRMTs. Il est nommé « boucle double-E », dû à la présence de deux acides aminés d'acide glutamique invariants, en position 144 et 153, au sein d'un motif de type SExMGxxLxxExM formant une boucle en épingle à cheveux (**figure 27**). Ces deux résidus sont impliqués dans l'interaction directe avec l'arginine à méthyler. Par leurs charges négatives, ils sont essentiels à la neutralisation de la charge positive du groupe guanidine du substrat (Zhang and Cheng, 2003).

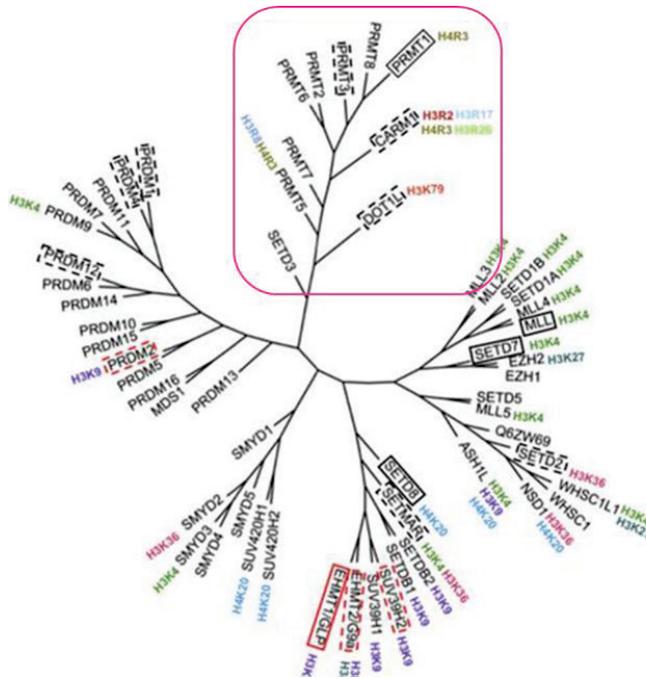
### 2.2.4. L'extrémité N-terminale

Les membres de la famille des PRMTs diffèrent majoritairement au niveau de la région N-terminale, en termes de longueur et de composition peptidique (**figure 27**). Certaines des enzymes possèdent des motifs particuliers impliqués dans les interactions protéine-protéines. On retrouve notamment le motif -SH3 dans PRMT2, qui permet la liaison de l'enzyme aux protéines possédant une région riche en proline. Ce domaine est essentiel notamment pour l'activité nucléaire de PRMT2 (Hou et al., 2018). PRMT3 possède elle, un doigt de zinc et CARM1, par exemple, un domaine -PH (*Pleckstrin Homology*) (Troffer-Charlier et al., 2007). Le rôle précis de toutes ces zones d'interactions protéiques identifiées n'a pas encore été démontré mais elles participent probablement à la liaison du substrat, au recrutement d'autres protéines nécessaires à la formation d'un complexe catalytiquement actif ou contribuent à l'oligomérisation des sous-unités des PRMTs.

PRMT1 elle, ne possède pas de domaine N-terminal particulier.

### 2.3. La phylogénie des PRMTs

Des études phylogénétiques basées sur de multiples alignements de séquences de domaines catalytiques d'enzymes méthyltransférases ont été réalisées et ont permis de confirmer des liens étroits entre les différentes enzymes catalysant les méthylations d'histones (Wu et al., 2010). Parmi elles, les PRMTs représentent un groupe dont les membres sont étroitement apparentés. On les retrouve dans presque tous les groupes d'eucaryotes, c'est notamment le cas pour PRMT1 et PRMT5 (Krause et al., 2007). Au sein de la famille, PRMT1 est étroitement liée à PRMT8 et toutes deux sont plus proches de PRMT3 que de l'autre PRMT de type 1 majeure, CARM1 (**figure 28**). De plus, PRMT9 et PRMT11 sont étroitement liées (PRMT11 ayant été découverte grâce à son homologie de séquence avec PRMT9) et structurellement apparentées à PRMT5, la majeure PRMT de type II.



**Figure 28:** La phylogénie des PRMTs.

Wu et al. ont représenté l'arbre phylogénétique des histones méthyltransférases des cellules humaines. On retrouve les enzymes ciblant les lysines et les PRMTs, ciblant les arginines. En couleur sont indiquées les cibles respectives des enzymes sur la chromatine. L'encadré rose délimite les PRMTs. Adapté de Wu et al., 2010.

En raison du degré élevé d'homologie entre les différentes PRMTs, la création d'inhibiteurs spécifiques d'un seul membre a été difficile et a ralenti la recherche sur les fonctions spécifiques d'une PRMT. Toutefois, le développement d'outils moléculaires dédiés (si-ARNs, modèles de souris mutées, anticorps, etc.) a permis une meilleure compréhension des fonctions cellulaires de ces enzymes, et notamment celles de PRMT1.

### 3. Les fonctions majeures décrites pour PRMT1

#### 3.1. La di-méthylation asymétrique

Pour rappel, PRMT1 fut la première PRMT à être découverte chez les mammifères, par comparaison de séquences avec son homologue Rmt1 chez la levure. Elle est en outre responsable d'environ 85% de la diméthylation asymétrique dans les cellules. Les enzymes de type I, à l'exception de PRMT4/CARM1, reconnaissent préférentiellement des substrats portant un motif riche en glycines et arginines, notés GAR (**G**lycin- and **A**rginine-**R**ich), comprenant plusieurs arginines dans un contexte RGG ou RXR (Rawal et al., 1995; Wada et al., 2002). Toutefois, de nombreux exemples ont démontré que ces dernières, et notamment PRMT1, sont capables de méthyler des arginines dans un contexte dérivé d'un motif GAR ou même isolées. Parmi ces cibles, l'histone H4 est méthylée par PRMT1 sur l'arginine 3, seule arginine en position N-terminale (Met-SGRGKGGKGLGKGGGA...) (Strahl et al., 2001). CARM1 elle ne reconnaît pas de motif spécifique, ce qui rend difficile la prédiction de ses potentiels substrats par recherche *in silico* de séquences peptidiques primaires. Les enzymes de type II, dont PRMT5, méthylent aussi bien des arginines isolées que celles au sein de motifs GAR.

PRMT1 est essentielle pour le développement précoce, comme le montre la létalité embryonnaire des souris mutantes *PRMT1*<sup>-/-</sup> (Pawlak et al., 2000). De plus, la quantité de ses substrats protéiques constitue une part de plus en plus importante du protéome. Ainsi, par la grande diversité des cibles qu'elle méthyle dans la cellule, PRMT1 est impliquée dans un grand nombre d'autres processus physiologiques qui, s'ils sont dérégulés, peuvent amener au développement d'états pathologiques. Nous avons déjà évoqué les rôles de PRMT1 sur la chromatine (cf. page 42). Dans la suite du manuscrit, nous allons nous intéresser à certaines autres fonctions majeures de PRMT1, dont la régulation du métabolisme des ARN messagers, la réparation de l'ADN ou encore la signalisation cytoplasmique.

#### 3.2. Le métabolisme des ARN messagers

Parmi les cibles de PRMT1, la grande majorité sont des protéines associées à l'ARN (Gary and Clarke, 1998). Elles participent à son repliement, à sa stabilisation, à son transport ou encore à son épissage. Chez les eucaryotes, les ARN pré-messagers (pré-ARNm) subissent plusieurs étapes de maturation (coiffage en 5', épissage, polyadénylation en 3', etc.) pour devenir des messagers matures. Ils sont ensuite exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines. Ces différentes étapes sont assurées par l'association de protéines aux ARN pré-messagers, les RBPs (RBP, **R**NA-**B**inding **P**roteins) et les hnRNPs (**h**eterogeneous **n**uclear **R**ibo**N**ucleo**P**roteins) (pour revue : Dreyfuss et al., 1993). Elles gouvernent la formation des complexes de ribonucléoprotéiques (RNP, **R**ibo**N**ucleo**P**articles).

De nombreuses RBPs possèdent dans leur séquence peptidique des motifs GAR. Il a d'ailleurs été démontré que ces résidus sont directement impliqués dans les interactions entre l'ARN et les protéines. En effet, la méthylation augmente le volume et l'hydrophobicité du résidu sans altérer sa charge. Ce maintien est particulièrement important car les arginines chargées positivement participent souvent aux liaisons avec d'autres partenaires.

### 3.2.1. La modulation des interactions

Il a été montré que la méthylation de deux RBPs (Yra1 et Hrp1) par l'enzyme Rmt1 de levure était nécessaire au maintien de l'architecture des complexes RNPs matures. De plus, l'étude de *Rho et al.* a mis en avant que la méthylation de SAM68 (**S**RC-**S**ubstrate **A**ssociated in **M**itosis of **68** kDa) interférait dans sa capacité à lier l'ARN (Rho et al., 2007). SAM68 est une des cibles les mieux décrites de PRMT1. Cette RBP contient des motifs répétés riches en glycines et en arginines (Côté et al., 2002). Il a été démontré que ces motifs non méthylés se lient beaucoup plus efficacement à l'ARN que lorsqu'ils sont modifiés, faisant de l'activité méthyltransférase de PRMT1 un frein à l'activité de son substrat.

### 3.2.2. La localisation des protéines associées à l'ARNm

Outre la régulation des interactions entre RBPs et ARNm, l'une des conséquences majeures de la méthylation d'arginines des protéines associées aux ARNs est la régulation de leur localisation subcellulaire. En effet, elle facilite généralement l'importation nucléaire ou retarde leur exportation, permettant ainsi leur activité adéquate. L'ARN hélicase A est une autre cible bien connue de PRMT1. Elle participe à la maturation des ARNs, notamment lors de l'épissage. La méthylation de ses arginines au sein de motifs RG/RGG, par PRMT1, est essentielle à la translocation nucléaire de la protéine, permettant ainsi son activité (Smith et al., 2004). Cette étude fut d'ailleurs la première à prouver que la méthylation d'arginines pouvait moduler un signal d'import nucléaire d'une protéine de mammifères. D'autres études ont suivi et ont confirmé un rôle de PRMT1, et de son activité, dans la relocalisation nucléaire de protéines hnRNPs (Passos et al., 2006). Le groupe de Côté démontra notamment que la modification des arginines par PRMT1 est également nécessaire à la localisation nucléaire de SAM68, lui permettant une bonne mise en place de ses activités, notamment l'export des ARNs non épissés du VIH (Côté et al., 2002).

### 3.2.3. L'impact sur l'exportation des ARNs

Une fois que l'ARN pré-messager est devenu mature, il est exporté vers le cytoplasme, toujours sous forme de complexe RNP, afin d'être traduit en protéines. Certaines des hnRNPs associées aux ARNs possèdent des séquences d'export nucléaire, laissant suggérer que ces protéines puissent être les médiatrices de l'export des ARNs (Michael et al., 1995).

Chez la levure, Npl3 est le facteur d'exportation majeur d'ARNm et est méthylé par l'enzyme Rmt1 (l'homologue de PRMT1). Sa modification est nécessaire à la sortie du noyau de cette protéine mais dicte également l'exportation efficace du complexe entier ARNm-protéine (Shen et al., 1998; Xu and Henry, 2004). Ces deux études *in vivo* ont permis de démontrer l'implication de la méthylation par Rmt1/PRMT1 sur la régulation de la fonction d'exportation des hnRNPs. Nab2p, une protéine qui lie la queue polyA des ARNs messagers et qui permet leur export vers le cytoplasme, est méthylée par Hmt1p/Rmt1, au niveau des arginines du motif RGG. Cette méthylation est nécessaire à l'exportation efficace de Nab2p et de ses ARNs associés (Green et al., 2002).

Ainsi, la méthylation par PRMT1 influence grandement la localisation et donc l'activité de ses substrats impliqués dans le métabolisme des ARNs.

### 3.3. La réparation de l'ADN

Le maintien de l'intégrité du génome est vital pour assurer la viabilité et le renouvellement des cellules de l'organisme. L'ADN est soumis en permanence à des dommages et des stress, qu'ils soient endogènes (aberrations survenues lors de la réplication par exemple) ou exogènes (facteurs environnementaux, radiations ionisantes, etc.). On estime que chacune des  $10^{13}$  cellules du corps humain fait face à des dizaines de milliers de lésions de l'ADN chaque jour (pour revue : Jackson and Bartek, 2009). Parmi les différents types de dommages causés, les cassures double brins (DSB, **D**ouble **S**trand **B**reaks) sont les plus difficiles et longues à réparer, et certainement les plus toxiques pour la cellule. Des mécanismes de protection et de réparation existent. Toutefois, des erreurs peuvent se produire, conduisant à la perte ou à l'amplification de séquences codantes, voire même à la translocation de parties chromosomiques. Ces événements sont une des sources amenant à la tumorigénèse, si par exemple la région génique délétée codait pour un suppresseur de tumeur.

#### 3.3.1. MRE11 est méthylée par PRMT1

Les protéines MRE11, RAD50 et NBS1 participent à un complexe de réparation des cassures doubles brins des cellules humaines (Dolganov et al., 1996). Ce complexe nucléaire MRN (MRE11/RAD50/NBS1) est essentiel pour la stabilité génique. Il est associé à la chromatine et assure un rôle de surveillance de l'intégrité du génome tout au long du cycle cellulaire. Suite à des radiations ionisantes provoquant une cassure, le complexe est redistribué aux sites lésés, au niveau des foyers nucléaires marqués notamment par la présence de la marque  $\gamma$ H2AX (cf. page 48), et reste sur ces sites jusqu'à ce que les dégâts soient réparés (Lisby et al., 2004).

MRE11 est une protéine nucléaire avec un domaine nucléase en partie N-terminale qui lui permet de tenir un rôle essentiel dans la signalisation et la réparation des DSBs. Outre son domaine catalytique, MRE11 possède un motif GAR, dans le domaine de liaison à l'ADN en partie C-terminale, ciblé par PRMT1 (Boisvert et al., 2005a; Déry et al., 2008). La méthylation de ses arginines est essentielle pour son activité. L'inhibition de PRMT1 ou de son activité enzymatique induit une accumulation de dommages à l'ADN, une diminution de la création de foyers nucléaires localisant ces dommages ainsi qu'une baisse d'interactions entre MRE11 et l'ADN endommagé (Yu et al., 2012).

### 3.3.2. 53BP1 et PRMT1

La phosphorylation de H2AX permet le recrutement d'une multitude de facteurs, dont MRN mais aussi 53BP1 (*p53 Binding Protein 1*). Cette protéine possède dans sa structure un domaine BRCT, un module d'interaction protéine-protéines conservé qui lui permet de lier directement p53, d'où son nom. Comme MRE11, elle possède un motif GAR dans sa séquence peptidique, dans lequel les arginines sont méthylées par PRMT1 (Boisvert et al., 2005b). La méthylation de cette protéine est impliquée dans sa liaison aux cassures double brins, mais n'affecte pas la formation des foyers. Fait intéressant, 53BP1 possède également deux domaines Tudor, un motif conservé liant les résidus méthylés (Charier et al., 2004). Ils lient notamment la marque H3K79me3. L'étude de *Huyen et al.* a démontré que le recrutement de 53BP1 sur les sites de cassures double brins était dépendant de l'interaction entre son domaine Tudor et H3K79me3. Cette marque étant constitutivement présente sur l'ADN des cellules humaines, on peut imaginer que l'irradiation doit la rendre plus accessible à la protéine 53BP1 (Huyen et al., 2004).

Ainsi, ces études soulignent l'importance de la méthylation dans la signalisation des cassures double brins et de leur réparation. Au vu de l'importance de ce mécanisme dans le développement de la tumorigénèse, une meilleure compréhension de la régulation de l'activité de PRMT1 s'avère essentielle. Récemment, *Vadnais et al.* ont identifié un nouveau régulateur de l'activité de l'enzyme dans la réparation d'ADN, à savoir GFI1. Il est exprimé majoritairement dans les cellules lymphoïdes et se trouve impliqué dans le développement de la leucémie. Il permet à PRMT1 de lier, et donc de méthyler, MRE11 et 53BP1. Sa délétion entraîne une baisse importante de la méthylation des deux protéines et une hyper-sensibilité de l'ADN aux radiations ionisantes (Vadnais et al., 2018). GFI1 apparaît donc comme une nouvelle piste intéressante dans le traitement ciblé de certaines leucémies.

### 3.4. PRMT1 et la signalisation cellulaire cytoplasmique

La méthylation dépendante de PRMT1 est également impliquée dans des processus cellulaires extranucléaires. PRMT1 fut la première enzyme de la famille à être liée à la transduction de signal, de par sa capacité à lier la région cytoplasmique du récepteur à l'interféron de type 1 (IFNAR, **IFN-Alpha-Receptor**) (Abramovich et al., 1997). Cette étude a notamment démontré que l'activité de l'enzyme régula l'inhibition de la croissance cellulaire induite par l'interféron. Le récepteur IFNAR lié par son ligand active une cascade de signalisation, de manière dépendante de l'activité du facteur de transcription STAT1 (**Signal Transducers and Activators of Transcription 1**). Ce dernier agit sous forme dimérique dans le noyau et induit l'activation de la transcription de gènes précoces immédiats. L'étude de Mowen et al. a mis en évidence que PRMT1 méthyle STAT1 en partie N-terminale (R31) et que cet événement était nécessaire à l'activité nucléaire du dimère (Mowen et al., 2001). L'inhibition de la méthylation altère l'induction des gènes cibles et bloque l'activité antiproliférative induite par l'interféron. Une étude plus récente a confirmé, *in vitro*, la capacité de PRMT1 à méthyler des membres de la famille STAT (Honda et al., 2017). La différenciation astrocytaire semble dépendante de la méthylation de STAT3, la modification post-traductionnelle permettant d'augmenter l'activité du facteur de transcription dans des cellules embryonnaires murines NS/PCs (**Neural Stem/Progenitor Cells**). Malgré ces résultats, la méthylation des facteurs STATs par les PRMTs reste toutefois controversée, aucune étude n'ayant réussi à confirmer la méthylation de STAT1 *in vivo* par exemple.

Un second exemple de l'implication de la méthylation par PRMT1 dans les voies de signalisations cytoplasmiques fut apporté par notre équipe. Le récepteur aux œstrogènes (ER $\alpha$ ) est ciblé *in vivo* par PRMT1 sur l'arginine 260, résidu localisé dans le DBD du récepteur (Le Romancer et al., 2008). Cette modification intervient lors de la formation du complexe cytoplasmique entre ER $\alpha$ , Src et PI3K, complexe nécessaire à la mise en place de la voie non génomique des œstrogènes. Ces effets cytoplasmiques surviennent rapidement après la liaison de l'estradiol sur son récepteur membranaire car ils sont indépendants de l'activation transcriptionnelle de gènes (Levin, 2009). La formation du complexe ER $\alpha$ -E2/Src/PI3K amène à l'activation de cascades de kinases comme celles de la voie MAPK et Akt (Björnström and Sjöberg, 2005). PRMT1 méthyle ER $\alpha$  de manière transitoire, rapidement après son activation par le ligand, et constitue un prérequis pour le recrutement des partenaires cytoplasmiques du récepteur. L'analyse d'échantillons tumoraux de patientes atteintes de cancer du sein a permis de prouver l'existence de ce complexe *in vivo* dans les cellules normales mammaires. De plus, ER $\alpha$  est retrouvé hyper-méthylé dans un sous-groupe de tumeurs. L'analyse de survie de cette cohorte a mis en avant que la forte expression de ce complexe était un marqueur indépendant de mauvais pronostic (Poulard et al., 2012).

Ainsi, la formation de ce complexe, dépendante de l'activité méthyltransférase de PRMT1, constitue potentiellement un nouveau biomarqueur tumoral permettant de prédire la survie.

Par la diversité des actions qu'elle régule, PRMT1 est une enzyme essentielle à la physiologie normale de la cellule. Ainsi, sa localisation subcellulaire et son activité doivent être rigoureusement régulées, de manière à éviter des dysfonctionnements pouvant amener à l'apparition de troubles pathologiques.

#### 4. La régulation de PRMT1

##### 4.1. La « dé-méthylation » d'arginines ?

Comme décrit précédemment, la méthylation d'arginines est, à l'heure actuelle, un processus irréversible, bien que JMJD6 soit capable de déméthyliser les histones H3R2 et H4R3 (cf. page 43). De plus, nous avons démontré une méthylation rapide et transitoire d'ER $\alpha$ , suggérant que le mécanisme est réversible (Le Romancer et al., 2008). Suite à ce travail, l'équipe a émis l'hypothèse que JMJD6 puisse être l'enzyme responsable de la déméthylation du récepteur. *Poulard et al.* ont montré qu'elle interagissait avec la forme méthylée d'ER $\alpha$  et que son activation induisait une diminution de la méthylation de l'arginine 260 (Poulard et al., 2014). D'autres études ont démontré également l'implication de JMJD6 et de son activité de déméthylation sur de nouvelles cibles non-histones, dont l'ARN hélicase A, la protéine HSP70 ou encore la protéine associée à l'ARN G3BP1 (*Ras GTPase-activating protein-Binding Protein 1*) (Tsai et al., 2017). Le phénomène de désimination peut aussi être impliqué dans la réversibilité de la méthylation (Wang et al., 2004b). Toutefois, ces enzymes bloquent la méthylation en convertissant l'arginine en citrulline, qui ne possède pas de groupe guanidine chargé positivement. Ne restaurant pas l'arginine à son état non-méthylé, elles ne peuvent donc pas être considérées comme de vraies « déméthylases ».

##### 4.2. La liaison de protéines régulatrices

La liaison de protéines liant les PRMTs régule leur activité méthyltransférase, en inhibant, activant ou modifiant la spécificité de substrat des enzymes. PRMT1 est régulée par la protéine BTG1 (*B-cell Translocation Gene 1*) et par le complexe TIS21/BTG2 (Lin et al., 1996). BTG1 n'a pas d'activité catalytique intrinsèque mais agit comme une protéine adaptatrice. Elle permet notamment de recruter PRMT1 dans des complexes transcriptionnels et joue ainsi un rôle important de coactivateur (Berthet et al., 2002). BTG1 et BTG2 interagissent toutes deux avec la protéine hCAF1 (CCR4-associated factor 1), impliquée dans la transcription mais aussi dans la déadénylation de la queue polyA de l'ARN messager (Prévôt et al., 2001). L'étude de *Robin-Lespinnasse et al.* a permis de lier PRMT1 directement à hCAF1, démontrant une interaction nucléaire entre ces deux protéines (Robin-

Lespinasse et al., 2007). Ce facteur de transcription régule négativement la méthylation de deux substrats majeurs de PRMT1, à savoir SAM68 et l'histone H4 dans les cellules de cancer du sein MCF-7. L'interaction hCAF1-PRMT1 permet donc de renforcer le lien entre activité méthyltransférase et métabolisme de l'ARN.

#### **4.3. La coopération entre PRMTs**

Un autre mécanisme de régulation de l'activité de PRMT1 est le partage de ses sites cibles avec d'autres enzymes, et notamment PRMT5. En effet, de nombreuses études ont démontré la capacité de ces deux méthyltransférases à méthyler les mêmes résidus, dont H4R3 (Fabbrizio et al., 2002; Strahl et al., 2001). La méthylation préexistante par PRMT5 peut ainsi moduler/bloquer celle de PRMT1 et limiter l'accessibilité de ses corégulateurs, et réciproquement. Ce *crossstalk* soulève la possibilité que les diméthylations symétriques et asymétriques puissent se réguler. Le groupe de Bedford a notamment montré que l'inhibition de PRMT1 dans des fibroblastes de souris résulte, logiquement, en une forte diminution du niveau de diméthylation asymétrique des arginines, accompagnée paradoxalement d'une augmentation importante de diméthylation symétrique (Dhar et al., 2013). Cette observation suggère que les arginines, dorénavant non méthylables par PRMT1, deviennent plus (+) disponibles pour PRMT5.

Il existe également un certain degré de redondance entre ces deux enzymes, bien qu'elles ne déposent pas la même marque de méthylation, puisque l'inhibition de PRMT1 sensibilise les cellules à l'inhibition de PRMT5 (Gao et al., 2019). Cette étude a en effet mis en évidence que l'atténuation de la voie médiée par une de ces deux enzymes entraîne également une sensibilisation accrue de la voie induite par l'autre enzyme, soulignant là encore un *crossstalk* puissant entre PRMTs, et une vulnérabilité intéressante dans le cadre d'une thérapie ciblée.

#### **5. L'implication de PRMT1 dans le cancer**

PRMT1 est une protéine ubiquitaire exprimée dans la majorité des types cellulaires chez l'Homme. Elle est majoritairement localisée dans le cytoplasme des cellules, localisation cohérente avec l'absence de NLS dans sa séquence, mais cependant étonnante au vu de la majorité de ses substrats nucléaires. Cette particularité souligne une vraie dynamique de l'enzyme au sein de la cellule, ainsi que l'importance d'un transport régulé pour son activité. La régulation fine de l'enzyme est essentielle à une méthylation correcte de ses nombreux substrats. Son expression aberrante est impliquée dans le développement d'états physiopathologiques. Sa surexpression ou son épissage anormal ont notamment été corrélés au cancer.

Le premier rôle de PRMT1 dans l'oncogénèse fut identifié dans les cellules leucémiques. Le gène *MLL*, qui code pour une lysine méthyltransférase, est réarrangé par translocation chromosomique pour former des protéines de fusion chimériques dans les cellules leucémiques. *Cheung et al.* ont fusionné PRMT1 à *MLL* et ont démontré que cette protéine fusion était capable d'activer les propriétés oncogéniques de *MLL* (Cheung et al., 2007). Il est à noter que *CARM1* n'a pas cette capacité. Un autre exemple de l'implication de PRMT1 dans la tumorigénèse est visible par la méthylation de C/EBPs (*CCAAT/Enhancer Binding Proteins*). Cette protéine de liaison à l'ADN participe à la régulation de gènes, notamment impliqués dans la croissance et la prolifération des cellules de cancer du sein (Gery et al., 2005). Il a récemment été découvert que ce facteur de transcription était méthylé par PRMT1 (Liu et al., 2019). Sa modification bloque le recrutement de HDAC3 sur le promoteur du gène de la cycline D1, marqueur important de la prolifération des cellules de cancer du sein. HDAC3 non recruté conduit à la non-répression de l'expression du gène et donc à une augmentation de la croissance cellulaire et à la tumorigénèse (Liu et al., 2019). Par son activité, PRMT1 inhibe la fonction de suppresseur de tumeur de C/EBPs.

De plus, une dérégulation de l'activité de PRMT1 entraîne inévitablement des défauts d'expression ou de localisation de ses substrats, comme SAM68 par exemple. Elle doit être méthylée par PRMT1 pour être active et correctement localisée (Côté et al., 2002). Par son domaine -SH3, elle se lie à d'autres enzymes, dont notamment la kinase BRK (**BR**east **tumor Kinase**). Celle-ci phosphoryle SAM68 dans les cellules cancéreuses et induit une augmentation de sa localisation nucléaire. Les deux protéines sont surexprimées dans les tumeurs du sein et sont liées au caractère tumoral des cellules (Barker et al., 1997; Song et al., 2010). De plus, BRK et SAM68 sont également impliquées dans le développement et la progression de cellules cancéreuses de la prostate, la relocalisation nucléaire de BRK perturbant la capacité de SAM68 à se lier aux protéines associées à l'ARN et perturbant ainsi une voie de signalisation importante pour le maintien du phénotype normal des cellules épithéliales de prostate (Derry et al., 2003).

Une autre explication de l'implication de PRMT1 dans la carcinogénèse mammaire est l'expression spécifique de variants. Des études se sont notamment focalisées sur PRMT1v2, dans lequel a été découvert un signal d'export nucléaire justifiant pourquoi ce variant est exclusivement cytoplasmique (Goulet et al., 2007). De plus, ils ont apporté des éléments prouvant que cet isoforme pourrait être impliqué dans la carcinogénèse mammaire. Bien que l'expression globale de PRMT1 soit élevée dans les cellules cancéreuses de sein et les tissus tumoraux humains, PRMT1v2 présente la plus forte augmentation par rapport à l'isoforme prédominant, PRMT1v1.

Son inhibition par si-ARN entraîne une diminution de la survie des cellules cancéreuses, liée à l'induction de l'apoptose, ainsi qu'une diminution importante de l'invasion de cellules cancéreuses agressives. Sa surexpression dans des cellules de cancer non agressives est suffisante pour les rendre plus invasives (Baldwin et al., 2012). Ces effets tumorigéniques sont spécifiques à cet isoforme. Ainsi, l'épissage alternatif de PRMT1 et la production de différents variants ont un impact important sur le processus de transformation tumorale. Cette idée est appuyée par une étude récente, caractérisant un nouvel isoforme de PRMT1, dépourvu de son bras de dimérisation et corrélé à un phénotype malin (Patounas et al., 2018). Noté PRMT1 $\Delta$ arm, il représente le premier exemple d'isoforme avec une variation du cœur catalytique et non de la partie N-terminale. Sa quantité d'ARN messager est significativement plus élevée dans les lignées cancéreuses d'un sous-type de cancer du poumon (NSCLC) que dans les fibroblastes pulmonaires testés, et corrèle avec une augmentation de l'agressivité (Patounas et al., 2018).

D'autres exemples de corrélation entre PRMT1 et le développement de cancers ont été publiés, notamment dans des tumeurs dépendantes d'hormones (sein, prostate, etc.) (pour revue : Bedford and Richard, 2005). Dans les cellules de cancer du sein, nous avons par exemple identifié ER $\alpha$  comme cible de PRMT1 et lié sa méthylation à l'expression d'un complexe cytoplasmique retrouvé *in vivo*, dans des tumeurs plus agressives (Le Romancer et al., 2008). Sachant que les récepteurs nucléaires sont des acteurs clés dans ces tumeurs hormono-dépendantes et qu'ils partagent une structure très conservée, nous nous sommes intéressés à une autre signalisation essentielle dans la carcinogénèse mammaire, celle de la progestérone.

## **Chapitre 4 : La signalisation du récepteur de la progestérone**

Le récepteur de la progestérone est un récepteur nucléaire de classe I, dit « stéroïde », composé des six domaines fonctionnels caractérisant cette famille protéique (cf. page 62) (Mangelsdorf et al., 1995). Par abus de langage, ce récepteur est abrégé PR, mais en réalité deux isoformes distincts ont été identifiés dans les cellules humaines, PR-A et PR-B. Chacun possède des caractéristiques propres mais PR-B est le variant protéique fonctionnel majeur dans les cellules du sein. Son DBD lie la progestérone naturelle, ainsi que l'agoniste R5020 (la promégestone), ligand majoritairement utilisé dans les études publiées. Cette hormone joue des rôles essentiels dans la reproduction humaine, principalement chez la femme, et sa signalisation est étroitement liée à celle des œstrogènes. PR possède néanmoins des particularités dans son activité qui le distingue des autres membres du groupe stéroïdien, et font de lui un facteur de transcription singulier et très intéressant.

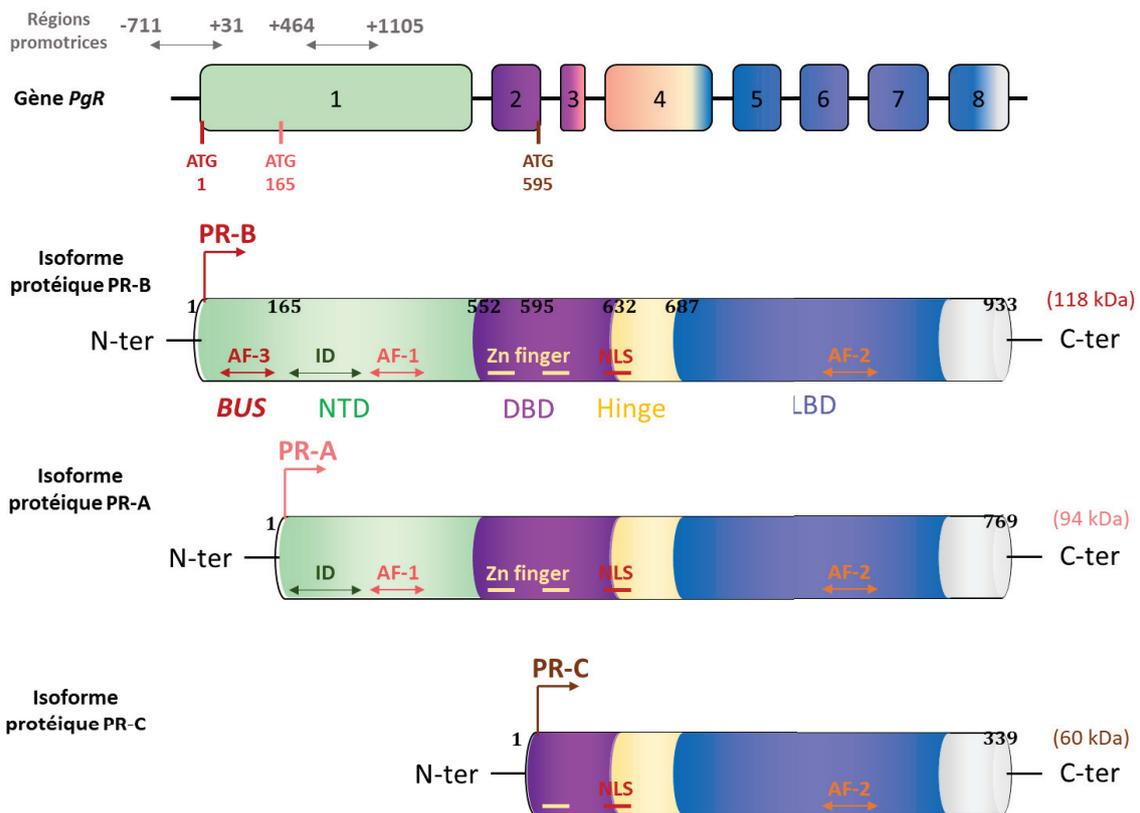
### **1. La structure de PR**

#### **1.1. Son gène et ses variants protéiques**

##### **1.1.1. *PgR*, le gène codant PR**

Le gène codant le récepteur à la progestérone (*PgR*) est localisé sur le chromosome 11 (11q2.2) chez l'Homme. Il est composé de huit exons codants (**figure 29**) (Misrahi et al., 1993). *PgR* code pour deux isoformes protéiques majeurs dans les cellules, notés PR-A et PR-B. Leur DBD est identique, codé par deux exons, chacun correspondant à un doigt de zinc du domaine (cf. page 64). La forme A, plus courte que la forme B, est dépourvue du premier exon, codant pour environ 164 acides aminés en partie N-terminale. *Kastner et al.* ont ensuite démontré que les deux formes de PR sont transcrites à partir de deux promoteurs différents, identifiant ainsi deux ARNm différents (Kastner et al., 1990). Le premier, codant pour la forme longue PR-B, possède dans sa structure génique un promoteur fonctionnel situé entre -711 et +31, avec le codon d'initiation ATG1. Les cellules humaines T47D de cancer du sein expriment également un second ARN messager, avec une région promotrice située entre +464 et +1105. Ces transcrits, aux extrémités 5' débutant en aval du codon ATG1, sont capables de générer la forme A de PR, mais pas la forme B (**figure 29**). De plus, ces deux promoteurs sont inductibles par l'œstrogène. L'étude du promoteur de *PgR* chez le rat a permis d'identifier différents sites ERE, imparfaits mais fonctionnels, sur lesquels ER vient se fixer (Kraus et al., 1994). La présence de ces demi-sites explique la réactivité du promoteur aux œstrogènes. L'expression des récepteurs PRs, notamment PR-B, est stimulée par ER $\alpha$  mais pas par ER $\beta$  (Flötotto et al., 2004).

La région 5' des transcrits de PR est très hétérogène et son analyse par *Northern-Blot* a conduit à l'hypothèse de l'existence d'autres transcrits. D'autres codons ATG ont été découverts, capables d'initier la traduction (Cork et al., 2008; Wei et al., 1990). L'un d'entre eux, une méthionine en position 595, conduit à la synthèse d'un nouvel isoforme de PR, noté PR-C, tronqué des codons ATG1 et ATG2 ainsi que d'une grosse partie N-terminale (**figure 29**). Ce variant est exprimé dans les cellules humaines et semble répondre, comme les deux autres, à la liaison du progestatif à son récepteur. D'autres isoformes donnent synthèse à des protéines de différents poids moléculaires (38 kDa, 71, kDa, 78 kDa), dans des tissus malins majoritairement. D'autres isoformes encore pourraient être également des médiateurs génomiques stimulés par les progestatifs (Hirata et al., 2002). Toutefois, leur rôle en tant que récepteur nucléaire reste très peu étudié et peu de preuves ont été apportées quant à la fonctionnalité de ces protéines en tant que facteur de transcription capable de médier une signalisation en réponse à l'hormone.



**Figure 29:** Les trois isoformes du récepteur à la progestérone chez l'Homme.

En haut est représenté le gène *PgR* avec ses exons et les trois ATG/AUG initiant la synthèse des trois isoformes protéiques dans les cellules humaines (PR-A, PR-B et PR-C). Abréviations : AF : Domaine de transactivation ; ID : Domaine inhibiteur ; *Zn finger* : doigt de zinc ; NLS : Signal de localisation nucléaire.

Adapté de Cork et al., 2008.

## 1.1.2. Les variants protéiques de PR

### 1.1.2.1. *Les isoformes majeurs PR-A et PR-B*

Les deux isoformes PR-A et PR-B possèdent le domaine de liaison à l'ADN (DBD), la région *hinge* et le domaine de liaison du ligand (LBD) (**figure 29**). De plus, les deux domaines de transactivation (AF, *Activation Function*) sont conservés. Tous ces domaines sont importants pour la régulation de la transcription des gènes cibles des récepteurs stéroïdiens. Malgré cette forte conservation de structure, les deux récepteurs PRs diffèrent par leur potentiel d'activation transcriptionnel. En effet, PR-B est un puissant activateur des gènes cibles de la progestérone, alors que PRA est soit inactif dans plusieurs types cellulaires, soit considéré comme un répresseur transdominant de PR-B. La seule différence de structure entre eux résidant en partie N-terminale, il a alors été émis l'hypothèse qu'elle abritait un domaine particulier expliquant cette différence.

#### 1.1.2.1.1. La partie N-terminale

##### 1.1.2.1.1.1. *Le domaine BUS*

La protéine PR-A compte 769 acides aminés dont une partie N-terminale de 402 résidus. PR-B compte lui 933 acides aminés au total, les 164 acides aminés supplémentaires étant localisés à l'extrémité N-terminale, absente chez PR-A (**figure 29**). Cette partie spécifique à PR-B est appelée BUS (**B-Upstream Segment**) (Sartorius et al., 1994). L'étude de Meyer et al. a démontré que cette partie abritait un troisième AF, pouvant ainsi expliquer les différences d'activité transcriptionnelle entre PR-B et PR-A. Néanmoins, contrairement à AF1 et AF2, AF3 seul associé à DBD-GAL4 n'a pas de capacité d'activation des promoteurs (Meyer et al., 1992). Il a par la suite été montré que, dans les cellules HeLa, la construction BUS-DBD-NLS de PR active de manière forte et autonome la transcription du gène codant la chloramphénicol acétyltransférase (CAT), à partir d'un promoteur contenant deux éléments de réponse à la progestérone (Sartorius et al., 1994). L'étude a donc mis en évidence que le BUS (contenant AF3) avait absolument besoin de la présence d'un DBD intact et actif sur le plan transcriptionnel. Des mutants DBD de PR qui ne peuvent pas se lier à l'ADN ou dont la spécificité de liaison est impactée, ne permettent pas au fragment BUS une activité transcriptionnelle. Ainsi, cette partie N-terminale BUS contient bien un AF3, qui nécessite un DBD fonctionnel pour être en conformation stable et donc active (**figure 29**).

Mais comment influence-t-il l'activité de PR-B ? Tung et al. ont identifié deux régions importantes dans la partie BUS, désignées R1 et R2. La délétion de l'une ou l'autre de ces régions diminue de plus de 60% l'efficacité de transcription du récepteur ; leur délétion simultanée l'affecte de plus de 90% (Tung et al., 2001).

Ces deux régions clés portent chacune un motif consensus de type LxxLL, identique à ceux retrouvés sur les coactivateurs des récepteurs nucléaires (cf. page 67) (Horwitz et al., 1996). Il semblerait donc que la région BUS, et AF3 à l'intérieur, soient impliquées dans des interactions protéine-protéines, avec des coactivateurs notamment, permettant l'activité transcriptionnelle forte de PR-B (Takimoto et al., 2003). Outre ces interactions intermoléculaires importantes, la synergie d'AF3 avec AF1 et AF2 est maximale lorsque le domaine LBD est lié à l'hormone. Ceci souligne également l'importance d'une communication intramoléculaire, entre le domaine N-terminal (BUS) et la partie C-terminale du récepteur (DBD-HBD), en vue de stabiliser la structure de PR-B et de lui permettre une efficacité transcriptionnelle optimale.

#### 1.1.2.1.1.2. *Le domaine inhibiteur (ID)*

Certains facteurs de transcription possèdent également des domaines inhibiteurs, ou ID (*Inhibitory Domains*), qui répriment l'activité des AFs. Ils ont été identifiés principalement par expériences de mutagenèse et délétion de résidus, générant des protéines à l'activité transcriptionnelle améliorée. Le facteur de transcription c-Jun de la famille AP-1 est un exemple de protéine à domaine ID (Baichwal et al., 1992). Le groupe d'Horwitz a identifié un domaine inhibiteur en région N-terminale de PR, 292 acides aminés avant AF1 (**figure 29**). Étonnamment, bien qu'il soit présent sur les deux isoformes, il n'est actif que pour PR-A. Il est alors né l'hypothèse selon laquelle la partie BUS, située plus en amont sur PR-B uniquement, pourrait cacher le domaine ID et ainsi lever son action inhibitrice. En effet, l'ID inhibe spécifiquement l'activité de AF1 et AF2 mais n'altère pas AF3 qui est en amont, expliquant pourquoi PR-B est un transactivateur plus puissant que PR-A (Hovland et al., 1998). Les études réalisées sur la partie N-terminale ont permis de souligner son importance dans l'activité du récepteur mais surtout, dans les différences entre les deux isoformes majeures, PR-A et PR-B. Bien qu'ils disposent tous deux du même DBD et du même LBD, ces deux variants issus de deux promoteurs distincts régulés par les œstrogènes activent différemment la transcription de gènes cibles de la progestérone.

#### 1.1.2.1.2. Les rôles distincts des isoformes

##### 1.1.2.1.2.1. *Les différences phénotypiques*

Afin de comprendre si les deux isoformes jouaient des rôles distincts *in vivo*, des modèles murins délétés de PR-B ont été mis au point. Les conclusions de ces essais révèlent que PR-A et PR-B sont tous deux physiologiquement importants. Les souris KO pour PR total présentent des anomalies majeures de la reproduction, dont une incapacité à ovuler et une hyperplasie utérine, un développement incomplet des glandes mammaires ainsi qu'une altération du comportement sexuel.

Néanmoins, le développement de la glande mammaire est majoritairement dépendant de PR-B (Mulac-Jericevic et al., 2003). PR-A joue de son côté un rôle important sur la muqueuse utérine. Cet isoforme est nécessaire à la quiescence de ce tissu et lutte contre l'effet prolifératif de PR-B (Mulac-Jericevic et al., 2000). Ainsi, PR-A et PR-B sont responsables de fonctions physiologiques différentes.

PR est un facteur essentiel du développement de la glande mammaire et par conséquent, dans la dérégulation de sa physiologie et l'apparition d'états pathologiques. Bien que la présence du récepteur soit mesurée en routine dans les tumeurs mammaires pour la prise de décision de traitement, aucune distinction n'est faite entre PR-A et PR-B. Peu d'études se sont intéressées à l'analyse du *ratio* d'expression PR-A : PR-B. *In vivo*, les deux isoformes sont co-exprimés en quantités sensiblement identiques dans les cellules normales, avec PR-B qui induit les effets signalétiques. Ce *ratio* est généralement altéré de manière significative dans les tissus pathologiques. Au niveau de la glande mammaire plus spécifiquement, une analyse de 202 tumeurs PR-positives montre que le taux d'expression de PR-A est supérieur à PR-B dans près de 60% des cas, voire même quatre fois supérieur dans 25% des tumeurs analysées (Graham et al., 1995). D'autres études ont démontré qu'un déséquilibre, en faveur de l'un ou l'autre des isoformes, a des conséquences majeures sur le développement mammaire (Shyamala et al., 2000).

L'ensemble des études *in vivo* a apporté des preuves solides quant aux rôles distincts de chacun d'eux sur la physiologie chez la femme. Ces différences phénotypiques s'expliquent très probablement par la différence de structure et de potentiel d'activation transcriptionnel des deux isoformes. PR-B fonctionne comme un puissant activateur de la transcription, dans une large variété de types cellulaires et pour plusieurs promoteurs dépendants de PR, pour lesquels PR-A est généralement inactif (Tung et al., 1993). Dans ces mêmes conditions, PR-A est capable de lier le ligand et de réprimer l'activité transcriptionnelle de PR-B, mais également d'autres récepteurs stéroïdiens comme ER $\alpha$  (Giangrande and McDonnell, 1999).

#### 1.1.2.1.2.2. Régulation distincte de gènes cibles

L'observation selon laquelle PR-A et PR-B agissent sur des promoteurs spécifiques sous-entend que chacun d'eux est capable de réguler un sous-ensemble spécifique de gènes. Cette hypothèse est cohérente avec les différences phénotypiques observées sur la glande mammaire et les autres tissus *in vivo*. Une des premières études qui se soit intéressée à cette hypothèse a utilisé les cellules de cancer du sein T47Dco, co-exprimant les deux isoformes dans un ratio 1 :1 (Richer et al., 2002).

Ce modèle cellulaire artificiel a permis de montrer qu'en effet, les deux formes régulent des sous-ensembles différents de gènes cibles, de manière dépendante de la progestérone. De plus, bien que PR-B soit plus actif transcriptionnellement (65/94 gènes régulés), il existe des gènes régulés uniquement par PR-A (4/94 gènes) et d'autres dépendants des deux variants (25/94). Cette première étude permet de confirmer le rôle majeur de PR-B dans les cellules du sein (bien que PR-A soit exprimé en quantité similaire) et souligne également la capacité de PR-A à réguler spécifiquement des gènes, malgré l'absence des domaines BUS et AF3.

*Graham et al.* ont ensuite cherché à confirmer ces résultats. Ils ont examiné l'expression des gènes régulés par PR activé par son hormone, dans des tissus mammaires présentant une expression physiologique de PR-A et PR-B (ratio 1 : 1). Ils ont également analysé l'expression de gènes dans des cellules du sein, stimulées à l'hormone, dans lesquelles PR-A a été induit pour devenir l'isoforme prédominant (ratio 5 : 1), modélisant ainsi les niveaux observés dans les tissus de sein tumoraux (Graham et al., 2005). Ils ont ainsi pu montrer que le déséquilibre du ratio en faveur de PR-A sensibilise un sous-groupe de gènes cibles (82 gènes), impliqués majoritairement dans des voies de signalisation influençant la forme cellulaire et l'adhésion. Ceci confirme tout d'abord que PR-A est capable de réguler un ensemble de gènes. De plus, les résultats suggèrent que les effets des progestatifs sur la forme et l'adhérence des cellules tumorales sont dépendants de la balance entre les deux isoformes. Ainsi, puisque ces gènes n'étaient pas des cibles de la progestérone en condition physiologique, cette étude souligne la possibilité que la prédominance de PR-A puisse induire l'acquisition de nouveaux gènes cibles dépendants de la progestérone.

#### *1.1.2.1.2.1. Impact plus global sur la transcription*

Plus récemment, le groupe de Greene a publié une étude très poussée sur les distinctions entre PR-A et PR-B dans les cellules T47D. Par des techniques d'analyse à large échelle comme le ChIP-Seq, ils ont notamment montré que près de 10 000 sites de liaisons à l'ADN sont spécifiques à PR-A, contre moins de 8 000 pour PR-B et seulement 4480 sont communs aux deux isoformes (Singhal et al., 2017). Les isoformes sont donc recrutés différemment dans le génome bien qu'ils possèdent le même domaine de liaison. Ils lient tous deux les mêmes motifs sur l'ADN, ce qui suggère que des cofacteurs distincts soient impliqués pour faciliter le recrutement différentiel des deux PRs sur l'ADN. Par spectrométrie de masse, les auteurs ont en effet révélé un recrutement différent de corégulateurs pour chacun des isoformes (STAT1 et NRIP1 par exemple, lient préférentiellement PR-A alors que MLL2 et KLF5 lient PR-B). Des corégulateurs clés de l'épigénétique comme p300 sont enrichis pour les deux récepteurs (Singhal et al., 2017).

Ces résultats, associés à ceux obtenus précédemment démontrant une régulation différentielle de gènes cibles, ont amené *Singhal et al.* à analyser l'expression globale des gènes affectés par chacun des deux isoformes. Ils ont confirmé que PR-A est un répresseur transcriptionnel plus important que PR-B, en régulant négativement 375 gènes, contre seulement 53 pour PR-B, et avec une plus grande amplitude. De plus, les deux isoformes ont des effets opposés sur les phénotypes induits par les progestatifs, dont l'invasion et la prolifération des T47D ; PR-B favorise la prolifération mais diminue la migration alors que PR-A possède lui l'effet inverse. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études préalables démontrant une relation entre la balance des deux isoformes et l'invasion de cellules tumorales mammaires (Bellance et al., 2013; Singhal et al., 2017).

En somme, l'ensemble de ces études soulignent une régulation distincte des deux isoformes sur l'expression de gènes cibles, ainsi que sur le cistrome et l'interactome de PR dans les cellules du sein, amenant à des phénotypes différents voire opposés. Ces résultats confirment la nécessité d'études plus approfondies, en vue d'un criblage thérapeutique dépendant de l'isoforme de PR dans les cellules tumorales dites PR-positives.

#### 1.1.2.2. Les autres isoformes protéiques

##### 1.1.2.2.1. L'isoforme PR-C

Un troisième isoforme protéique de PR existerait dans les cellules de cancer du sein T47D. PR-C, au site d'initiation de la traduction localisé dans le DBD, est déléché des deux doigts de zinc, le rendant incapable de se lier aux PREs (Wei et al., 1990) De plus, les deux premiers AFs sont manquants (AF1 et AF3), suggérant une faible capacité d'activation transcriptionnelle (**figure 29**). Toutefois, cette protéine d'environ 60 kDa lie l'hormone au niveau de son LBD, qui est intact, puis se dimérise (Wei and Miner, 1994). PR-C forme des hétéro-dimères avec PR-B et, en raison de son incapacité à lier l'ADN, perturbe la liaison de PR-B sur ses PREs ; il réduit donc son activité de facteur de transcription. De manière plus surprenante, il possède également un effet potentialisateur sur l'activation transcriptionnelle de PR-B. Ceci pourrait être dû à la capacité de PR-C à interagir avec des corépresseurs, empêchant la liaison de ces derniers avec PR-B (Wei et al., 1997).

Bien que PR-C semble être exprimé dans les cellules T47D, son action serait néanmoins restreinte à l'utérus. Une étude révèle que les niveaux protéiques de cet isoforme augmentent de manière significative dans l'utérus des femmes en train d'accoucher. Cette augmentation du ratio PR-C : PR-B contrecarrerait la quiescence de l'endomètre utérin induite par PR-B lors de la grossesse et favoriserait la contractilité utérine amenant à l'accouchement (Condon et al., 2006).

Une étude plus récente dans des tissus humains liés à la reproduction (muqueuse utérine, ovaire, placenta, etc.) a démontré que PR-C serait l'isoforme majeur et actif, et non PR-A, mais ses rôles restent peu compris (pour revue : Taylor et al., 2009).

#### 1.1.2.2.2. Les autres isoformes mineurs

D'autres variants d'épissages de PR ont été décrits, dont l'existence *in vivo* a été plus ou moins prouvée. Comme pour PR-C, certains ont subi des délétions de domaines fonctionnels entiers, altérant probablement les fonctions du récepteur. Parmi eux par exemple, deux variants ont été identifiés comme PR-S et PR-T, notamment dans l'endomètre. La structure des deux protéines n'est pas encore connue mais au vu de la longueur des messagers identifiés, ces deux isoformes pourraient correspondre à la totalité ou presque du LBD. Ainsi, sans DBD, ils joueraient peut-être un rôle dans la signalisation cytoplasmique plutôt que nucléaire (Hirata et al., 2002).

Bien que certaines études montrent l'existence de ces variants d'épissage alternatif du gène *PgR* dans les cellules humaines, une étude *in vivo* plus approfondie du profil d'expression et de l'activité de ces variants s'avère indispensable pour améliorer notre compréhension du statut de PR dans les tissus, sains et tumoraux. Malheureusement, cette étude est ralentie par le manque d'outils capables de détection spécifique de chaque isoforme. Par leur étude de 2008, *Samalecos et Gellersen* ont insisté sur l'importance de rester prudent avec la découverte de plusieurs isoformes de PR et sur leur réelle existence *in vivo*. Ils démontrent que les anticorps disponibles sur le marché ne permettaient pas une identification sans ambiguïté des isoformes PR décrits (Samalecos and Gellersen, 2008). Selon eux, l'isoforme PR-C n'a pas d'origine naturelle par exemple. Leur vecteur d'expression contenant un ADNc avec la région 5' encadrant le triplet codant pour la Met-595, n'a pas été traduit *in vivo*. De plus, cet ADNc conduit à la production d'une protéine de 38 kDa, ce qui correspond à sa masse théorique prédite de 39 kDa, mais nettement inférieure à 60 kDa comme couramment attribuée à PR-C. Ils concluent en soulignant que l'ensemble de ces démonstrations reposent sur des anticorps faiblement spécifiques, et donc que l'existence de ces variants mineurs devrait être sérieusement remise en question.

L'étude de la compréhension des isoformes de PR s'est d'ailleurs vite recentrée sur PR-B et PR-A uniquement. Surtout, il faut noter que la grande majorité des études sur la signalisation de la progestérone ne fait pas la distinction entre les deux isoformes du récepteur et considère PR comme une seule entité, à savoir PR-B.

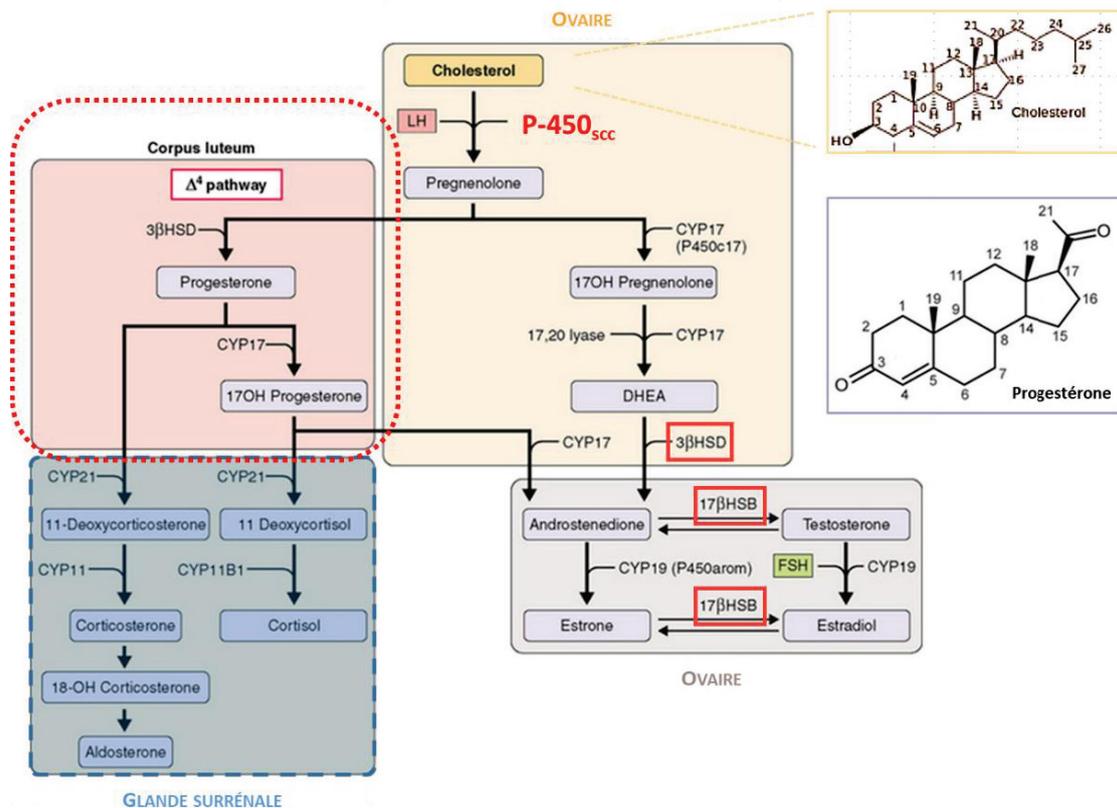
## 2. Son ligand, la progestérone

Chez la femme, la progestérone est une hormone clé dans la régulation des activités de l'appareil reproducteur. L'hormone stéroïdienne sexuelle joue un rôle important dans l'ovulation, dans l'implantation de l'embryon dans l'utérus après fécondation, ainsi que dans le maintien de la grossesse. Ces caractéristiques expliquent d'ailleurs l'étymologie de son nom, qui vient du latin *pro gestationem* (implication dans la gestation). Elle coopère notamment avec une autre hormone sexuelle, l'œstrogène, dans le maintien de ces états physiologiques. Les deux stéroïdes participent également au développement de la glande mammaire et à son homéostasie. La dérégulation de leur synthèse et/ou de leur activité peut amener à de graves troubles pathologiques, dont le cancer du sein.

### 2.1. La structure et la synthèse de la progestérone

Comme toutes les hormones stéroïdiennes, la progestérone est composée d'une structure commune de cyclopentanoperhydrophénanthrène, un complexe polycyclique de carbone. Ces hormones sont toutes produites à partir du même précurseur, le cholestérol (**figure 30**). Ce dernier est ensuite transformé en prégnénolone dans l'ovaire par l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol, notée P-450<sub>scc</sub> (*cholesterol side-chain cleavage enzyme* ou *cholesterol desmolase*). Cette réaction mitochondriale, appelée « réaction de clivage de la chaîne du cholestérol » est la première étape de synthèse des stéroïdes (**figure 30**).

La production des produits en aval de la prégnénolone dépend des sites de production, l'ovaire ou la glande surrénale (**figure 30**). En effet, bien que la voie de synthèse des stéroïdes soit globalement la même dans chaque organe « usine », le type et la quantité de stéroïdes produits dépendent de l'expression des enzymes de production. Par exemple, la prégnénolone est convertie en progestérone, en androgènes et en œstradiol dans l'ovaire, par l'action des enzymes 3 $\beta$ -HSD (**3 $\beta$ -HydroxySteroid Dehydrogenase**) et 17 $\beta$ -HSD majoritairement (Beaudoin et al., 1997). Cependant, comme l'organe n'exprime pas les enzymes 21 $\alpha$ -hydroxylase (CYP21) et 11 $\alpha$ -hydroxylase (CYP11), l'aldostérone et le cortisol ne sont pas produits dans l'ovaire mais uniquement dans la glande surrénale. Cette voie surrénalienne constitue d'ailleurs la principale source de minéralocorticoïdes et de glucocorticoïdes (**figure 30**).



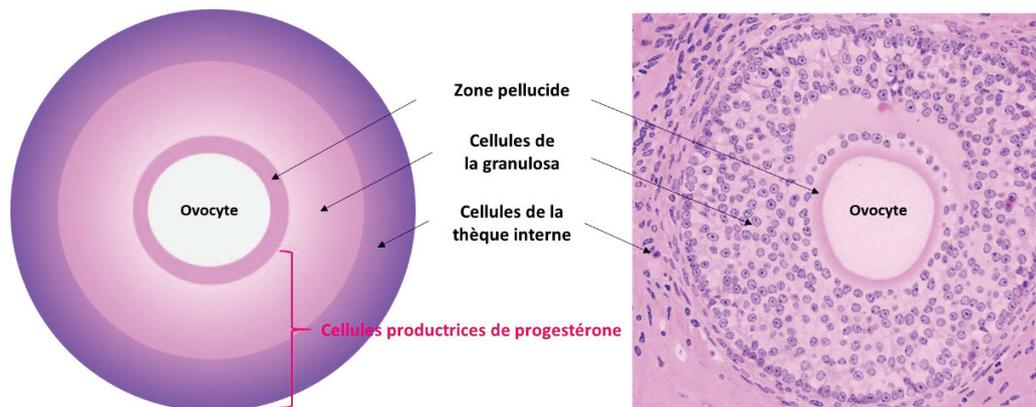
**Figure 30:** La biosynthèse des hormones stéroïdiennes.

Adapté de <https://clinicalgate.com> (Ovarian Hormones: Structure, Biosynthesis, Function, Mechanism of Action)

## 2.2. L'ovaire, lieu de synthèse de l'hormone

### 2.2.1. Sa structure

Les effets biologiques de la progestérone observés dans le corps de la femme sont majoritairement dus aux progestatifs produits par l'ovaire, et plus particulièrement par son unité endocrine de base, le follicule ovarien (Salomon and Sherman, 1976). Il abrite l'ovocyte, le futur ovule mature, entouré de couches de cellules responsables de la production et la synthèse des hormones sexuelles ovariennes, les œstrogènes et la progestérone majoritairement (Ryan and Petro, 1966). L'ovocyte est entouré d'une fine zone de glycoprotéines appelée zone pellucide, sur lesquelles vont se lier les protéines à la surface du sperme (**figure 31**). Cette zone protéique sépare l'ovocyte en maturation, de la première couche de cellules endocrines, la granulosa. Ces cellules sont séparées de leurs partenaires endocrines, appelées cellules de la thèque interne, par une membrane basale. Ces deux couches de cellules sont régulées de manière différentes par les hormones hypophysaires, la FSH (**Follicle Stimulating Hormone**) et la LH (**Luteinizing Hormone**) (Gieske et al., 2008).



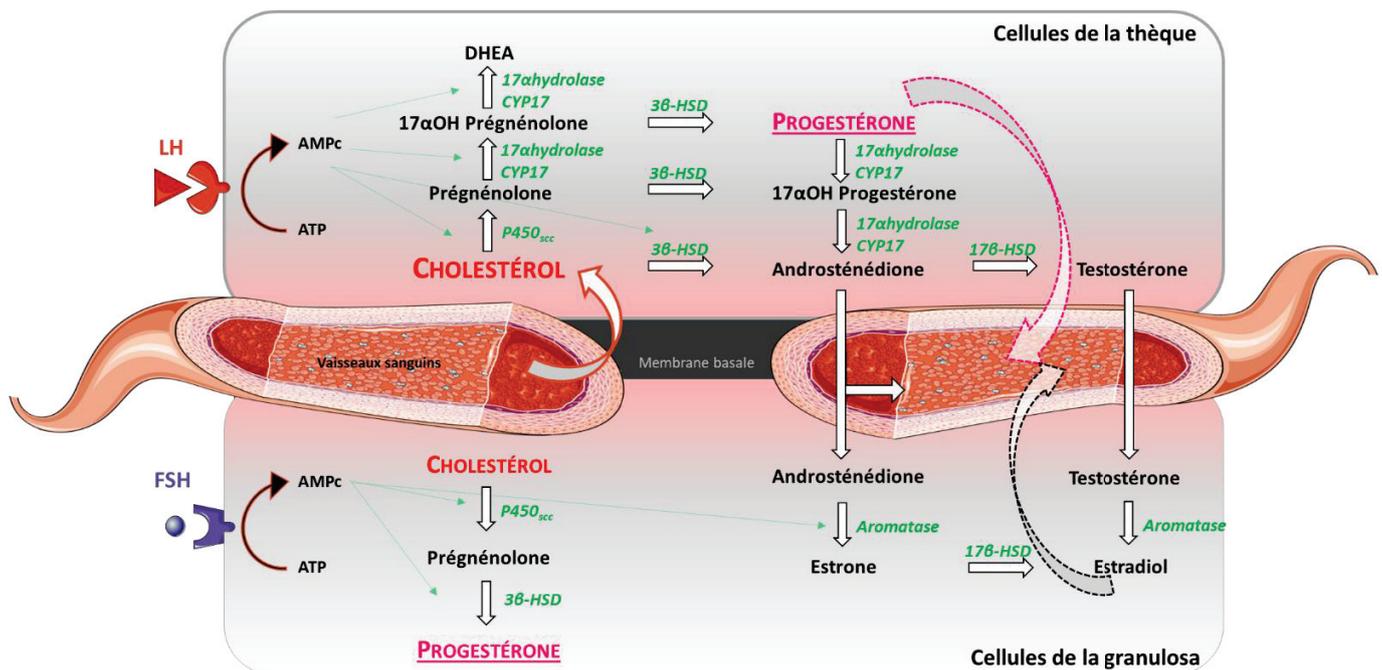
**Figure 31:** La structure d'un follicule ovarien chez la femme.

### 2.2.2. La synthèse des hormones stéroïdiennes

La synthèse d'hormones sexuelles féminines est un processus à plusieurs étapes, dépendantes des cellules des deux couches entourant l'ovocyte. Toutefois, ni les cellules de la granulosa ni celles de la thèque interne ne possèdent toutes les enzymes nécessaires à la production de l'œstrogène et de la progestérone à partir du cholestérol. Il a ainsi été démontré une coopération entre elles pour assurer la synthèse des hormones stéroïdiennes, selon le modèle « *Two-cell-two-gonadotrophin theory* » (Hillier et al., 1994; Liu and Hsueh, 1986; Ryan et al., 1968) (**figure 32**).

Les cellules de la thèque sont régulées par la LH et convertissent le cholestérol sérique en androstenedione et testostérone. L'hormone hypophysaire va notamment induire la synthèse de l'enzyme P-450<sub>scc</sub>, nécessaire à la conversion du cholestérol en hormones sexuelles. En plus d'exprimer les enzymes impliquées dans les premières étapes de cette conversion, les cellules de la thèque sont aussi les plus proches du sang et peuvent ainsi facilement absorber le LDL pour commencer la transformation du cholestérol (**figure 32**). Toutefois, ces cellules ne possèdent pas les enzymes nécessaires à la production d'œstrogènes à partir des androgènes produits. Ces derniers vont donc diffuser dans les cellules de la granulosa. Stimulées par la FSH, elles vont produire les aromatasés nécessaires à la synthèse d'œstrogènes à partir d'androgènes. Les œstrogènes produits sont relâchés dans la circulation sanguine pour exercer leurs effets biologiques.

En somme, la progestérone est synthétisée par les deux types cellulaires du follicule ovarien et est nécessaire à la synthèse de l'œstradiol, produite elle uniquement dans les cellules de la granulosa.



**Figure 32:** La synthèse d'hormones selon la théorie *Two-cell-two-gonadotrophin*.

En haut est schématisé une cellule de la thèque, dépendante majoritairement de la LH. En bas est représenté schématiquement une cellule de la granulosa, dépendante de la FSH. Les enzymes impliquées sont notées en vert, les composés intermédiaires en noir, le produit initial (cholestérol) en rouge et le produit final (progestérone) en rose. *Adapté de Wen et al., 2010.*

### 2.3. Les actions de la progestérone

La progestérone joue un rôle essentiel dans différents tissus, principalement liés à la reproduction chez la femme, régulant le cycle menstruel utérin (et le cycle ovarien), l'implantation embryonnaire suite à la fécondation de l'ovule ou encore, lors de l'accouchement. Cette hormone est également importante lors du développement physiologique de la glande mammaire.

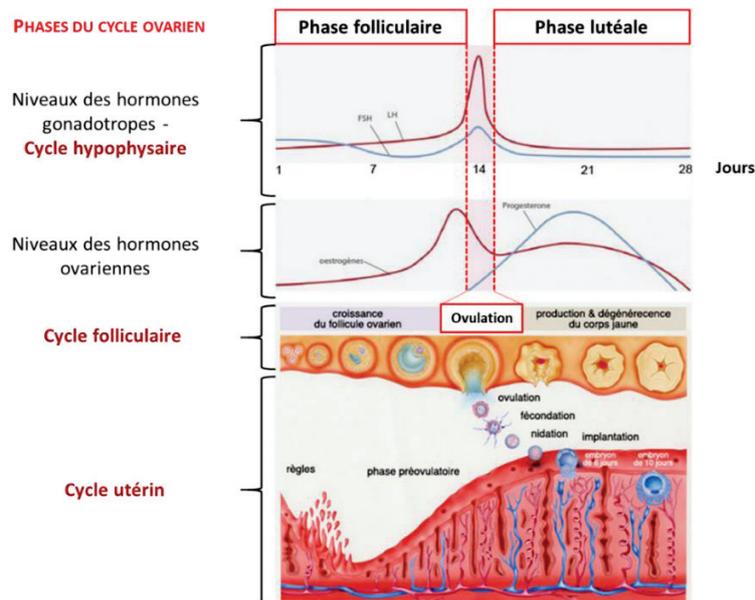
#### 2.3.1. La régulation du cycle ovarien

La puberté marque le début de la fertilité. Chez les femmes, cette période est illustrée par les menstruations, ou règles. Regroupés sous le terme de « cycle menstruel », des changements ont lieu dans l'utérus et dans l'ovaire, sous l'action des hormones hypophysaires et des deux hormones sexuelles, œstrogène et progestérone. La paroi utérine supérieure, appelée endomètre, va subir un renouvellement continu, par succession de périodes de prolifération pour l'épaississement et de périodes de dégradation, correspondant aux saignements vaginaux qui marquent le début du premier jour du cycle ovarien.

Le cycle s'étend sur 28 jours en moyenne et est composé de trois phases principales. La première est appelée phase folliculaire. Elle commence le premier jour des règles (noté J1 sur la **figure 33**). Ce saignement provient de la dégradation de l'endomètre, due à une baisse de la concentration en œstrogène et en progestérone. Cette baisse s'accompagne d'une augmentation progressive de l'hormone FSH qui induit le développement de follicules. Quatre à cinq jours après le début des règles, un ou deux follicules se développent et produisent alors de l'œstrogène. L'hormone permet à la paroi de l'utérus de commencer à s'épaissir pour se préparer à accueillir un embryon après l'ovulation.

L'ovulation est la seconde phase du cycle et commence environ 14 jours après le 1er jour des règles (**figure 33**). Pendant 24-48h, les ovocytes mûrissent et produisent de plus en plus d'œstrogènes. Ce pic hormonal est accompagné d'une augmentation d'hormones hypophysaires, notamment de la LH (Pauerstein et al., 1978). Celle-ci va déclencher l'ovulation, soit l'expulsion de l'ovule mature en dehors du follicule. S'il est fécondé par un spermatozoïde, l'ovule devient un embryon qui migre dans l'utérus. Une fois fixé, il envoie des signaux hormonaux au follicule récemment éclaté qui alors devient une petite usine temporaire de production de progestérone, appelé le corps jaune.

La troisième et dernière phase du cycle est la phase lutéale. Tandis que les niveaux d'hormones hypophysaires diminuent, celui de la progestérone augmente progressivement, l'hormone étant désormais produite par le corps jaune (**figure 33**). En cas d'absence de fécondation, cette structure va dégénérer et induire ainsi une baisse importante de progestérone. Combinée à une diminution d'œstrogène, l'endomètre va entrer dans une nouvelle phase de dégradation, induisant des pertes sanguines et le démarrage d'un nouveau cycle menstruel.



**Figure 33:** Le cycle menstruel chez la femme.

Adapté de <http://smartfiches.fr> (gynecologie-obstetrique)

### 2.3.2. La régulation de l'implantation de l'embryon

Post-ovulation, la progestérone est produite majoritairement par le corps jaune, jusqu'à la neuvième semaine de grossesse. La Gonadotrophine Chorionique humaine (hCG), produite par l'embryon, participe à l'évolution de cette structure et donc au contrôle de la libération de la progestérone. Environ 35% des cas de fausses couches semblent être dus à une déficience en corps jaune (Schneider et al., 1993). À partir de la 12<sup>ème</sup> semaine, le placenta acquiert une autonomie suffisante et se met à produire d'importantes concentrations de progestérone pour continuer à fournir l'environnement utérin approprié au développement du bébé. Il devient alors la source majeure de production de progestérone, jusqu'à son expulsion lors de l'accouchement (Aspillaga et al., 1983).

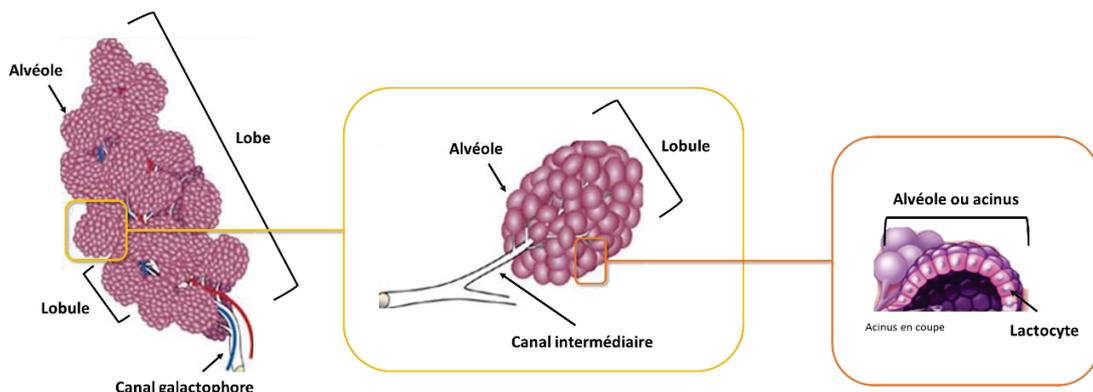
Le développement de modèles murins PR-KO a permis une meilleure compréhension des rôles du récepteur et de son hormone chez la femme (Lydon et al., 1995). Notamment, l'hormone sexuelle permet d'inhiber la dégradation de l'endomètre et donc de fournir un environnement favorable à l'implantation et au développement de l'embryon dans l'utérus de la mère. Elle bloque également l'ovulation et coagule la glaire cervicale, la rendant ainsi imperméable aux spermatozoïdes. De plus, elle complète l'action stimulante des œstrogènes sur le développement de la glande mammaire en favorisant l'accroissement des acini glandulaires et donc la production de lait. Enfin, la progestérone joue un rôle important dans l'apprentissage du système immunitaire maternel à tolérer les antigènes fœtaux.

### 2.3.3. La régulation du développement de la glande mammaire

#### 2.3.3.1. Anatomie de la glande mammaire

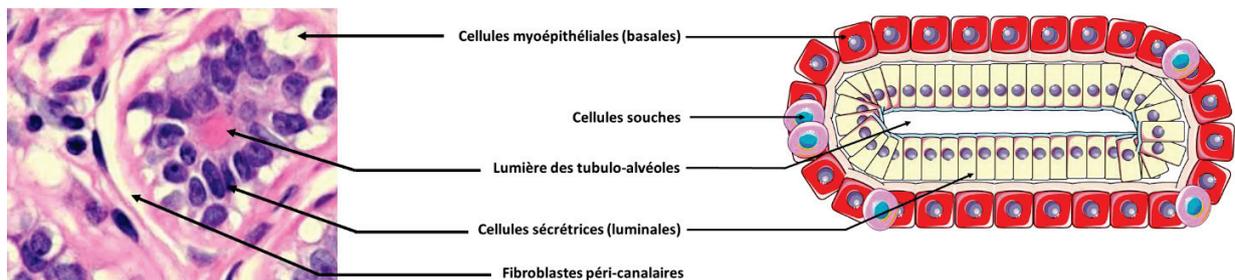
La glande mammaire est une glande alvéolaire exocrine localisée au-dessus du muscle pectoral et s'étalant généralement de la clavicule à l'aisselle, soutenue par les ligaments de Cooper. Chez la femme, son rôle principal est de produire le lait après la grossesse. Bien qu'ils se développent à partir du même tissu embryonnaire, les seins des hommes et des femmes évoluent différemment à la puberté. Alors qu'une forte production d'œstrogènes chez la femme induit la croissance et la maturité de la glande mammaire, un fort taux de testostérone chez l'homme pubère inhibe son développement. (Dürnberger and Kratochwil, 1980).

Lors de la grossesse, la glande se réorganise et se développe pour subvenir aux besoins d'allaitement du nourrisson. C'est par sa structure caractéristique dite « en arbre » qu'elle parvient à produire et à fournir le lait (**figure 34**). Chaque sein possède environ quinze à vingt-cinq lobes mammaires. Chacun est sous-divisé en petites structures, appelées lobules, aux extrémités desquelles se trouvent les sites de production de lait, nommés unités terminales ducto-lobulaires (UTDL) composées de lactocytes (**figure 34**). Le lait est ensuite transporté jusqu'au mamelon par les canaux galactophores afin de pouvoir être délivré au nourrisson. Ce tissu sécrétoire est entouré de tissus sanguin et lymphatique qui se dilatent et se contractent au rythme des stimulations hormonales. Beaucoup moins souple mais très riche en éléments de défense anti-infectieuse, une couche de tissu interstitiel adipo-conjonctif sépare les lobes de la glande mammaire (Zhu and Nelson, 2013).



**Figure 34:** Le réseau alvéolaire de la glande mammaire.

A l'échelle cellulaire, les canaux de la glande mammaire sont composés de fibroblastes, de cellules immunitaires mais surtout de cellules épithéliales (adipocytes ou endothéliales). L'épithélium basal est riche en cellules myoépithéliales, associées à une petite fraction de cellules souches, et génère la couche extérieure de l'épithélium. Les cellules luminales forment les canaux sécréteurs et les alvéoles, où le lait est produit (**figure 35**). Cette structure tubulaire en bicouche permet au sein sa fonction de lactation. Les cellules myoépithéliales basales se contractent en réponse au stimulus mécanique de succion. A lieu alors l'éjection du lait dans les canaux galactophores excréteurs (Macias and Hinck, 2012).



**Figure 35:** Composition cellulaire des alvéoles de la glande mammaire.

*Adapté de Macias et Hinck, 2012.*

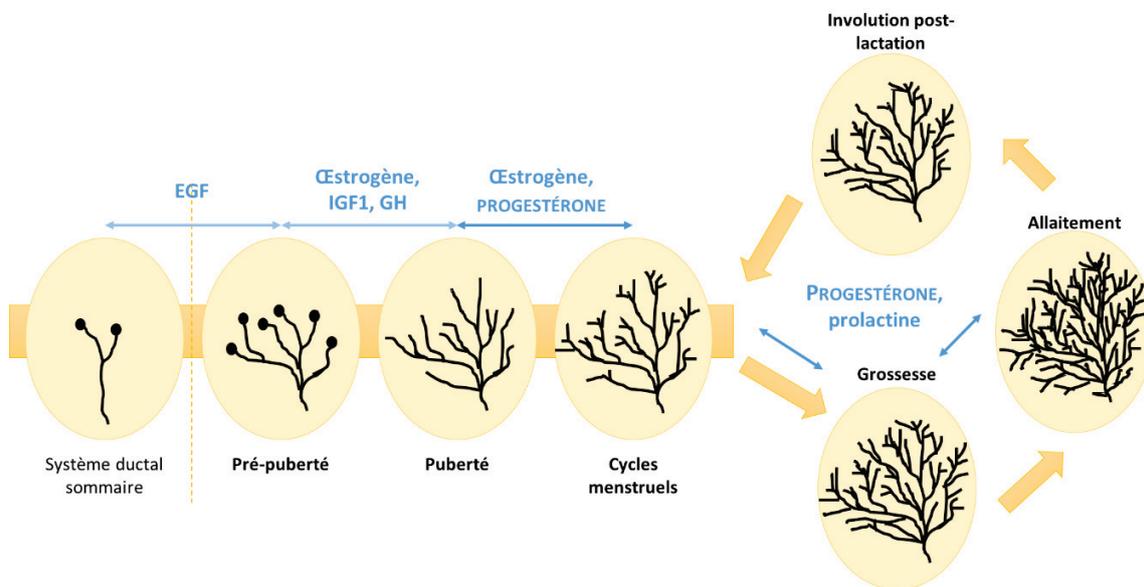
Le développement de la glande mammaire chez la femme est lié à son développement sexuel et à sa reproduction. Ainsi, des étapes « clés » de sa vie sont le siège de profonds changements morphologiques du sein. Son développement débute dans le fœtus, au stade embryonnaire E10, et des évolutions majeures se déroulent à la puberté, ainsi que lors de la grossesse et pendant la période de lactation qui s'en suit. Toutefois, les scientifiques s'accordent à dire que deux phases principales peuvent être isolées lors du développement (Briskin and O'Malley, 2010). La première, qui se produit lors du développement embryonnaire à la puberté, est une phase indépendante des hormones. La seconde est elle, dépendante de la signalisation des hormones de reproduction, par l'œstrogène et la progestérone majoritairement.

#### 2.3.3.2. *Le rôle de la progestérone*

A la naissance, le sein existe sous forme d'un petit et sommaire ensemble de canaux non fonctionnels, qui reste majoritairement quiescent pendant l'enfance. Ce développement devient alors de plus en plus sujet à l'expression d'hormones sexuelles et de facteurs de croissance. A la puberté, la glande mammaire subit d'importants changements (**figure 36**). À cette période, elle se remplit de canaux en formation dite « en arbre », mais le développement de la structure reste néanmoins limité, les alvéoles évoluant encore peu à ce stade.

Cette morphogénèse en arbre s'accompagne d'un important dépôt de lipides, visible par l'augmentation du volume du sein chez les filles pubères (Briskin, 2002).

Au niveau moléculaire, l'œstrogène agit au niveau de l'hypophyse et stimule la production de prolactine par l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cette dernière joue un rôle majeur lors du développement de la glande mammaire, lors de la grossesse et surtout lors de la lactation. Un défaut dans la signalisation de l'œstrogène induit un taux insuffisant de prolactine et ne permet pas à la glande le développement propice à la lactation. De plus, le taux insuffisant de prolactine chez des souris mutantes conduit à la formation d'un corps jaune non fonctionnel. La quantité de progestérone qui est synthétisée à partir de cet organe n'est donc pas suffisante pour maintenir l'endomètre propice à la nidation de l'embryon et mener la grossesse à terme (**figure 36**) (Bocchinfuso et al., 2000). Comme l'œstrogène, la progestérone agit directement sur les cellules souches épithéliales situées à l'extrémité des canaux mammaires et stimule leur prolifération. L'œstrogène et son récepteur ER $\alpha$  sont nécessaires au développement des canaux. PR et la progestérone sont impliqués dans le contrôle de l'endomètre lors de la grossesse ainsi que dans la formation et l'élongation du système alvéolaire nécessaire à la lactation. Ces effets sont médiés par l'intermédiaire d'autres facteurs, dont STAT5A, RANKL ou C/EBP $\beta$  (Briskin and O'Malley, 2010).



**Figure 36:** Le développement de la glande mammaire sous l'influence des hormones.

Avant la puberté, le développement est indépendant des hormones. A la puberté, les hormones stéroïdiennes (œstrogène et progestérone) jouent un rôle essentiel dans son développement, sa réorganisation et son adaptation aux différents événements de la vie sexuelle de la femme (cycles menstruels, grossesse, allaitement, etc.). En bleu sont notées les composés majeurs impliqués à chaque étape (hormones et/ou facteurs de croissance). *Adapté de Macias et Hinck, 2012.*

#### 2.3.4. Les agonistes et antagonistes de PR

De par son rôle crucial dans la reproduction féminine, PR est depuis longtemps une cible thérapeutique. L'augmentation des taux plasmatiques de la progestérone est responsable de l'incapacité d'ovulation pendant la grossesse. Cette propriété inhibitrice de l'hormone lui a valu d'être incorporée dans des traitements de contraception orale (OC, *Oral Contraceptive*), sous forme d'analogues synthétiques. Ils sont regroupés sous le terme répandu de « progestatifs » (progestérone naturelle et analogues synthétiques) (Stanczyk and Henzl, 2001). De même, le terme « anti-progestatif » est utilisé pour désigner des composés qui inhibent les effets de la progestérone, tels que la mifépristone (RU486).

##### 2.3.4.1. *Les agonistes et la contraception orale*

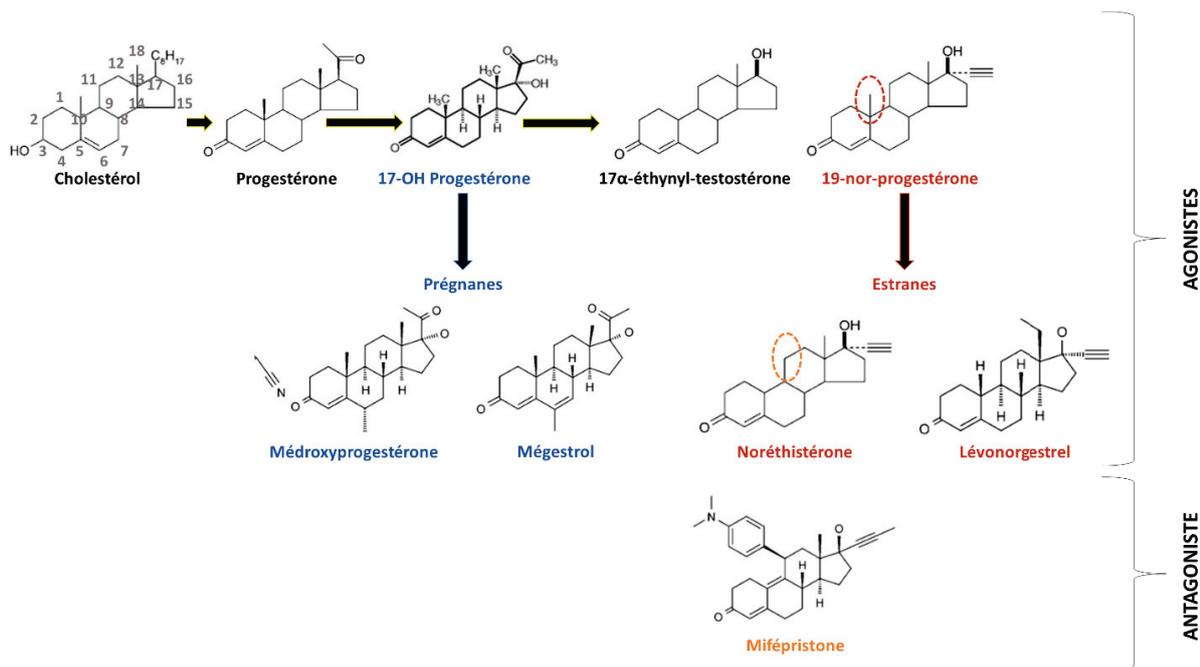
L'établissement d'une contraception avec un progestatif oral actif a nécessité plusieurs années de développement. Fin des années 1930, le 17 $\alpha$ -éthynyl-testostérone est considéré comme l'un des dérivés stéroïdes les plus intéressants mais s'avère être un progestatif faiblement actif lorsqu'il est administré par voie orale. L'amélioration de l'efficacité a consisté en la modulation de la structure du progestatif, notamment par le retrait du groupement méthyle en position C19 (**figure 37**). L'efficacité orale de deux nouveaux composés, dont la noréthistérone, a été testée chez la femme et approuvée comme contraceptif au début des années 1960 (Garcia et al., 1956; Slechta et al., 1954).

Depuis 2000, ces composés ont évolué vers de nouveaux progestatifs, divisés en deux classes (**figure 37**). Ceux structurellement apparentés à la 19-nor-progestérone sont appelés les estranes et regroupent notamment la noréthistérone, le Lévonorgestrel ou encore le désogestrel. Les progestatifs de la seconde classe dérivent de la 17-hydroxyprogestérone (**figure 30**) et sont nommés les prégnanes, dont les plus répandus dans l'utilisation sont la médroxyprogestérone et le mégestrol (**figure 37**) (Madauss et al., 2007). À noter que la plupart de ces progestatifs sont également utilisés dans d'autres cadres que la contraception orale, comme par exemple, pour lutter contre les effets secondaires de la ménopause (bouffées de chaleur, sudation nocturne, etc.) ou dans l'endométriose (Stanczyk and Bhavnani, 2014).

##### 2.3.4.2. *Les antagonistes de PR*

L'un des premiers antagonistes d'un récepteur stéroïdien à avoir été découvert fut le 4-hydroxytamoxifen, pour bloquer le récepteur aux œstrogènes. Après avoir identifié la région pouvant être à l'origine de l'effet antihormonal, d'autres antagonistes ont vu le jour. Concernant PR, la mifépristone (ou RU486) est un dérivé de la noréthistérone, qui se lie à PR avec une affinité cinq fois supérieure à celle de la progestérone.

RU486 a une structure similaire à l'agoniste, à l'exception d'un groupement en position 11 $\beta$ , qui lui confère son action anti-progestative, induisant ou stabilisant une conformation du récepteur biologiquement inactif (Sitruk-Ware and Spitz, 2003) (**figure 37**). La mifépristone est utilisée par exemple dans le cadre d'une interruption volontaire de grossesse (IVG) médicamenteuse. Administrée pendant les premiers stades, elle ramollit le col de l'utérus, entraîne une augmentation de la contractilité du muscle utérin et favorise le décollement de l'embryon, facilitant ainsi son expulsion (Creinin, 2000).

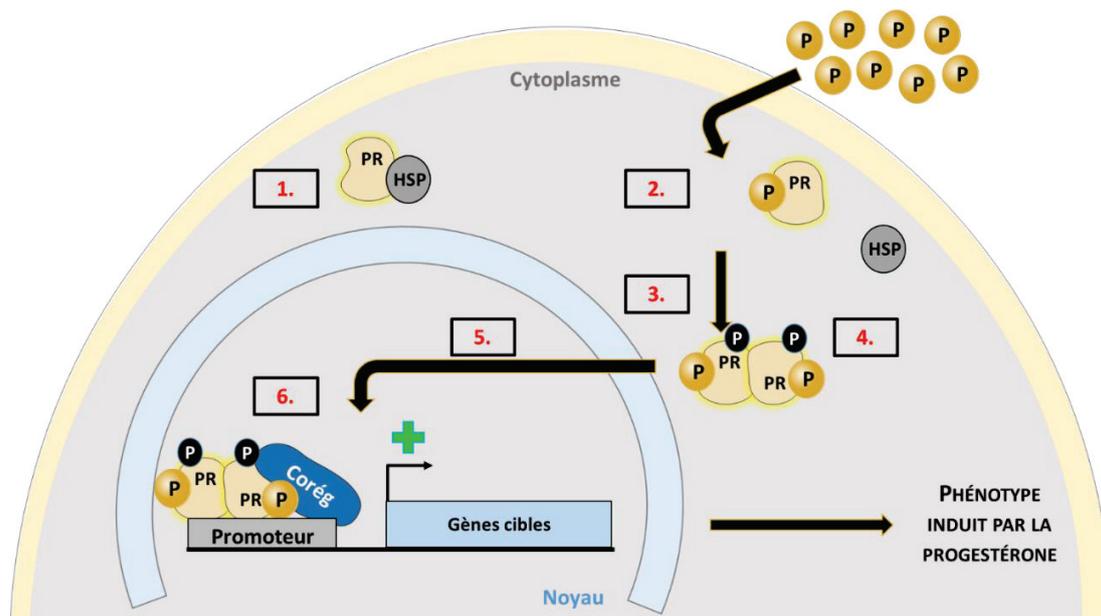


**Figure 37:** Les ligands de PR.

A l'exception du cholestérol, qui n'est que le précurseur stéroïdien, tous les composés représentés ici sont des ligands, naturels (progestérone (pg) et 17-OH pg) ou synthétiques de PR. Les agonistes (activateurs de la signalisation) sont en haut et l'antagoniste majeur (mifépristone, en orange) est en bas. Les prégnanes, dérivés de la 17-hydroxyprogestérone (17-OH Pg) sont indiqués en bleu et les estranes, dérivés de la 19-nor-pg sont indiqués en rouge. Sont entourés les carbones qui subissent des modifications amenant à la synthèse d'autres dérivés progestatifs en aval. *Adapté de Madauss et al., 2007.*

### 3. La signalisation de PR

La signalisation de PR corréle au dogme établi pour la sous-famille des récepteurs nucléaires stéroïdiens (**figure 38**) (cf. page 59) (Mazaira et al., 2018). Toutefois, comme pour chaque récepteur, la signalisation de PR diffère par rapport à celle suggérée comme « classique ». Les études réalisées démontrent une signalisation bien plus complexe que celle expliquée précédemment, et nous allons voir plus en détail certaines des particularités de la signalisation de la progestérone, dans les cellules de cancer du sein.



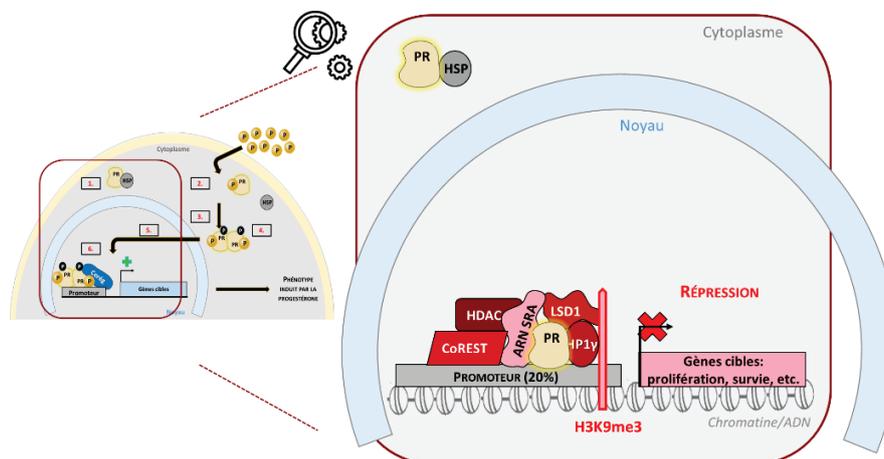
**Figure 38:** La signalisation de PR selon le « dogme » des récepteurs stéroïdiens.

Dans une cellule de cancer du sein, **(1)** PR est associé aux protéines chaperonnes de la famille HSP (**Heat-Shock Protein**) en absence d'hormone. **(2)** L'activation de la cellule par la progestérone est induite par l'entrée du ligand dans le cytoplasme, suivie de sa liaison sur son récepteur monomérique. En résulte **(3)** la dimérisation de PR et **(4)** son activation par modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations (notées P) par des kinases. **(5)** Le dimère activé entre dans le noyau et **(6)** s'associe avec ses partenaires transcriptionnels sur les régions promotrices de ses gènes cibles pour induire leur activation et modifier le phénotype de la cellule.

### 3.1. En absence d'hormone

En absence d'hormone, la majorité de PR est sous forme monomérique, associée à des protéines RAPs (**Receptor-Associated Proteins**). Le premier membre de cette famille à avoir été identifié fut la protéine chaperonne Hsp90 (**Heat-Shock Proteins**) (Picard et al., 1990). Elle régule notamment l'interaction du récepteur à l'ADN, la liaison de son ligand ou encore l'entrée dans le noyau (Haverinen et al., 2001). Toutefois, il a été décrit que 20% des gènes cibles inductibles à la progestérone sont réprimés, en absence d'hormone, par un complexe protéique dans lequel PR interagit avec des partenaires répressifs. L'existence de ce complexe sous-entend qu'une partie des récepteurs non activés, appelés uPR (**unliganded PR**), ne sont pas localisés dans le cytoplasme mais présents dans le noyau, directement sur l'ADN (Vicent et al., 2013). Cette propriété des récepteurs stéroïdiens à être nucléaires avant leur activation par leur ligand a été pour la première fois démontrée pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes (Fondell et al., 1993). Cette capacité de répresseur génique en absence de ligand est principalement due à la capacité du récepteur à interagir avec des corégulateurs qui vont médier l'effet répressif sur les gènes cibles (Hu and Lazar, 2000).

Concernant uPR, le groupe de Beato a réalisé d'élégants travaux sur la mécanistique de ce complexe répressif. Ils ont cherché à identifier les partenaires pouvant intervenir dans l'inhibition génique et la compaction de la chromatine (cf. page 37). HP1 $\gamma$  et LSD1 sont les deux piliers de ce complexe répressif, composé également d'autres répresseurs connus dont HDAC1/2 et CoREST (**Co**repressor for **RE**ST [*RE1* {neuronal repressor element 1}) (Vicent et al., 2013). HP1 $\gamma$  ancre ce complexe à la chromatine par interaction avec la marque de l'hétérochromatine H3K9me3 et favorise ainsi la répression, basale (car indépendante de l'hormone), de gènes cibles de PR codant notamment pour la prolifération et la survie cellulaires. Ainsi, uPR utilise ce complexe répressif, nommé « LSD1.com », pour maintenir l'inhibition d'une partie de ces gènes en absence de progestérone (**figure 39**). Parmi les gènes réprimés par ce complexe, STAT5A, EGFR ou encore BCL-X ont été identifiés (Vicent et al., 2013).



**Figure 39:** uPR agit au sein d'un complexe répressif sur certains de ses gènes cibles.

Sur environ 20% des gènes cibles de PR inductibles à la progestérone, le complexe LSD1.com (LSD1, HP1 $\gamma$ , HDAC1/2, CoREST et l'ARN SRA (**S**teroid **R**eceptor **A**ctivator)) réprime l'activation transcriptionnelle par remodelage local de la chromatine. HP1 $\gamma$  ancre ce complexe en interagissant avec le marqueur de répression H3K9me3.

## 3.2. Après la stimulation hormonale

### 3.2.1. La liaison du ligand au récepteur

Comme pour les autres récepteurs stéroïdiens, le LBD de PR peut adopter trois conformations différentes. La première, appelée apo-forme, désigne celle où le ligand n'est pas présent. La seconde, ou holo-forme, désigne la conformation d'un LBD lié à un ligand. Deux sous-conformations sont ensuite possibles, celle où le ligand est un agoniste (ex : progestérone) et celle où le LBD lie un antagoniste (ex : mifépristone) (cf. page 107).

La liaison de la progestérone sur le LBD suit le modèle classique de liaison de l'hormone au récepteur nucléaire, décrit plus haut (cf. pages 65-66). Brièvement, le LBD de PR adopte une conformation agonistique classique, où la progestérone est présente dans la poche de liaison. Le résidu Met-909 à l'extrémité N-terminale de l'hélice 12 serait important pour la stabilisation de cette hélice (Petit-Topin et al., 2009). L'acide aminé Glu-723 de l'hélice 3 joue un rôle important dans la stabilisation de l'hélice 12 après liaison de la progestérone. Ces deux interactions sont essentielles à la création de la fente hydrophobe pour la liaison de corégulateurs au motif conservé LxxLL, en aval de la fixation de l'agoniste (cf. pages 67-68) (Zheng et al., 2016).

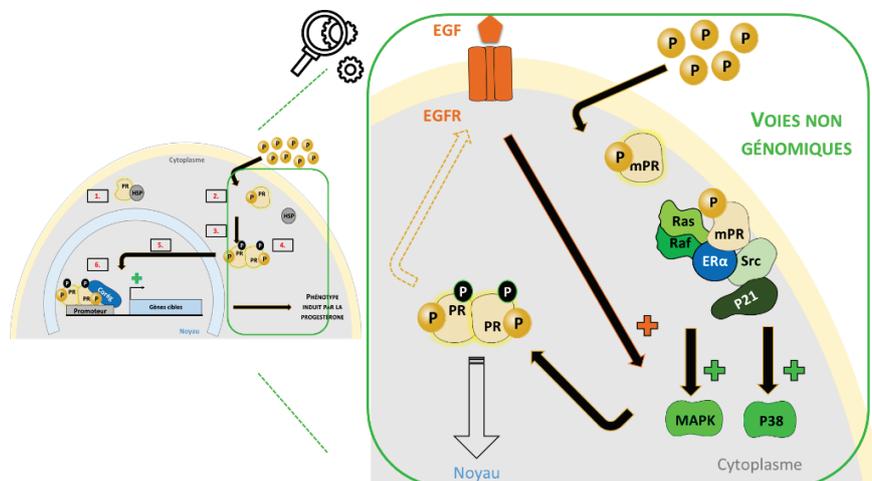
### 3.2.2. La voie non génomique

Un récepteur nucléaire est, par définition, considéré comme un facteur de transcription (Mangelsdorf et al., 1995). Toutefois, tous les effets biologiques induits par les hormones ne sont pas dus à la modulation de l'expression génique. Il a été observé des effets rapides des stéroïdes sur des voies de signalisation cytoplasmiques, ne nécessitant ni modification de gènes, ni synthèse protéique. ER $\alpha$  par exemple, interagit dans le cytoplasme et/ou à la membrane des cellules avec des protéines kinases et des protéines adaptatrices, et la formation de ce complexe conduit à l'activation de nombreuses molécules de signalisation en aval (MAPK, Akt, PKC, etc.) (Björnström and Sjöberg, 2005). La formation de ce complexe, dépendante de la méthylation du récepteur par PRMT1, participe à l'activation de voies codant la prolifération et la survie cellulaires, indépendamment de l'activation transcriptionnelle de gènes cibles d'ER $\alpha$  (Le Romancer et al., 2008). La liaison de la progestérone induit également des effets dits « non-génomiques ». Ils sont médiés par des récepteurs PR membranaires (mPRs) et/ou cytoplasmiques, retrouvés dans les cellules des tissus reproducteurs mais aussi dans les cellules du système immunitaire et dans les cellules cancéreuses (Moussatche and Lyons, 2012).

Par leurs effets cytoplasmiques et/ou membranaires, la progestérone et son récepteur régulent les voies de signalisation majeures, dont celles impliquées dans la prolifération cellulaire. Dans les cellules tumorales de sein stimulées à la progestérone, le récepteur, qui contient un domaine riche en proline dans le domaine NTD, s'associe à diverses molécules cytoplasmiques au domaine -SH3 (Boonyaratanakornkit et al., 2001). Par cette interaction, PR active de manière rapide et transitoire l'axe c-Src/p21ras/MAPK (**figure 40**). Cette activation nécessite également la présence d'ER $\alpha$ , qui interagit avec PR au niveau de son motif de polyprolines du domaine N-terminal (Ballaré et al., 2003).

D'autres composants cytoplasmiques impliqués dans la prolifération et la survie des cellules sont régulés par la voie non-génomique de PR, comme p38 MAPK ou EGFR. Une étude a démontré que la progestérone potentialise les effets induits par l'EGF en entraînant notamment la surexpression de son récepteur (EGFR) ainsi qu'en augmentant la phosphorylation des tyrosines induite par le facteur de croissance. Les cellules de cancer du sein seraient comme sensibilisées par la progestérone, potentialisant ainsi l'effet stimulant d'EGF sur l'activation des voies P42/P44 MAPK et p38 MAPK notamment (Lange et al., 1998) (**figure 40**). Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de ces effets dans des états physiologiques corrélés à la grossesse (maintien de l'endomètre, déclenchement de l'accouchement, effet neuro-protecteur) mais aussi dans les cellules et tissus tumoraux mammaires (Garg et al., 2017).

Outre la régulation de la voie non génomique, l'interaction de PR avec des médiateurs cytoplasmiques au domaine -SH3 représente un mécanisme de régulation de la transcription de gènes, indépendant de l'interaction du récepteur avec l'ADN. En effet, la MAPK activée est capable, par phosphorylation, d'activer des facteurs nucléaires impliqués dans la transcription, et notamment PR lui-même (Treviño et al., 2013) (**figure 40**). Il existe donc un véritable lien entre la voie non-génomique, rapide et transitoire, et la voie nucléaire, nécessitant plus de temps d'activation et aux effets plus durables pour la cellule.



**Figure 40:** Les effets non-génomiques de la progestérone et son récepteur.

Schéma non exhaustif des effets cytoplasmiques, ou non-génomiques, de PR membranaire (mPR) lié à la progestérone (P, en jaune). La formation du complexe PR/protéines à domaine -SH3 conduit à l'activation de voies de signalisation en aval, principalement dépendantes de phosphorylations en cascade. Les kinases activées participent notamment à la phosphorylation de PR (P, en noir) et à son activation transcriptionnelle.

### 3.2.3. La dimérisation du récepteur et la liaison à l'ADN

#### 3.2.3.1. *PR et sa forme monomérique*

L'idée acceptée par la majorité des scientifiques est que le monomère stéroïdien cytoplasmique, une fois lié à l'hormone, s'associe et forme un homo-dimère qui se lie sur ses demi-sites palindromiques avec plus d'affinité qu'en tant que simple monomère (cf. page 61). Toutefois, l'étude de thermodynamique menée par *Connaghan-Jones et al.* a permis de démontrer que la fixation de PR sous forme de dimère sur un palindrome est moins probable et moins récurrente que sous forme de monomère. Ces derniers sont, non seulement capables de se lier aux PREs, mais exhibent des propriétés de liaisons plus souples et plus modulables (en terme de distance et d'orientation sur les demi-sites) que les dimères (*Connaghan-Jones et al.*, 2008). Ainsi, en situation endogène, la forme transcriptionnellement active majoritaire de PR est le monomère. De plus, d'autres SRs fonctionnent *in vivo* comme monomères, dont GR et AR (*Jacobsen et al.*, 2009).

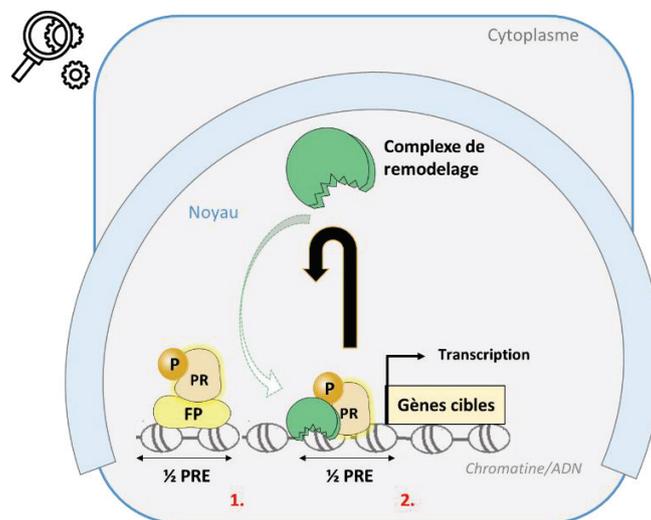
Une analyse *in silico* à large échelle a permis de localiser les PREs consensus et a répertorié environ 565 répétitions inversées « parfaites », les palindromes. L'analyse par CHIP dans les T47D a révélé que seulement quatre de ces sites étaient liés par le récepteur (*Jacobsen et al.*, 2009). L'étude de *Jacobsen et al.* est cohérente avec celle de *Connaghan-Jones et al.*, puisqu'ils démontrent que PR utilise majoritairement un demi-site comme site de fixation sur l'ADN plutôt qu'une séquence palindromique entière (deux demi-sites), sous-entendant que le récepteur se lie préférentiellement sous forme de monomère. De plus, sous cette forme, PR régule la transcription de manière plus efficace que sous sa forme dimérique (*Jacobsen et al.*, 2009). En conclusion, il apparaît que PR agit en tant que facteur de transcription monomérique sur des sites de liaisons qui ne ressemblent pas à des répétitions canoniques inversées, mais plutôt à de simples demi-sites.

#### 3.2.3.2. *La liaison de PR à la chromatine*

Seule une petite fraction des séquences de liaisons semble en réalité être occupée par le récepteur. Cela suggère que la présence d'un PRE est nécessaire mais pas suffisante pour contrôler la transcription dépendante de PR. Une analyse *in silico* a montré que les promoteurs régulés distinctement par PR-A et PR-B ne montrent pas de différence en terme de séquence, confortant l'idée que la clé de la spécificité de leur propre régulation puisse résider dans leur capacité à lier des partenaires différents. Les séquences avoisinantes des PREs ont été analysées et il a été détecté la présence d'une séquence de 234 nucléotides, située à 1-2 kb en amont du TSS de gènes cibles (*Jacobsen et al.*, 2009).

Cette séquence hautement conservée porte des sites de liaison pour une dizaine de facteurs de transcription. Parmi les plus retrouvés, STAT, FOXA1, SP1 et AP-1 sont ceux qui participent activement à la régulation de la liaison de PR et à son activité sur l'ADN (Ballaré et al., 2013) (**figure 41**). Ces facteurs pionniers sont, par définition, capables d'accéder aux sites sur la chromatine compacte, riches en nucléosomes, alors que les facteurs de transcription « classiques » n'en sont pas capables. Ils permettent ainsi l'ouverture de la chromatine en amont de la liaison d'un récepteur stéroïdien sur ses sites spécifiques et l'aide à activer sa transcription (Zaret and Carroll, 2011).

Contrairement à la majorité des autres récepteurs, PR est capable d'agir lui-même en tant que facteur pionnier. Il se lie directement aux nucléosomes et aux régions chromatiniennes compactes (**figure 41**). L'activation de PR par son ligand agoniste R5020 dans les cellules T47D entraîne un déplacement des histones H1 et des dimères H2A /H2B, remodelant ainsi la structure des nucléosomes et facilitant l'accès de ses promoteurs cibles au complexe de transcription (Ballaré et al., 2013). L'idée que les nucléosomes soient essentiels à la liaison de PR sur l'ADN et à la régulation de ses cibles avait préalablement été évoquée et démontrée par des expériences sur le promoteur MMTV, dans lequel les PREs sont rendus accessibles par ajout du ligand et remodelage local de la chromatine (cf. page 56). PR agit donc comme un facteur pionnier sur l'ADN, capable de se lier aux nucléosomes et de les modifier, induisant un remodelage local de la chromatine favorable au recrutement de corégulateurs transcriptionnels.



**Figure 41:** La liaison de PR, activé par son ligand, sur l'ADN.

PR activé par la progestérone se lie majoritairement sous forme de monomère sur l'ADN, au niveau d'un demi-site PRE. Sa liaison peut être dépendante de facteurs pionniers, comme AP-1 ou FOXA1 (1.) ou directe (2.). Dans ce second cas, PR agit comme un facteur pionnier et induit un remodelage local de la chromatine par recrutement de partenaires enzymatiques (en vert), amenant à l'activation ou la répression de la transcription.

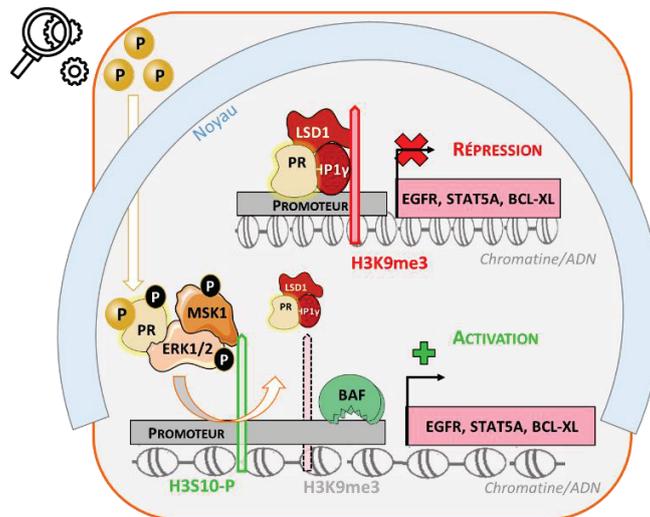
### 3.2.4. La régulation transcriptionnelle des gènes cibles

#### 3.2.4.1. *L'activation génique*

Le groupe de Beato a réalisé de nombreuses études sur les mécanismes de régulation transcriptionnelle dépendante de PR et de la progestérone. Leurs travaux mécanistiques sur le promoteur MMTV dans des cellules T47D-MTVL (qui portent une seule copie intégrée dans le génome du promoteur pilotant le gène de la luciférase) ont permis de mettre en évidence la dynamique d'action de PR et de ses partenaires sur la chromatine. Ils ont notamment démontré un lien entre phosphorylation de l'histone H3, activation des voies génomiques et non-génomiques de PR, et activation transcriptionnelle (Vicent et al., 2006).

La stimulation des cellules tumorales de sein à la progestérone conduit à l'activation rapide et transitoire, dès quelques minutes, des kinases ERK1/ERK2. Ces dernières phosphorylent le récepteur (P-PR) et activent leur cible MSK1 (cf. page 47). Ce complexe tripartite (ERK, P-PR et MSK1) activé se localise sur le promoteur MMTV et cible l'histone H3 (**figure 42**). H3S10-P est une marque d'activation transcriptionnelle sur la chromatine, elle est liée à une seconde marque, H3K9me3 corrélée elle à la répression (cf. page 48) (Fischle et al., 2005). *Vicent et al.* ont démontré que le promoteur est dans un état fermé en absence d'hormone, répression stabilisée par le complexe LSD1.com. La phosphorylation de H3S10 contribue à l'éviction du complexe LSD1-HP1 $\gamma$  de la marque H3K9me3 (**figure 42**) (Vicent et al., 2006). L'utilisation d'un inhibiteur de l'activation de MSK1 bloque le recrutement de P-ERK et P-PR sur le promoteur, mais aussi du complexe de remodelage BAF (homologue de Swi/Snf), du coactivateur P/CAF ou encore de l'ARN Polymérase II.

Ainsi, la phosphorylation de H3S10 est nécessaire pour passer d'un état répressif, où H3 est méthylée et liée à HP1 $\gamma$ , à un état actif, où des facteurs sont recrutés pour remodeler localement la chromatine et permettre la liaison de l'ARN Pol II. Le recrutement de ce complexe et la phosphorylation de l'histone H3 sont associés aux modifications d'autres histones, dont H1 et H2A/H2B, permettant une induction optimale des promoteurs cibles de la progestérone (Beato and Vicent, 2011). Enfin, comme pour la majorité des récepteurs stéroïdiens, le changement de conformation de PR induite par la liaison de son agoniste permet le recrutement de nombreux coactivateurs, dont SRC-1, GRIP1 ou encore p300/BCP (Scarpin et al., 2009).



**Figure 42:** L'activation transcriptionnelle par PR et ses partenaires nucléaires.

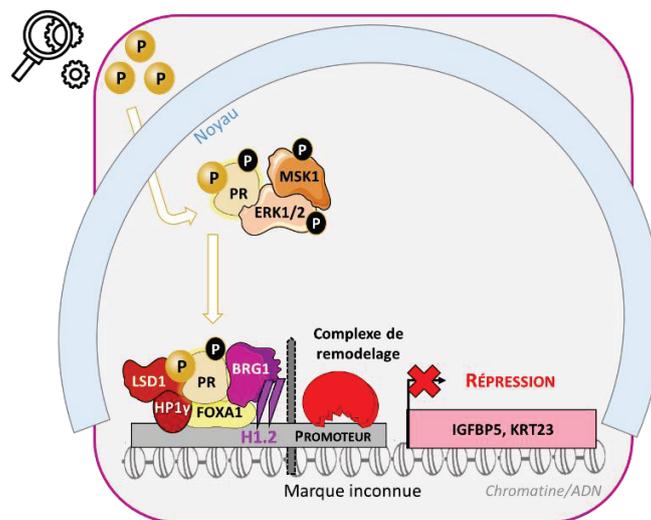
La stimulation hormonale amène à l'activation de kinases (ERK et MSK1) qui, une fois activées par phosphorylation, phosphorylent à leur tour PR. Ce complexe lie la marque H3S10, et MSK1 phosphoryle la sérine (H3S10-P). La fixation de P-PR/P-ERK/P-MSK1 à H3S10-P induit l'éviction du complexe répressif basal LSD1.com. Il s'en suit le recrutement de remodeleurs de la chromatine, son ouverture et la fixation de l'ARN Pol II, menant à l'activation de la transcription.

#### 3.2.4.2. La répression « active » de gènes

Lorsque les cellules sont incubées pendant 6 heures avec le ligand agoniste R5020, des milliers de gènes présentent une liaison accrue de PR sur leur promoteur, phénomène accompagné d'une augmentation importante de la transcription de ces cibles. Cependant, il existe une autre conséquence de la stimulation hormonale, puisque *Nacht et al.* ont identifié 649 gènes pour lesquels l'exposition à la progestérone induit une répression de leur transcription (Nacht et al., 2016a). Encore aujourd'hui, la répression génique reste largement moins étudiée que l'activation et les mécanismes qui la régule sont encore très peu compris, bien que des études aient identifié un rôle répresseur pour PR (Singhal et al., 2017).

L'analyse des 649 gènes réprimés sous hormone a révélé un enrichissement de voies cellulaires importantes pour la cellule (prolifération, adhésion, etc.), confortant l'idée que la répression génique soit un mécanisme de régulation à part entière (Nacht et al., 2016a). Cette étude a permis de mettre en lumière que les acteurs de la répression « active » (dépendante de l'hormone) sont les mêmes que ceux de la répression « basale » (en absence de progestérone), à savoir le complexe LSD1.com. De plus, PR est phosphorylé par les mêmes kinases que lors de l'activation génique (ERK1/2) et P-PR est localisé sur ses sites de liaison dans des régions aux motifs similaires à ceux retrouvés pour les gènes activés (**figure 43**).

L'hypothèse de l'existence d'éléments de réponses spécifiques à la répression s'avère donc fausse. Le recrutement de l'ATPase BRG1, composante de BAF, par le complexe LDS1.com est requis pour induire la répression active dépendante de la progestérone (Nacht et al., 2016a). BRG1 se lie aux variants H1.2, qui se distinguent des autres variants H1 par des acétylations en partie C-terminale, pouvant expliquer la liaison spécifique de BRG1 *via* son bromo-domaine (Nacht et al., 2016b). Le dépôt de cette marque conduit à une compaction locale de la chromatine, réduisant l'accès à la machinerie de transcription, autour des TSS des gènes cibles réprimés, dont IGFBP5 et KRT23 (**figure 43**).



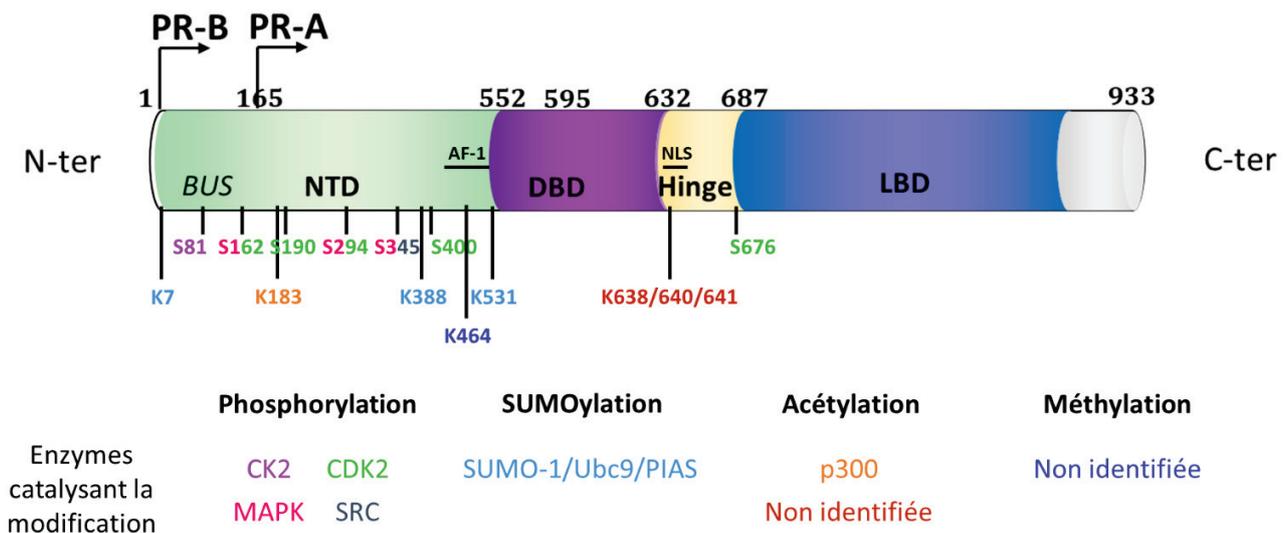
**Figure 43:** La répression transcriptionnelle « active » dépendante de PR.

La stimulation hormonale amène à la phosphorylation de PR, qui se lie à l'ADN *via* FOXA1 principalement. Ce dernier participe au recrutement de l'ATPase BRG1, membre du complexe répressif LDS1.com sous hormone. Le mécanisme d'ancrage de ce complexe sur la chromatine n'a pas encore été compris. BRG1 reconnaît les variants H1.2, nécessaires à la compaction locale de la chromatine, et s'en suit le recrutement d'autres remodeleurs et la répression de la transcription.

Ainsi, PR est capable d'induire l'activation et la répression de ses gènes cibles en utilisant deux modes de régulation relativement proches. PR doit être phosphorylé par les kinases ERK1/2 et former un complexe tripartite avec MSK1-P. Une fois sur l'ADN, P-PR se lie sur ses éléments de réponse et induit le recrutement de partenaires. Dans le cas de l'activation génique, les kinases ERK et MSK1 phosphorylent H3S10 et induisent le recrutement de complexes de remodelage (BAF) pour ouvrir la chromatine (**figure 42**). Dans le cas de la répression active, P-PR est lié à la chromatine principalement par l'intermédiaire du facteur pionnier FOXA1, ce qui permet le recrutement de l'ATPase BRG1, et non du complexe BAF entier, sur les gènes réprimés. Une autre différence avec l'activation est l'implication du complexe LDS1.com, bien que la marque qui l'ancre sur la chromatine ne soit pas encore identifiée (**figure 43**).

#### 4. Les modifications post-traductionnelles

Outre ces différents aspects régulateurs de la signalisation de la progestérone, PR est soumis à des modifications post-traductionnelles qui contrôlent différentes étapes de sa voie. La revue de *Abdel-Hafiz et Horwitz* a répertorié l'ensemble des modifications retrouvées sur le récepteur et les fonctions régulées associées (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014). La très grande majorité d'entre elles sont des phosphorylations de sérines ou thréonines, localisées dans le NTD de la protéine (**figure 44**).



**Figure 44:** Les modifications post-traductionnelles de PR.

Liste non exhaustive des modifications retrouvées sur PR. Chaque couleur correspond à une enzyme. Certains résidus sont modifiés par deux enzymes différentes et d'autres n'ont pas d'enzyme identifiée. K: Lysine ; S: Sérine ; AF-1: Domaine d'activation 1 ; NLS: Signal de localisation nucléaire.

*Adaptée de Abdel-Hafiz et Horwitz, 2014.*

##### 4.1. La phosphorylation de PR

Cette modification est essentielle pour l'activation transcriptionnelle de PR, en contrôlant notamment la localisation subcellulaire du récepteur, sa liaison aux promoteurs ou encore la liaison avec ses corégulateurs. Certains sites sont phosphorylés de manière basale, ou indépendante de l'hormone, comme S81 ou S400 (**figure 44**). La forme PR-S81-P par exemple est associée à l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans le maintien et le renouvellement des cellules souches mammaires (Hagan et al., 2011).

Les sérines 294 et 345 sont elles fortement phosphorylées après stimulation à la progestérone. Ces sites sont les résidus clés de l'activation du récepteur. Ils sont phosphorylés par les kinases de la voie MAPK mais d'autres enzymes, comme c-SRC, ou le complexe cycline A/CDK2 sont capables également de les modifier (**figure 44**). La forme PR-S345-P est retrouvée sur l'ADN associée aux facteurs Sp1, et régule des gènes cibles de PR dont les promoteurs ne possèdent pas de séquences PRE canoniques, dont EGFR ou p21 (Faivre et al., 2008). L'autre marque, la Ser-294 phosphorylée, permet notamment la rapide translocation de PR dans le noyau et sa liaison à l'ADN. De plus, elle joue un rôle essentiel dans le renouvellement du récepteur mature (*turnover*), en tant que signal de dégradation par la voie du protéasome 26S (Lange et al., 2000). Ces deux phosphorylations sont devenues des marqueurs de l'activation transcriptionnelle de PR dans les cellules tumorales du sein.

Enfin, une dernière sérine joue un rôle important dans l'activité de PR, il s'agit de la Ser-676 localisée dans la région *hinge* (**figure 44**). Sa mutation perturbe la transcription mais n'empêche pas la liaison du mutant sur l'ADN, révélant probablement un rôle dans l'interaction de corégulateurs. Bien que localisée à proximité du DBD, son impact sur l'activité nucléaire de PR semble moindre que celui des résidus 294 et 345 (Hagan et al., 2012).

#### 4.2. L'acétylation de PR

L'acétylation de lysines est notamment retrouvée dans la région *hinge* (**figure 44**). Un motif consensus d'acétylation, de type KxKK en position 638-641, est présent dans le récepteur, chevauchant le signal de localisation nucléaire. Dans des cellules T47D, l'acétylation de ces lysines (K638-640-641) contrôle l'activation de la transcription en interférant dans la capacité du récepteur à transiter entre noyau et cytoplasme, fonction nécessaire afin d'assurer correctement son activité de facteur de transcription. La mutation de lysines acétylées conduit à un retard de phosphorylation sur la Ser-294, retardant ainsi l'entrée du récepteur dans le noyau et amenant à une régulation anormale d'un sous-ensemble de gènes cibles (Daniel et al., 2010). La capacité de ce domaine à réguler la transcription chez un récepteur stéroïdien a été largement décrite mais la découverte de sa modification, par acétylation notamment, ouvre de nouvelles pistes intéressantes quant à la modulation des effets géniques induits par l'hormone dans les cellules cancéreuses.

Une autre étude a révélé un second site d'acétylation sur PR, à savoir la Lys-183, qui interférerait également avec la phosphorylation activatrice de la Ser-294, renforçant l'idée d'un lien fonctionnel entre acétylation et régulation transcriptionnelle médiée par PR (Chung et al., 2014a).

### 4.3. La SUMOylation et l'ubiquitination de PR

Ces deux processus possèdent des voies conservées (cf. pages 50-51). La majorité des récepteurs nucléaires sont ubiquitinés et SUMOylés (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014). Le rôle majeur de l'ubiquitination de PR est de favoriser la régulation du récepteur une fois son ligand lié (*turnover*) en médiant la dégradation par le protéasome. Cette modification est induite par la phosphorylation de la Ser-294 (Lange et al., 2000). Cette destruction programmée de PR est, paradoxalement, un mécanisme essentiel à son activité, lui permettant un renouvellement régulé et donc à terme, une activité optimale. La lysine K388 serait ubiquitinée, mais avant tout, SUMOylée. Aucun autre résidu ubiquitiné n'a été identifié sur PR; toutefois, BRCA1, une ubiquitine-ligase (E3), inhibe l'activité transcriptionnelle de PR, et ce de manière dépendante de son activité enzymatique (Calvo and Beato, 2011). Elle intervient dans la stabilité du récepteur et dans sa dégradation mais elle est également recrutée sur les gènes cibles de PR et affecte l'ubiquitination des histones H2A. Par ces deux aspects, BRCA1 et l'ubiquitination sont des régulateurs de l'activité transcriptionnelle de PR.

La SUMOylation reste un régulateur majeur de la transcription médiée par les SRs. PR possède une séquence consensus au niveau de la Lys-388 (**figure 44**). Sa SUMOylation est dépendante de la liaison de l'hormone et joue un rôle inhibiteur sur l'activité transcriptionnelle du récepteur. En effet, la mutation de la lysine en un acide aminé non SUMOylable comme l'arginine, conduit à un *turnover* accéléré du récepteur et à une activité transcriptionnelle accrue. L'enzyme SENP désSUMOyle PR et conduit à une augmentation de son activité nucléaire (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2012). En effet, la phosphorylation de S294 favorise cette désSUMOylation, rendant le récepteur hyperactif. La forme désSUMOylée régule une signature génique unique, retrouvée dans un certain type tumoral mammaire associé à une faible probabilité de survie chez les patientes traitées au tamoxifène (Daniel et al., 2007). L'enzyme E3 n'a pas encore été clairement identifiée. Certaines publications considèrent PIAS3 comme responsable de la SUMOylation de K388 (K7 et K531 également) mais toutes les études ne sont pas concordantes (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2012).

### 4.4. La méthylation de PR

La modification post-traductionnelle la plus récemment identifiée est la mono-méthylation de la lysine 464, localisée dans le NTD de PR, au niveau du domaine de transactivation AF-1 (**figure 44**) (Chung et al., 2014b). La méthyltransférase n'a pas été identifiée. L'étude révèle que la modification est importante pour la structure du récepteur et pour l'activité de la région AF-1.

Plus spécifiquement, K464 participe à la régulation de gènes induits par la progestérone, codant notamment pour des molécules d'adhésion cellulaire. Ces effets peuvent s'expliquer en partie par le fait que le résidu soit impliqué dans l'interaction de PR avec des corépresseurs connus pour interagir avec la région AF-1, comme NCoR1 ou SMRT (Chung et al., 2014b). Néanmoins, d'autres études sur la méthylation de PR s'avèrent cruciales pour espérer comprendre plus en détail le rôle de cette modification sur l'activité du récepteur.

Le récepteur à la progestérone est exprimé dans un grand nombre de tissus chez l'Homme, majoritairement ceux impliqués dans la reproduction féminine (ovaire, utérus, sein), mais aussi dans le cerveau, les os ou encore le pancréas. Cette expression ubiquitaire souligne les effets physiologiques généralisés que peut exercer cette hormone dans le corps humain (pour revue : Scarpin et al., 2009). Lors de mes quatre années de thèse, j'ai étudié la signalisation de la progestérone dans les cellules de sein tumorales (T47D). Je finirai donc cette introduction bibliographique par un court paragraphe sur ce modèle d'étude.

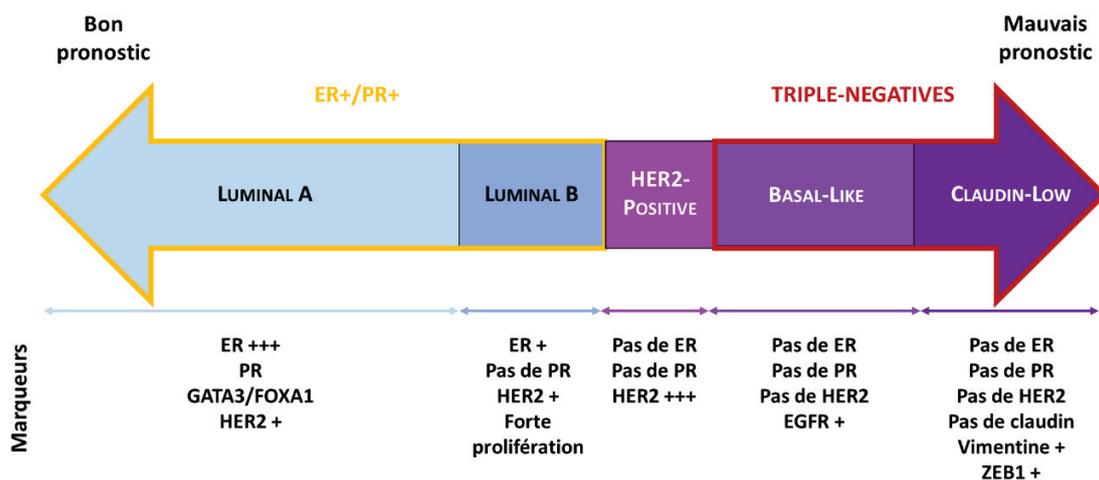
## **Chapitre 5 : Le cancer du sein, modèle d'étude de la signalisation de PR**

### **1. Une maladie hétérogène**

Le cancer du sein est une tumeur maligne qui se développe dans les cellules de la glande mammaire. En réalité, il n'existe pas « un cancer » du sein, mais plusieurs types de ce cancer. Les plus fréquents sont les adénocarcinomes (95%), des tumeurs issues de la cancérisation de l'épithélium glandulaire (canaux et/ou lobules) (cf. page 103). Si les cellules tumorales sont confinées au niveau des canaux et lobules, le cancer est considéré comme un « carcinome *in situ* ». Généralement de très bon pronostic, il est cependant relativement rare (3% des cas). Il peut évoluer vers une forme « infiltrante », lorsque les cellules cancéreuses traversent la membrane basale des canaux/lobules et envahissent les tissus avoisinants (98% des cancers du sein). Les cellules malades peuvent alors se propager facilement dans la circulation lymphatique et sanguine et conduire au développement d'un cancer du sein « métastatique ». Cet envahissement des ganglions et autres tissus (os, foie, cerveau, etc.) peut être à l'origine d'une dissémination générale du cancer et est donc considérée de mauvais pronostic (Platet et al., 2004). Afin de caractériser au mieux la tumeur et ainsi d'obtenir les meilleurs effets de la thérapie (régression tumorale sans effets secondaires néfastes), différentes classifications ont émergé, basées sur l'hétérogénéité de cette maladie, tant au niveau moléculaire que génétique.

Un cancer du sein peut être évalué histologiquement, en fonction de son « stade d'avancé ». Basé sur la classification TNM (**Tumor Node Metastasis**), sont pris en compte la taille de la tumeur (T), l'envahissement ganglionnaire (N) et la présence de métastases à distance (M). Cette classification permet l'évaluation d'un pronostic de la tumeur et amène à un traitement adapté. Une seconde classification histologique, dénommée SBR (**Scarff Bloom and Richardson**), prend en compte l'architecture de la tumeur, les atypies nucléaires et la fréquence des mitoses cellulaires. À chaque paramètre est assigné un score et leur addition amène à la détermination d'un grade de la tumeur (grade I à III). Le grade le plus élevé est attribué aux tumeurs avec le pire pronostic (Pourteimoor et al., 2016).

Enfin, le développement d'outils d'analyses génomiques à large échelle a permis d'établir une sorte de « carte d'identité moléculaire » des cancers du sein. Cinq sous-groupes ont été identifiés, basés sur l'expression de facteurs pronostiques et prédictifs, dont PR et ER $\alpha$  (**figure 45**).



**Figure 45:** La classification moléculaire des cancers du sein.

La taille des cases colorées est dépendante de la proportion du type de cancers: luminal A (environ 40% des tumeurs totales), luminal B (20%), HER2+ (10%), « basal-like » (18%) et « claudin-low » (12%).

*Adapté de Malhotra et al., 2010.*

L'expression des récepteurs ER dans les cellules de cancer du sein corrèle à la mise en place de voies de prolifération et de survie cellulaires. Ainsi, l'hormonothérapie consiste en l'utilisation de molécules permettant de bloquer, soit la fonction du récepteur (par anti-œstrogènes, type tamoxifène) soit sa synthèse (par anti-aromatase), inhibant également la signalisation de PR et de la progestérone. Ces cancers dits « hormono-dépendants » présentent le meilleur pronostic, avec un taux de survie accru par rapport aux autres sous-types.

Le type « luminal B », avec une expression bien moindre des deux récepteurs, est caractérisé majoritairement par une forte prolifération médiée par Ki67 ou EGFR, et se trouve associé à un phénotype plus agressif et donc à un mauvais pronostic. L'absence d'ER et PR empêche l'utilisation de l'hormonothérapie et oblige donc les médecins à réorienter le traitement sur d'autres facteurs. HER2, EGFR ou P53 sont des marqueurs additionnels qui sont ciblés pour lutter contre la prolifération et/ou l'invasion des cellules tumorales. Or, ces voies étant régulées par une multitude de facteurs différents, les thérapies pour les cancers dits « négatifs » sont souvent bien moins efficaces que celles des cancers ER+/PR+ et ces tumeurs sont associées à un mauvais pronostic (Malhotra et al., 2010).

## 2. La progestérone dans le cancer du sein

Le cancer du sein représente un tiers de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez la femme et est la première cause de décès par cancer chez la femme. Le taux d'incidence augmente chaque année, notamment dû à l'amélioration continue du programme de dépistage. Toutefois, la mortalité est en baisse depuis les années 1990 et la survie des patientes s'est améliorée au cours du temps. Ainsi, cette maladie hétérogène semble être de mieux en mieux contrôlée. Ces données sont générales et l'analyse plus précise de chacun des sous-types révèle néanmoins d'importantes disparités sur le taux de mortalité par exemple, bien plus élevé pour les cancers triple-négatifs (source : institut de veille sanitaire, <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-sein>).

Différents facteurs de risques d'apparition du cancer sont connus, comme l'âge de la femme, la prédisposition génétique, l'obésité, l'alcool ou encore le tabagisme. Un autre facteur important est l'exposition aux hormones endogènes, dont la progestérone, au cours de sa vie (âge à la puberté, nombre de grossesses, âge de la première, allaitement, etc.). Ainsi, bien que l'hormone soit utilisée en thérapie, elle est paradoxalement également une cause de tumorigénèse dans le sein.

### **2.1. Un rôle mal connu dans le développement tumoral**

La signalisation de la progestérone a été utilisée pour le traitement de nombreux processus physiologiques chez la femme. Comme vu précédemment, la progestérone joue un rôle important dans le maintien de la grossesse, en bloquant la prolifération du tissu utérin, permettant la quiescence de l'endomètre pour l'implantation de l'embryon (cf. page 100). Ainsi, pendant des années, la propriété antiproliférative des progestatifs a été utilisée en combinaison avec des œstrogènes, dans des contraceptions hormonales chez les femmes post-ménopausées (HRT, *Hormonal Replacement Therapy*).

En plus de pallier l'absence de synthèses stéroïdiennes chez ces femmes, le progestatif agoniste MPA (acétate de médroxyprogestérone) pouvait bloquer l'apparition d'adénocarcinome en contrecarrant les effets prolifératifs de l'œstrogène. Toutefois, l'essai de la *Women's Health Initiative* (WHI) américaine a démontré, 20 ans après le début de ce traitement, des effets nocifs sur le cancer du sein, ainsi que l'apparition de troubles pathologiques dans d'autres organes (cœur, cerveau, poumon, etc.). La thérapie est annulée en 2002. Sachant que les femmes traitées uniquement avec les œstrogènes ne présentaient pas ces conséquences néfastes, il en a été déduit que l'utilisation continue du MPA jouait un rôle critique sur l'augmentation du cancer du sein, notamment le type luminal B (Stanczyk and Bhavnani, 2014). En France, les études de la cohorte E3N (cohorte d'environ 100 000 femmes françaises, de 49 ans en moyenne et adhérentes de la Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale (MGEN)) ont démontré que les femmes ménopausées qui utilisaient de la progestérone naturelle, en association avec l'œstradiol, ne présentaient pas de risque accru de cancer du sein. Plus récemment, une analyse rétrospective de l'utilisation de Lévonorgestrel comme contraceptif, un progestatif agoniste, a révélé une association avec un risque élevé de tumeurs mammaires (Chlebowski et al., 2013). En somme, l'utilisation de la progestérone en tant que traitement (ménopause, contraception) reste compliquée à décrypter, les effets nocifs semblant être corrélés à la nature du progestatif utilisé.

## **2.2. PR, nouveau *leader* de la carcinogénèse mammaire ?**

Cependant, l'expression de PR dans les tumeurs mammaires est associée à un phénotype plus différencié et de bon pronostic, et la progestérone assure elle un rôle protecteur contre la progression tumorale. Dans les cellules T47D, les progestatifs induisent une prolifération transitoire suivie d'un arrêt du cycle cellulaire. Ces observations sont cohérentes avec l'étude menée par *Mohammed et al.* en 2015, révélant un rôle antagoniste de PR sur la prolifération induite par l'œstrogène. Activé par son ligand agoniste (R5020 et progestérone naturelle), PR est capable d'induire le déplacement du complexe transcriptionnel d'ER $\alpha$  de ces sites codant pour la prolifération et la survie, vers des gènes cibles associés préférentiellement à la différenciation et l'apoptose. Les données cliniques montrent d'ailleurs que cette nouvelle signature génique est associée à un bon pronostic dans une cohorte de 1.959 patientes atteintes de cancer du sein et que la progestérone améliore l'activité antiproliférative des thérapies anti-œstrogéniques (Tamoxifène) (Mohammed et al., 2015). Cette étude, publiée dans *Nature* en 2015, souligne que PR n'est pas un simple marqueur de l'activité d'ER $\alpha$  dans les tumeurs mais plutôt un déterminant critique de la signalisation hormonale. Il agit comme un frein prolifératif dans les tumeurs en réorientant la liaison de complexes transcriptionnels sur la chromatine, modifiant ainsi l'expression de gènes cibles d'ER $\alpha$  amenant à un état plus différencié de la tumeur.

Toutefois, le rôle de PR dans la croissance tumorale semble bien plus large. Dans la lignée de l'étude de *Mohammed et al.*, le groupe de Sartorius a investigué par quel(s) mécanisme(s) la croissance dépendante de l'œstrogène dans des PDX ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup> était inhibée par les progestatifs. Étonnamment, leurs données démontrent qu'un traitement prolongé des tumeurs à la progestérone (naturelle ou synthétique) n'altère que très peu le cistrome d'ER $\alpha$  (Finlay-Schultz et al., 2017). En effet, moins de 25% des liaisons d'ER $\alpha$  sur la chromatine sont affectés par la progestérone, soulignant que la redirection du récepteur à l'œstrogène sur de nouvelles cibles géniques n'est certainement pas le seul mécanisme par lequel la progestérone, et PR, régulent la croissance tumorale *in vivo*. Ils concluent leur étude en mettant en lumière la capacité de PR à se lier sur des gènes codant les ARNs de transfert (tRNA), des intermédiaires essentiels dans la traduction du message génétique en protéine. La liaison du récepteur est suivie par l'inhibition de l'expression de ces gènes, de manière dépendante de la progestérone (Finlay-Schultz et al., 2017). Ainsi, PR limite la biodisponibilité des adaptateurs traductionnels nécessaires à la synthèse de protéines et donc, à terme, à la croissance tumorale, par un mécanisme indépendant de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ .

Bien que les deux mécanismes soient relativement distincts, ils sont complémentaires *in vivo*. De plus, les deux études en arrivent aux mêmes résultats physiologiques, à savoir que PR est un acteur central dans la progression des tumeurs mammaires, et qu'une meilleure compréhension de sa signalisation s'avère essentielle pour le développement de nouvelles thérapies.

---

## **RÉSULTATS**

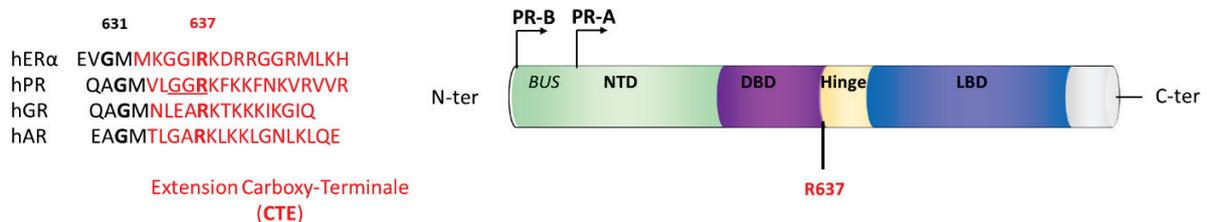
---



## Objectifs de la thèse et introduction au papier

Les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone sont responsables de voies de signalisation essentielles au développement du sein normal et à la prolifération contrôlée de ses cellules. Leurs signalisations sont ciblées par l'hormonothérapie afin de limiter leur activation aberrante dans les cellules cancéreuses. La progestérone et son récepteur occupent une place centrale dans la régulation de l'activité oncogénique des cellules tumorales mammaires, en partie grâce à sa fonction de facteur de transcription, capable de moduler l'expression de gènes (Mohammed et al., 2015). De plus, comme l'ont démontré les études de Beato, PR est un facteur pionnier, présent sur la chromatine au sein de complexes transcriptionnels régulateurs et impliqués dans une multitude de fonctions cellulaires, de par les différentes interactions qu'ils partagent (LSD1, HP1 $\gamma$ , HDAC, BRG1, etc.) (Nacht et al., 2016b; Vicent et al., 2013).

La majorité de ses partenaires sont des enzymes modificatrices de la chromatine qui régulent l'expression de programme génique en fonction des marques déposées sur les histones. Parmi elles, les arginines méthyltransférases constituent une sous-famille d'enzymes impliquées dans un large répertoire de processus physiologiques (réparation d'ADN, métabolisme des ARN messagers, développement, etc.) et sont souvent exprimées de manière anormale dans les cancers. PRMT1, responsable de la majorité de la di-méthylation asymétrique, régule l'activité de ces cibles par méthylation et est souvent surexprimée dans les tumeurs mammaires (Morettin et al., 2015). Grâce à la multitude d'études réalisées, nous savons avec certitude que les modifications post-traductionnelles sont essentielles aux fonctions des récepteurs nucléaires. PRMT1 méthyle ER $\alpha$  sur une arginine conservée parmi les récepteurs stéroïdiens ; elle est retrouvée sur PR, au sein d'un motif consensus reconnu par PRMT1 (GAR), dans sa région *hinge* (**figure 47**) (Hill et al., 2012). Ce domaine, accolé à celui impliqué dans la liaison à l'ADN, est important pour l'activité transcriptionnelle du récepteur.



**Figure 46:** PR porte une arginine conservée dans sa région *hinge*.

Ainsi, sachant que PR régule la prolifération des cellules tumorales du sein, notamment par son activité sur la chromatine, nous avons émis l'hypothèse que la méthylation puisse être un nouveau mode de régulation de la signalisation de la progestérone. L'enzyme PRMT1 s'est imposée comme un candidat idéal. J'ai donc consacré mon travail de thèse à déterminer le rôle de cette protéine sur l'activité de PR. Pour cela, j'ai utilisé le modèle cellulaire T47D, une lignée humaine de cancer du sein ER+/PR+ (type luminal A). C'est un outil expérimental idéal pour étudier les effets de la progestérone car très sensible à la présence de cette hormone (comparé au MCF-7 par exemple) (Yu et al., 2017). Diverses approches de biologie moléculaire et cellulaire m'ont permis d'en apprendre plus sur les relations, physiques et fonctionnelles, entre PR et PRMT1 et de démontrer, *in fine*, une nouvelle modification post-traductionnelle du récepteur, impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules tumorales mammaires.

L'article a été soumis au journal EMBO Reports.

## **PRMT1 and arginine methylation modulate PR action in breast cancer.**

Lucie Malbeteau<sup>1,2</sup>, Coralie Poulard<sup>1,2</sup>, Ivan Mikaelian<sup>1,2</sup>, Frédéric Flamant<sup>1,3</sup>, Muriel Le Romancer<sup>1,2\*</sup>, and Laura Corbo<sup>1,2\*</sup>

1 Université Lyon 1, F-69000, Lyon, France

2 Inserm U1052 CNRS UMR 5286, Cancer Research Center of Lyon, Centre Léon Bérard F-69008 Lyon, France

3 Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, INRA USC 1370, CNRS UMR 5242, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon cedex 07, France.

**\*Correspondence to:**

[laura.corbo@lyon.unicancer.fr](mailto:laura.corbo@lyon.unicancer.fr)

[muriel.leromancer@lyon.unicancer.fr](mailto:muriel.leromancer@lyon.unicancer.fr).

**Disclosure:** The authors have no conflict of interest to disclose.

**Keywords:** progesterone receptor, arginine methylation, PRMT1, progesterone gene regulation, cell proliferation

**Running title:** PRMT1 regulates progesterone signaling

## Abstract

The progesterone receptor (PR) is an inducible transcription factor that plays critical roles in female reproductive processes and in several aspects of breast cancer tumorigenesis and progression, including cell migration and invasiveness. Our report describes the first evidence that the type I protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) is a new co-factor controlling progesterone pathway through the direct methylation of PR protein. Mechanistic assays indicate that PRMT1 participates with PR in the formation of transcriptional complexes, both in the absence of and after hormonal activation. Depleting PRMT1 causes increased PR protein levels, which lead to the deregulation of a subset of PR-target genes and decreased cellular growth and migration rates. Noticeably, PR methylation at arginine 637 is induced by hormonal treatment and affects breast cell growth control, by modifying the stability, the balance between phosphorylation and degradation and, *in fine*, the transcriptional activity of PR. Thus, PR methylation acts as a molecular switch to control PR transcriptional activity, which can have important implications in breast cancer tumorigenesis.

## INTRODUCTION

The progesterone receptor (PR) is a member of the nuclear hormone receptor family of ligand-dependent transcription factors [1]. Acting through its cognate steroid hormone progesterone, PR regulates the expression of gene networks to control development, differentiation and proliferation of female reproductive tissues during the reproductive cycle and pregnancy [2]. Furthermore, numerous studies have established that PR is an important regulator of several aspects of breast cancer tumorigenesis and progression, including cell migration and invasiveness [3,4]. Two major isoforms of PR exist across species, the longer PR-B and the shorter PR-A, which differ in promoter usage [5]. They are differentially expressed and exhibit distinct functions *in vivo* [6]. PR-A is more responsible for progesterone actions in uterus and ovary, while PR-B is required for mammary gland development [6], mediating the proliferative actions of progestins [7,8].

The signaling of PR regulates transcription of target genes through a variety of mechanisms. Upon exposure to progesterone, PR behaves either as a signaling transducer activating multiple cytoplasmic kinase pathways [9] or as a hormone-activated transcription factor, that binds to specific hormone-responsive elements within target gene enhancer or promoter regions [10]. PR activity is also regulated by extensive post-translational modifications that include phosphorylation, acetylation, ubiquitination, SUMOylation and methylation (reviewed in [4,11]). These modifications modulate each step of the receptor activity, by modifying hormone sensitivity, subcellular receptor localization, protein stability or interactions with cofactors. Crosstalk among signaling pathways and post-translational events maintain tight control the diversity and context-dependent transcription of PR. For example, progesterone stimulation induces MAPK-dependent phosphorylation of its receptor on Ser-294, a key modification essential for the enhancement of PR transcriptional activity. This event is also a signal for the ligand-dependent down-regulation, that leads to the degradation of the receptor, a key event in nuclear steroid receptor functions [12,13].

The molecular mechanisms underlying PR-dependent transcription have been extensively studied, both in the absence of, and upon exposure to progesterone [14,15]. Unliganded PR has been reported to target and stabilize a repressive complex that binds to a subset of hormone-inducible genes maintained in a silent state prior to hormone induction [16]. Hormonal stimulation leads to the activation of downstream kinase cascades, including ERK1/2 and finally, to PR phosphorylation [9]. The activated form of PR, associated with kinases, induces the recruitment of histone modifying enzymes. This is followed by a local chromatin remodeling and the assembly of the transcription initiation complex on upregulated genes [14].

Protein arginine methyltransferases (PRMTs) are one such class of histone-modifying enzymes that regulate transcription. Two primary transcriptional coactivators in this family are PRMT1 and CARM1, recruited as coregulators on the promoters of genes targeted by nuclear receptors [17,18]. PRMT1 is the predominant asymmetric arginine methyltransferase in humans and functions as a general transcriptional co-activator, by depositing dimethylarginines on histone 4 (H4R3me2as). However, it also methylates a large variety of non-histone substrates, thus regulating many cellular processes, including RNA processing, transcriptional regulation, signal transduction, DNA repair, and protein-protein interactions, required for tissue homeostasis [19,20]. Aberrant expression of PRMT1 has been reported in several malignancies, including breast cancer, although how PRMT1 contributes to oncogenesis remains largely elusive [21,22].

We herein show that PRMT1 is a new actor of progesterone signaling. Indeed, PRMT1 closely interacts with PR and regulates its function by acting at different crucial steps, through the direct methylation of PR on Arg-637. PRMT1 depletion resulted in increased levels of PR protein, which coincides with the inhibition of a subset of PR-regulated genes and retarded cell growth and migration. In turn, arginine methylation of the receptor activates a transcriptional program that is essential for the proliferation of PR-positive breast cancer cells.

## RESULTS

### PRMT1 associates with progesterone receptor in breast cancer cells

To test whether PR might be regulated by arginine methylation, we initially examined a physical association between PR and PRMT1 *in vitro* and in cells. Using T47D breast cancer cell extracts, we readily immunoprecipitated PR, the A and B isoforms of the human progesterone receptor, using an anti-PRMT1 antibody (Fig. 1A). Each isoform exerting tissue specific effects, PR-B has been described to act specifically in breast [6] mediating the proliferative actions of progestins [7,8], we focused our studies essentially on PR-B (named PR).

We also observed the binding of PR and PRMT1 using an *in vitro* GST-binding assay (Fig. EV1A). As PR is a ligand-regulated nuclear transcription factor, we wondered whether the PR-PRMT1 interaction was hormone-dependent and in which cellular compartment this interaction occurred. For that, we used the *in situ* Proximity Ligation Assay (PLA), enabling the detection, the localization and the quantification of protein interactions with high sensitivity [27]. T47D cells were starved in medium deprived of steroids for 48 h (T0), prior the treatment with the PR agonist R5020 for the times, indicated in Fig 1B. The presence of red dots indicated that interactions between endogenous PR and PRMT1, mainly in the nucleus, varied during the course of progestin induction (Fig. 1B). Quantification of the PLA dots per 100 cells indicated a high number of interactions between the two endogenous proteins in the absence of hormonal induction (Fig. 1B, lower left panel). Notably, 15 min of R5020 treatment engendered a significant reduction in the signal abundancy, reflecting the dissociation of the PR-PRMT1 complex; then a second interaction peak was detected after 1h of treatment (Fig. 1B, lower left panel). A strong decrease in dot numbers was observed when the expression of PRMT1 or PR was knocked-down using specific siRNAs (Fig. EV1D), compared to mock T47D cells transfected with scramble siRNA (siCT) (Fig. EV1B-C), validating the specificity of the PR-PRMT1 interaction, which is nuclear, dynamic and progesterone-regulated.

**PRMT1 influences the outcome of progesterone signaling**

To explore the role of PRMT1 in progesterone signaling, we used a loss-of-function approach in T47D cells. Starved T47D cells were treated with 10 nM of R5020 to activate PR signaling. As largely described [28], we confirmed that this treatment induced the rapid and transient activation of ERK 1 and 2 kinase activities, by phosphorylation of Thr-202 (T202) and Tyr-204 (Y204) respectively. These kinase activations correlated with the phosphorylation of PR on Ser-294 (S294) (Fig. 2A, left panel), described as the transcriptionally “primed” form of the receptor [12,29]. Finally, in breast cancer cells, once activated, the majority of PRs is degraded after 6h of progestin treatment (Fig. 2A, left panel). Of note, PRMT1-knockdown cells displayed an impaired ERK activation following progestin treatment (Fig. 2A, right panel, and 2B) and an increase of the PR protein level at basal conditions, and after hormonal treatment, thus interfering with the ligand-dependent down-regulation characteristic of the nuclear steroid receptors (Fig. 2A, right panel, and 2B). To understand whether the PR stabilization by PRMT1 knockdown was related to the ERK inhibition, we quantified the phosphorylation of PR on S294, direct target of MAPK normalized to the signal of total PR, showing the inhibition of the agonist-induced S294 phosphorylation (Fig. 2B, right panel). Supporting these data, over-expression of PRMT1 resulted in an increased activation of ERK and a decreased amount of PR following progestin treatment (Fig. EV2A). Next, we investigated whether these effects required the methyltransferase activity of PRMT1. The phosphorylation of ERK and PR after progestin treatment were analyzed in T47D cells treated with MS023, a selective inhibitor of type I PRMT-dependent methylation [30]. The effect and the optimal concentration of this inhibitor in our hands were validated on H4R3 dimethylation, the main target of PRMT1, by immunofluorescence and Western blot assays, and the concentration of 60 nM was selected for our experiments (Fig. EV2B). Figure 2B shows that ERK activation and PR phosphorylation on S294 were strongly decreased by the MS023 treatment, whereas increased level of PR protein was observed, similarly to PRMT1 knockdown (Fig. 2A). Interestingly, the

increase of the receptor was not associated with an increased synthesis of its mRNA (Fig. 2C). Treatment of the protein synthesis inhibitor, cycloheximide, showed that PRMT1 depletion increased the half-life of endogenous PR after 6h of treatment (Fig. 2D). We also treated the cells with the proteasome inhibitor MG132, finding that the treatment significantly increased the levels of PR after 6h of progestin treatment, both in control and in PRMT1 depleted cells (Fig. 2E). These data indicate that PRMT1 participates to the regulation of the progestin-dependent degradation of PR controlled by the proteasome system.

Collectively, these results suggest that PRMT1 and its enzymatic activity are required for the turnover of PR, in response to progesterone treatment. The effects of PRMT1 knockdown are reminiscent of the phenomena reporting that, inhibitors of MAPK or of the 26S proteasome, blocked PR turnover, leading to a decrease of its transcriptional activity [12].

### **PRMT1 physically associates with the repressive HP1-LSD1-complex prior to hormone treatment.**

The above results indicate that depletion of PRMT1 and inhibition of its catalytic activity are sufficient to perturb some of the major biological functions of PR, namely MAPK and PR activation by progestins, ultimately resulting in nucleosome remodelling and target gene induction [10]. Moreover, PRMT1 has previously been reported to be a coactivator of several nuclear receptors [17,31]. We confirmed that PRMT1 enhances reporter gene activity of PR in a luciferase-based transcription assay, and we showed that the enzymatic function is required for this effect (Fig. EV3A). Given that PRMT1 associates with progesterone receptor in the nucleus of breast cancer cells, mainly in the absence of hormonal induction, and after 1h of progestin treatment (Fig. 1B), we wondered whether PRMT1 could directly contribute to the PR-mediated transcriptional regulation at these crucial steps.

It has previously been shown that, prior to hormone treatment, unliganded PR (uPR) binds genomic sites and targets the LSD1/HP1 $\gamma$  repressive complex to a subclass of hormone-inducible genes, maintaining gene silencing prior to hormone activation [16]. Thus, we first assessed whether PR-PRMT1 interaction exists within this repressive complex. Immunoprecipitation (IP) with an antibody against HP1 $\gamma$  showed its association with PR and PRMT1 in starved T47D cell extracts (Fig. 3A). Reciprocally, IP with an antibody against PRMT1 showed an interaction with both LSD1 and HP1 $\gamma$  (Fig. 3B). Finally, using an anti-PR antibody, we once again observed interactions between PR, PRMT1 and HP1 $\gamma$  (Fig. 3C). Mock immunoprecipitation experiments using anti-IgG confirmed the specificity of these interactions (Fig. 3A-C). To further visualize these interactions *in cellulo*, PLA assays were carried out on untreated T47D cells. These experiments clearly indicated that PRMT1 specifically interacts with both HP1 $\gamma$  and LSD1, in the nucleus of T47D cells (Fig. 3D and 3E, respectively, and EV3B). Interestingly, PRMT1 depletion by siRNA impacted PR-HP1 $\gamma$  interaction (Fig. 3G and EV3B). Since this PR-HP1 $\gamma$  association is essential for the anchorage of the complex on promoters of repressed target genes, a role for PRMT1 in the interaction between the complex and the chromatin is plausible. Consistent with this, PRMT1 also interacted with the H3K9me3 histone, which is a mark of inactive chromatin [32] and is essential to anchor the complex on the repressed promoters (Fig. 3F and EV3B). To evaluate the role of PRMT1 in the basal repression of progestin responsive genes, we performed chromatin immunoprecipitation experiments followed by qPCR analysis (ChIP-qPCR) on two endogenous promoters described to be repressed by uPR, namely STAT5A and EGFR [16]. We observed that, in absence of hormone, not only uPR and LSD1, described by *Vincent et al.* [16], but also PRMT1, were found within these endogenous progesterone-responsive promoters (Fig. 3H and Fig. EV3C-D). Overall, these results indicate that PRMT1 interacts with PR within the LSD1/HP1 $\gamma$  repressive complex in the absence of hormonal treatment.

**PRMT1 is recruited at PR target genes in response to R5020 in breast cancer cells**

In the context of gene activation, previous studies indicated that this repressive complex is displaced by hormone treatment and the ligand-bound activated PR is recruited to target promoters [16]. We performed ChIP experiments in cells incubated for 1h with R5020 and we showed that PRMT1 and PR, as well as the activation mark H3K4me3, were present on the same gene promoters analyzed above (Fig. 4A-B and Fig. EV3E). On the other hand, binding of PRMT1 was also detected on the FKBP5 promoter, a PR target gene described to be independent from LSD1/HP1 $\gamma$  repressive complex, suggesting a more wide-ranging function of PRMT1 on PR transcription (Fig. 4A). Intriguingly, under conditions of PRMT1 depletion, induced expression of these PR-target genes was differentially affected: EGFR gene expression was diminished, STAT5 mRNA level was increased, whereas FKBP5 expression was not significantly changed (Fig. 4C). As such, the impact of PRMT1 on the PR-dependent transcription appears to be gene-specific.

**Identification of the progestin-activated genes whose expression depends on PRMT1 in breast cancer cells**

To address the relevance and the functional significance of the above results, we decided to identify the progestin-activated genes whose expression depends on PRMT1. RNA-seq analyses in PRMT1-depleted T47D cells by siRNA (or transfected with siCT), with or without R5020 treatment (10 nM for 6h) was performed. The efficacy of hormonal treatment and PRMT1 knockdown were confirmed by Western blot and qRT-PCR (Fig. EV4A-C). RNA-sequencing results indicated that, among the 795 genes activated after 6h of R5020 treatment (Fig. 5A right panel – pink color), 235 genes were impacted by siPRMT1 (about 30% of the total R5020-regulated genes) (Fig. 5A – red color). Among those, 64% of genes were down regulated when PRMT1 was knocked down, indicating that their R5020-induced activation required PRMT1 (PRMT1-dependent genes), 36% were further up-regulated (PRMT1-repressed genes) (Fig. 5B). qPCR analysis of genes randomly selected from the list of PRMT1-dependent genes confirmed

that PRMT1 is required for their R5020-induced transcription (Fig. EV4D). The list of the 235 differentially regulated genes obtained by RNA-seq is given in the Supplemental material section.

### **PRMT1 regulates the growth and the migration of PR-positive breast cancer cells**

A pathway analysis of the 235 genes regulated by R5020 and PRMT1 revealed an enrichment of genes involved in cell movement, morphology and proliferation, indicating a role for PRMT1 in progesterone-stimulated proliferation and migration (Fig. EV4E). The proliferation of T47D cells, stimulated with estrogen (E2) or R5020, was analyzed using the Incucyte technology. Figure EV4F shows that E2 and, to a lesser extent R5020, activated T47D cell proliferation. Nevertheless, R5020 antagonized the proliferative effect of E2, as described [33]. Of interest, depletion of PRMT1 or treatment of cells with MS023, reduced the proliferation of T47D cells when treated with progestin (Fig. 5C and EV4G). Similarly, scratch wound healing experiment assessed that depletion of PRMT1 induced a significant decrease in cellular migration in response to progesterone over the period of 24h (Fig. 5D and S4H). Notably, among the 235 genes activated by R5020 and PRMT1, we analyzed EGFR, EGR1, SGK1 and CD44, which are functionally connected and described for their roles in the regulation of mammary epithelium differentiation under normal physiology, and in cell migration and invasion during breast cancer progression [34,35]. qRT-PCR and Western blot analysis confirmed that depletion of PRMT1 significantly reduced the R5020-induced expression of these key targets (Fig. 5E-F and S4A-B). The expression of NDRG1, a target of SGK1 [36], was also reduced when PRMT1 was depleted (Fig. 5E). To gain further insight, we also analyzed PDK1 and p38 MAPK activations, two enzymes involved in the phosphorylation and activation of SGK1, leading to the activation of downstream targets, such as NDRG1 [37,38] (Fig. 5G and S4I). Again, PRMT1 knockdown inhibited the phosphorylation of these two kinases. Collectively, these results suggest that PRMT1, through transcriptional regulation of some downstream PR target genes, including for instance EGFR and EGR1, can promote cell proliferation and migration in hormonally responsive breast cancer.

**PRMT1 methylates PR-B at a conserved site *in vitro* and in cells**

In the light of the above results, we asked whether the ability of PRMT1 to regulate PR pathway in breast cancer cells depends on its function as transcriptional coregulator, or on the methylation of relevant actors of PR signaling, or both. Because PR is subject to extensive post-translational modifications (PTMs) [11] and because we have shown that PRMT1 regulates PR signaling in a methyl transferase-dependent way (Fig. 2), we firstly analyzed whether PRMT1 directly methylated the receptor, using two complementary approaches. Firstly, extracts from T47D cells starved or treated by R5020 for the times indicated in figure 6A, were immunoprecipitated using PR antibody and then probed with a commercial antibody against asymmetric dimethyl-arginine (adme-R, note pan-methyl-R), the type of methylation marks that PRMT1 deposits (Fig. 6A). Notably, the pan-methyl-R antibody detected a discrete band corresponding to the PR-B isoform. The putative existence of asymmetrically dimethylated form of PR was also analyzed on exogenous PR expressed in T47D cells by transfection with a plasmid expressing a V5-tagged PR-B, and stimulated or not with R5020 for 1h. Extracts from transfected cells were immunoprecipitated using the pan-methyl-R antibody and then probed with an anti-PR. We confirmed that the receptor is methylated in cells, mostly following hormonal treatment (Fig. 6B). Collectively, these data identify PR as a potential substrate of PRMT1 in T47D cells.

In order to identify the PRMT1-dependent methylation site(s) of PR, we performed *in vitro* methylation assays using purified GST-tagged PR fragments, incubated with either recombinant GST-PRMT1 or recombinant CARM1, used as a control (Fig. 6C). In this condition, CARM1 failed to methylate PR-B fragments, although CARM1 auto-methylation could be detected (Fig. EV5A). Among the various functional domains of PR, PRMT1 specifically methylated only the fragments 3 and 4, spanning in the DBD and hinge region, suggesting that arginine methylation by PRMT1 mainly occurs in the 587-687 amino acids region (Fig. 6C and 6D, left panel). Of great interest, this region encompasses the C-terminal extension (CTE) region, previously described as

a dynamic region involved in DNA binding, nuclear localization, interaction with co-regulatory proteins and dimerization of the receptor [39]. This region is also a site for PTMs [40], including the PRMT1-dependent methylation of ER $\alpha$  [26]. Sequence alignment of steroid receptor CTEs shows a conserved position for the R637 residue, within a GGR motif similar to the target motif of PRMT1 methylation (Fig. 6E). To assess whether the GGR motif was a direct target for the enzyme, we mutated the arginine 637 to alanine residue into the GST-PR3 fragment, leading to a complete loss of the methylation signal *in vitro* (Fig. 6F, left panel).

Further analyses were conducted in the context of full-length PR in T47D cells. For *in cellulo* studies, the Arg-637 was substituted to lysine, in order to preserve its positive charge. The WT and mutated versions (R637K) of V5-tagged PR were expressed T47D cells and immunoprecipitations with the pan-methyl-R antibody were performed in these cell extracts following R5020 stimulation. Anti-V5 Western blot on the eluates confirmed that methylation of PR was induced by hormonal stimulation in cells, and that the R637K mutation strongly impaired PR methylation (Fig. 6G). Similar results were obtained using the R637A mutant (Fig. EV5B). To explore the role of PR-R637 methylation in PR functions, we generated an antibody recognizing the asymmetric dimethylation of PR on R637 (named anti-met-R637-PR, see Fig. 7A) and we tested its functionality and specificity using several approaches *in vitro* and *in cellulo*. Dot blot assays revealed that the anti-met-R637-PR antibody specifically detected the asymmetric dimethylated R637 peptide, but not the corresponding non-modified one (Fig. 7B). Moreover, the antibody recognized the wild-type PR3 fragment, but not the R637A mutant, both methylated *in vitro* by PRMT1 (Fig. 7C). However, we were unable to detect endogenous methylated R637-PR form in T47D cells by Western blot analysis, possibly because of the low amount of PR R637me<sub>2</sub>(as) or the low affinity of our antibody for the substrate. To bypass this problem, V5-tagged wild-type or -mutated forms of PR were overexpressed in Cos7 cells, immunoprecipitated with the anti-met-R637-PR antibody and then probed with the anti-PR antibody. Figure 7D clearly

shows a decrease in the methylation of extracts from cells transfected with the non-methylable PR mutant, compared to the wild-type form of PR, confirming R637 as a major site of arginine methylation on PR. Additionally, we used this antibody to explore the subcellular localization of methylated PR at the endogenous level. Immunofluorescence experiments confirmed that the methylation of endogenous PR occurred in the nucleus upon hormonal treatment in T47D cells (Fig. 7E). Importantly, knockdown of PRMT1 strongly reduced the extent of PR methylation (Fig.7E). Taken together, these data indicate that PR is specifically methylated by PRMT1 on arginine 637 after R5020 induction in breast cancer cells.

### **Inhibiting PR methylation decreases breast cancer cell proliferation and impacts PR turnover**

To investigate the function of PR methylation in breast cancer cells, we used the CRISPR/Cas9 technology to knock out endogenous PR. Genomic DNA sequencing of representative PR KO clones of T47D cells (T47D<sub>KO</sub>) revealed non-homologous end joining-induced random insertions or deletions at the targeted sites. Protein expression of several clones was measured by Western blot and revealed that the expression of PR is undetectable in KO clones (Fig. EV6A). We chose the clone #2 (underlined in Fig. EV6A) to stably re-express the wild-type and mutated (R637K) forms of PR-B in the T47D<sub>KO</sub> cells, and we named T47D<sub>WT</sub> and T47D<sub>R637K</sub> respectively, these derived cell lines. The cellular localization and expected levels of wild type and R637K proteins were analyzed by IF using the anti-PR antibody (Fig. 8A). We showed that, in both T47D<sub>WT</sub> control the PR-R637K cells, the receptor was located in the nucleus of untreated cells and upon 1h of R5020 treatment (Fig. 8A). As with PRMT1 inhibition, loss of methylation of PR at R637 resulted in a higher basal protein level, which appeared stable after 6h of R5020 stimulation (Fig. 8A-C). Treatment of the protein synthesis inhibitor cycloheximide showed that, after 6h of R5020 stimulation, more than 90% of PR-R637K was still present, compared to less than 50% in control

conditions (Fig. 8D). Thus, PRMT1-mediated methylation seems to participate to the regulation of PR turnover, required for active hormonal-dependent transcription [41].

Finally, we analyzed the impact of R637K mutation on the progesterone signaling. Treatment of T47D<sub>WT</sub> and T47D<sub>R637K</sub> cells with R5020 induced rapid and transient activation of ERK kinases (Fig. 8C). However, the R637K mutation seems to affect ERK activation, as observed after PRMT1 depletion, but to a lesser extent (see Fig. 2). Importantly, the expression of some PRMT1-dependent PR-downstream targets analyzed in figure 5, as EGFR and EGR1, appeared lower in T47D<sub>R637K</sub> cells compared to T47D<sub>WT</sub> cells, after 3h of progestin induction (Fig. 8F). In line with these results, we tested whether PR methylation-defective cells displayed dysregulated cell proliferation, as observed after PRMT1 depletion (Fig. 5C). Notably, absence of PR methylation at R637 markedly decreased oncogenic PR functions, leading to reduced cell growth of T47D<sub>R637K</sub> cells compared to T47D<sub>wt</sub> cells, when treated with R5020 (Fig. 8E and Fig. EV6B). Interestingly, the loss of R637 methylation effects observed under progesterone treatment are similar to the results obtained with PRMT1 knockdown cells, strongly suggesting that the effects of PRMT1 on the progesterone pathway occur, at least in part, through the methylation of PR.

Considering these findings, we conclude that PRMT1-mediated arginine methylation may add an additional dimension to the signal transduction cascades that regulate progesterone signaling. On the basis of our results, we propose a model in Fig. 8G, to illustrate how PRMT1 could regulate PR signaling at different crucial steps: a) in resting unstimulated cells, by controlling the silencing of a subset of genes prior to hormone activation and b-c) in hormone-activated cells, by the direct methylation of PR, leading to increased transcription *via* the activation of PR degradation.

## Discussion

In this report, we have defined a novel role for PRMT1, regulating progesterone signaling at distinct crucial steps (Fig. 8G). We show that, in the arrested cells, PRMT1 forms a complex with the uncharged receptor uPR in the nucleus of the T47D cells (Fig. 1B), within the repressive complex LSD1/HP1 $\gamma$ , and is also recruited to the promoters of a subset of genes maintained in a silent state prior to hormone activation [16]. PRMT1 appears to contribute to the anchoring of the repressive complex, as it strongly associates with the mark of inactive chromatin H3K9me3 (Fig. 3F). Consistently, the depletion of PRMT1 by siRNA affects the interaction of uPR with HP1 $\gamma$ , essential in anchoring the complex on target genes. Intriguingly, although we do not detect methylated forms of PR without hormone, our results show that PRMT1 depletion as well as the mutation of the Arginine 637 (PR<sub>R637K</sub>), strongly affect the stability of the receptor in absence of hormone (see Fig. 2 and Fig. 8). BRCA1 has been described as the possible E3 ubiquitine-ligase responsible for the degradation of PR in absence of hormone [42]. Considering the key role of BRCA1 in breast cancer [43], it can be stimulating to speculate about a possible functional link between BRCA1 and PRMT1 in the regulation of progesterone signaling in breast cancer.

The progestin treatment induces the dissociation of the PR-PRMT1 complex, which is reconstituted after 1h of treatment in the nucleus of T47D cells, where PRMT1 is recruited on the promoters of several PR-target genes. These results imply that, in breast cancer, PRMT1 acts as a coregulator of PR. Furthermore, we also describe the first evidence that, after 1h of progestin treatment, PRMT1 directly methylates PR, primarily at the conserved arginine residue Arg-637 on a RGG methylation consensus motif, *in vitro* and *in vivo* (Fig. 6, 7 and 8B). This methylated form of PR is nuclear and precludes the degradation of the receptor, which in turn slow down its transcriptional properties.

In response to ligand binding, MAPK activation modulates PR activity by phosphorylating the receptor on serine residues Ser-294 [12,13]. This modification is crucial for the transcriptional activity of PR, priming the receptor for robust transcriptional activation, also influencing its promoter selectivity [44]. Previous studies have demonstrated the critical role of PR degradation/re-synthesis in the active transcription of the receptor [45]. Indeed, PR degradation constitutes a stimulatory switch that accelerates the recycling of receptors from pre-initiation complexes, required for active hormonal-dependent transcription [41]. Our results show that this mechanism involves the asymmetric dimethylation of PR by PRMT1, which reduces PR stability, thereby accelerating its transcriptional activity. It is tempting to speculate that the effects of PRMT1 on PR stability can be mediated by the crosstalk with PR ubiquitination. Indeed, our laboratory has previously showed that PRMT1 physically interacts with the CCR4-NOT complex *via* the CAFv2 (CNOT7 v2) subunit, regulating the methyltransferase activity of PRMT1 [23,46]. Furthermore, CNOT4, a subunit of the CCR4-NOT complex, has been shown to be an E3 ligase [47] and recent data have shown that a RNA binding protein, RBM15, is methylated by PRMT1, which triggers its ubiquitination and degradation by the E3 ligase CNOT4 [48]. In future studies, it will be interesting to investigate whether PRMT1-dependent methylation of PR induces its degradation through the recruitment of the E3 ligase CNOT4.

Our study highlights the direct and functional crosstalk between PRMT1, arginine methylation and progesterone signaling, uncovering the molecular mechanisms by which PRMT1 functions as an important modulator of the progesterone response pathway. Indeed, its recruitment on the PR-dependent promoters is important for the transcriptional activity of the receptor, both in the absence, and after hormonal stimulation. RNA-seq data supported these results, showing that PRMT1 knockdown in breast cancer cells can affect the expression of thousand progesterone-targeted genes, positively or negatively, and that PRMT1-regulated genes are involved in relevant cell functions including, cell movement, morphology and proliferation (Fig 5A-D and Fig. EV4E).

Notably, we show that PRMT1 activates the expression of genes functionally implicated in regulating mammary epithelium differentiation under normal physiological conditions, and cell migration and invasion during breast cancer progression. Consistently, silencing of PRMT1 in T47D cells leads to significant cell-cycle arrest and a reduced ability to migrate, supporting the involvement of PRMT1 in breast tumorigenesis. Therefore, it is possible that high-level expression of PRMT1 facilitates oncogenesis by providing tumour cells with a survival advantage, in part by enhancing the progesterin-dependent receptor degradation, and thereby maintaining cells in a proliferative mode. Many studies already revealed an impact of PRMT1 in breast tumorigenesis [49]. The expression of the enzyme is often upregulated in tumour samples compared to adjacent normal tissue. Moreover, these studies have highlighted different mechanisms by which PRMT1 regulates the proliferation of tumor cells (regulation of the epithelio-mesenchymal transition EMT, sensitization of cells to a therapy, etc.) [22]. Our results identify a new regulation way used by PRMT1: the direct methylation of the progesterone receptor, a key driver of proliferation of breast cells. Since PRMT1 enhances the transcriptional activity of PR (Fig. EV3A), we can consider that PRMT1-mediated transactivation is mainly due to direct methylation of PR, leading to increased transcription *via* the activation of PR degradation (Fig. 8F). This is supported by the analyze of the biological consequences of PR methylation at R637 under physiological conditions, using the T47D<sub>wt</sub> and T47D<sub>R637K</sub> cell lines, engineered to stable express the wild-type and mutant forms of PR-B in PR<sub>KO</sub> T47D cells. We established that, the effects of the loss of methylation at R637 observed under progesterone treatment are similar to the results obtained in PRMT1 knocked down cells: T47D<sub>R637K</sub> cells display decreased oncogenic PR functions, including a retarded cell growth and a reduced expression of some PRMT1-dependent PR downstream targets, identified by RNA-seq (Fig. 8E-F). Moreover, the methylation of arginine 637 affects PR stability and/or turnover (Fig. 8B-D), suggesting that the effects of PRMT1 on progesterone pathway occur, at least in part, through the methylation of PR on this conserved residue. Notably, the Arg 637 is located within

the hinge region of the steroid receptor, which contains sites for posttranslational modifications, such as phosphorylation and acetylation [40]. Precisely, this conserved arginine residue Arg 637 flanks an acetylation consensus site, in which three lysine residues Lys 638-640 -641 are modified following progesterone stimulation [50]. It is interesting to note that non-acetylatable mutants (PR<sub>K-A</sub>) exhibit defective transcriptional activation and are more stable than wild-type receptors, namely a phenotype similar to non-methylable mutant PR<sub>R637K</sub> (Fig. 8). It could exist a functional communication between these two modifications, as we currently observed with the histone tails on chromatin [51].

In summary, our findings reveal important insights that link arginine methylation to the maintenance of the balance between phosphorylation and down-regulation of PR. PRMT1 controls this ligand-dependent turnover of the receptor, a key determinant for PR target gene selection and/or proper transcriptional regulation. Altered methylation of the receptor results in aberrant cellular response to hormonal stimuli, that might contribute to pathogenesis.

## **Materials and Methods**

### **Cell culture and treatments**

T47D (ATCC) were cultured in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% penicillin-streptomycin (Life Technologies) and insulin (10 $\mu$ g/ml). Cos7 and HeLa cells (ATCC) were maintained in DMEM, supplemented with 10% FBS and 2% penicillin-streptomycin (Life Technologies). All cell lines were grown in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, authenticated by Eurofins and tested for Mycoplasma infection by the MycoAlert Mycoplasma Detection Assay (Lonza, Rockland, ME USA).

Prior to experiments, when it was indicated, cells were grown in phenol red-free medium supplemented with 10% charcoal-stripped serum (Biowest). 48h later, medium was replaced by

fresh serum-free medium. After 48h in serum-free conditions, cells were treated with 10 nM of R5020 (Perkin Elmer) or an equivalent amount of ethanol vehicle for the indicated time. When indicated, inhibitors were added to cells: MS023 Type I PRMT inhibitor (Tocris) for 48h, at the indicated concentration. Cycloheximide (Sigma, 50 $\mu$ M) or MG132 proteasome inhibitor (Sigma, 10  $\mu$ M) or DMSO vehicle were added 16h or 8h respectively before R5020 treatment.

### **Generation of CRISPR cell lines PR-KO**

To knock-out PR genes in T47D cells, we used the pLCV2 plasmid (a gift from Feng Zhang, Addgene plasmid #52961). Oligonucleotides pairs were hybridized and cloned into the LentiCRISPR V2 vector linearized with BsmB1 to generate T47D clones KO. (PR Guide#1 Fw CACCGcccagtggaagccgtctccgc, Rev AAACgcgagacggcttactgggC; PR Guide #2 Fw ; CACCGtctgcggtccgcttctgaa; Rev AAACttcagaagcgaccgcagaC) targeting the regions 624-637 and 693-713 of the PR-B coding sequence. To generate knockout clones, T47D cells were transfected with the corresponding LentiCRISPR V2 plasmids and selected with blasticidin (5  $\mu$ g/ml, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) for 1 week. Cells were then cloned in 96-well plates by limiting dilution. Isolated clones were characterized by immunoblotting. For five different clones, we confirmed the knockout at DNA and protein levels. We performed genotyping PCRs using a forward primer upstream (5'- GGGGAGTCCAGTCGTCAT -3') and a reverse primer downstream (5'- ACTTTCGTCTTCCAGCAGC 3') of the sgRNA cleavage site. The amplified fragments were then sequenced using an oligo targeting a sequence inside the fragment (5' CCAGAAAAGGACAGCGGAC 3').

### **Generation of stable cell lines, T47D<sub>WT</sub> and T47D<sub>R637K</sub>**

For the production of rescue cell lines, PR CRISPR KO cells were transfected with pPRUpuPR-WT and -R637K, plasmids using Jetprime (Polyplus transfection). Screening of stable transfected

cells was performed using puromycin dihydrochloride, 1 µg/ml. Stable cell populations called T47D<sub>wt</sub> and T47D<sub>R637K</sub> were maintained in medium containing 0.5 µg/ml puromycin.

### Plasmids and constructions

The GST-PR vectors (GST-PR-1, -PR-2, -PR-3, -PR-4, -PR-5) were constructed by inserting the cDNA fragments illustrated in Figure 6C, obtained by PCR amplification, into the pET41a vector (Novagen). The GST-PR-3 R637A mutant was also produced. The GST-PR fusion proteins were expressed in BL21 competent cells and purified using glutathione-sepharose 4B resin (GE Healthcare Life Sciences) as previously described. All of the PR mutants were generated using a QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions and the sequences were verified by DNA sequencing. The mammalian expression vector pSG5 PRB was a gift from Pr P. Chambon [5]. pSG5V5 PRB was obtained by inserting the V5-TAG coding sequence in frame with the coding sequence of PRB by PCR. pSG5V5 PRB plasmid was used to generate PR-R637A. To rescue the phenotype of PR KO clones, a guide-resistant mutant of the PRB isoform was created (pSG5V5 gr) by substituting four nucleotides in the PR guide 1 (G633A, G6364, T639C and G641A) and four nucleotides in the PR guide 2 (C715T, T717A, C718T and G720A) targeting regions. This guide-resistant PRB was cloned into the stable mammalian expression vector pPRUpu. pSG5V5gr PRB and pPRUpuV5gr PRB were used to obtain the PR R637K.

Sequences of the primers used are listed in the Supplementary Material Section.

### GST pull-down

GST and GST-PRMT1 were expressed in *Escherichia coli* and purified over glutathione-sepharose beads. Binding assays, using *in vitro* translated PR-B or ER $\alpha$  labeled with [<sup>35</sup>S] methionine, were carried out as previously described [23].

### ***In vitro* methylation assays**

The *in vitro* methylation assays were performed as described previously [23]. Briefly, GST-PRMT1 or His-tagged CARM1 (Upstate Biotechnology) were incubated with different GST-tagged PR fragments or GST-tagged hinge ER $\alpha$  in the presence of S-adenosyl-L[methyl-<sup>3</sup>H]methionine (Amersham Biosciences) GST-PRMT1 or His-tagged CARM1 (Upstate Biotechnology) for 90 min at 37°C or 1h at 30°C, respectively. Methylation reactions were quenched by the addition of an equal volume of 2x Laemmli sample buffer, heated at 100°C for 5 min, and separated on SDS-PAGE. Following electrophoresis, gels were soaked in Amplify fluorographic reagent (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions and visualized by fluorography. The cold methylation assays were performed using 0,5 mM of AdoMet.

### **siRNA and plasmid transfection**

siRNA transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermofisher) according to the manufacturer's protocol. After 72h, the down-regulation was analyzed by Western blot or by RT-qPCR. If requested after 48h, the medium was replaced by fresh medium without serum and cells were treated with R5020 (10 nM) or ethanol for different times. Plasmid transfections were done using the JetPRIME reagent (Ozyme) according to the manufacturer's protocol. Cells were analyzed after the indicated times (48h or 72h). SiRNAs pool against PR, PRMT1 and HP1 $\gamma$  were purchased from Thermofischer Scientific (catalog #AM16708) and the siRNA negative control from Eurogentec (catalog # SR-CL000-00).

### **Luciferase reporter assay**

Reporter assay was carried out as described [24].

### **Cycloheximide chase assay**

$3 \times 10^5$  cells were grown in complete RPMI medium for 24h and then in phenol red-free medium supplemented with 10% charcoal-stripped serum for 48h. 16h before starting the R5020 stimulation, 50 $\mu$ g/mL cycloheximide (Sigma) or vehicle DMSO were added. After each R5020-time point, cells were lysed with protein lysis buffer with freshly-added protease inhibitor and analyzed by Western blot.

### **RNA extraction and real-time RT-qPCR analysis**

Total RNA (1  $\mu$ g) was extracted and purified using TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, USA), prior to being reverse-transcribed using 100 ng of random primers following the Superscript II (ThermoFisher, USA) protocol. Real time PCR was performed with SYBR Green qPCR master mix (BioRad) in a Step One plus real-time PCR detection system (Applied Biosystems). All amplifications were performed in triplicate. Mean values of triplicate measurements were calculated according to the  $-\Delta\Delta C_t$  quantification method, and were normalized against the expression of 28S ribosomal mRNA as reference. Data were presented as mean  $\pm$  SEM. Sequences of the oligonucleotides used are listed in the Supplementary Material Section.

### **Chromatin immunoprecipitation**

Chromatin immunoprecipitation was performed as previously described [25]. Briefly, chromatin was prepared from  $5 \times 10^6$  of T47D cells (untreated or treated with 10 nM of R5020 for 1h). Cells were crosslinked with 1% formaldehyde (Sigma-Aldrich, USA) for 10 min at room temperature and treated with 0.125 M glycine for 5 min. Nuclei were lysed in 300  $\mu$ L ice-cold RIPA buffer prior to Chromatin-DNA shearing with a Diogene Bioruptor. ChIP was performed using 4  $\mu$ g of anti-PR antibody (Santacruz #sc7208), anti-PRMT1 (Bethyl Laboratories #A300-722A), anti-LSD1 (Cell Signaling #2184) and anti-H3K4me3 (C15410003, Diagenode, Belgium).

Dynabeads® Protein G (10003D, Life Technologies, France) were used to retrieve immunocomplexes. After 5h of proteinase-K reverse-crosslinking at 65°C, DNA was purified with phenol/chlorophorm/isoamylalcohol. 2 ng of input DNA were used for qPCR analysis to quantify co-precipitated chromatin-DNA. Relative enrichment of a given promoter region obtained with a specific antibody was compared with Input DNA, normalized to a reference locus (human chromosome 1 in which no histone modification was reported). Data were presented as mean  $\pm$  SEM. Sequences of the primers used to amplify ChIP-enriched DNA are listed in the Supplementary Material Section.

### **RNA-sequencing and RNA-seq analysis**

RNA-Sequencing experiment was performed in T47D cells. Cells were transfected with siCT or siPRMT1 (50 nM) for 72h and treated with R5020 (10 nM) for 6h before RNA extraction. Sequencing was done by the IGFL (Institute of functional genomic of Lyon) Sequencing Platform, to compare gene expression levels of R5020-induced genes between siCT and siPRMT1 conditions. cDNA libraries were prepared using the SENSE mRNA-Seq Library Prep Kit V2 (Lexogen, Vienna Austria). Quality of the cDNA was assessed and RT-qPCR was performed for selected PR target genes as quality control. All libraries were sequenced on an Illumina Nextseq500 and mapped on the hg19 version of the human genome using Bowtie2 (Galaxy Version 2.3.2.2). Count tables were prepared using htseq-count (Galaxy Version 0.9.1galaxy3). Differential gene expression analysis was performed with DEseq2 (Galaxy Version 2.1.8.3) using different thresholds. For R5020-induced genes in siCT-cells: FDR < 0.05; p-adjusted value < 0.01; fold-change > 2; expression > 10 reads per million. For R5020-induced genes in siPRMT1-cells: FDR < 0.05; p-adjusted value < 0.01; fold-change > 1.5; expression > 10 reads per million. RNA sequencing data has been submitted to Gene Expression Omnibus (GEO) and are available with

the GSE134194 submission number. Experiments were performed three independent times for si-RNA transfection and RNA extraction.

### **Immunoprecipitation, immunoblot and antibodies**

After treatment, cells were lysed and immunoprecipitations and Western blots were carried out as described [26]. The antibodies and their respective quantities are listed in the Supplementary Material Section.

### **Generation of methylated-R637-PR antibody**

Rabbits were immunized with a peptide corresponding to PR amino acids 628-640 (NH<sub>2</sub>-CQAGMVLGG([Me<sub>2</sub>as]R)KFK-CONH<sub>2</sub>), in which R637 was asymmetrically dimethylated by Covalab (Villeurbanne, France). To purify the met-R637-PR specific antibody, the dimethyl peptide used for the immunization and the corresponding control peptide (non-methyl) were coupled separately to cyanogen bromide activated agarose beads. The antisera were first bound on the non-methylated peptide column. The unbound antiserum was then applied to the methylated peptide column and eluted. The title and the specificity of the purified antibody were then tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

### **Proximity ligation assays, image acquisition and analysis**

PLA was performed using the Duolink kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions as previously described [27]. Cells ( $3 \times 10^5$ ) were grown on coverslips in 12-well plates. After saturation in the blocking solution, seeded cells were incubated with different pairs of primary antibodies. At the end, samples were then analyzed under fluorescence microscopy on a Nikon Eclipse Ni microscope. Images were acquired under identical conditions at 60X magnification. Image acquisition was performed by imaging DAPI staining at a fixed Z-Position while a Z-stack of  $\pm 5 \mu\text{m}$  at  $1 \mu\text{m}$  intervals was carried out. The final image was stacked to a single level before

further quantification. On each sample, at least one hundred cells were counted. Analysis and quantifications of these samples were performed using the Image J software (Version 1.52, NIH, Bethesda, MD, USA). The antibodies used are listed in Supplementary Material Section.

### **Immunofluorescence**

As previously described [23], T47D-cells ( $3 \times 10^5$ ) and T47D<sub>WT/R637K</sub> stable cells ( $2 \times 10^5$ ) were grown on coverslips in 12-well plates. After treatment, cells were fixed in methanol for 2 min and washed twice in PBS. Non-specific binding was blocked using a 1% gelatin solution for 30 min at room temperature. Cells were incubated with the different primary antibodies (listed in Supplementary Material Section) for 1h at 37°C, then with the secondary antibodies Alexa Fluor 488 anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK) (1:2000e) and Alexa Fluor 568 anti-rabbit (Invitrogen, Carlsbad, USA) (1:1000e) in Dako diluent for 1h. To finish, coverslips were mounted on glass slides in mounting solution (Dako, Carpinteria, CA, USA). The fluorescent slides were viewed under the NIKON NIE microscope.

### **Analysis of cell migration**

$6 \times 10^5$  cells plated on 96-well ImageLock plates (Essen BioScience) were plated for 24h at 37°C and then scratched (800  $\mu$ m width) with the Wound Maker (Essen BioScience). Addition of R5020 or vehicle ethanol were added in the medium just after scratching, and wound closure was followed and evaluated with the Incucyte Live-Cell Imaging System and dedicated software (Essen Bioscience). Cell migration was evaluated by monitoring the evolution of the size of wound closure ( $\mu$ M) for 24h maximum, in order to assess the contribution of cell proliferation to gap filling. Since wound width decreases as cell migration progresses over time, we represented the results as graphs indicating the rate of migration, corresponding to the change in wound area over time, extrapolated from three independent experiments, each one performed in triplicate.

## **Analysis of cell proliferation**

$4 \times 10^3$  cells were seeded onto a 96-well plate were plated 5h before incubation with the different hormones (E2, R5020 or ethanol). Images were acquired using an IncuCyte ZOOM over 7 days, and cell proliferation was measured as the percentage of cell density observed over this period. Results are represented as graphs indicating the rate of proliferation over time, extrapolated from at least three independent experiments, each one performed in triplicate.

## **Acknowledgements**

We thank Helene Joly for starting the project and Julien Jacquemetton, Cécile Languilaire and Aurore Souef for helpful technical assistance. We are grateful to Loredana D'Amato, Samuele Gherardi and Romain Teinturier for their valuable advices and discussions. We also thank Pr Pierre Chambon for kindly providing the pSG5PR-B and MMTV-Luc plasmids, and Dr Catherine Teyssier for the PRMT1 constructs and Dr Stéphane Ansieau for the plasmid pPRUpu. We are also grateful to Benjamin Gillet and Sandrine Hughes for performing the RNA-Sequencing at the IGFL platform in Lyon. A special thanks to Brigitte Manship and Clément Chapat for reading the manuscript. This study was partially supported by the “Ligue Nationale Contre le Cancer”, the “Association pour la Recherche sur le Cancer” and the association “Odyssea Chambery”. LM is supported by a fellowship from the French Ministry of Research and by the “Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer” and CP by “Fondation de France”.

## **Author Contribution**

L.C. M.L.R. and L.M. conceived the study, designed the experiments and analyzed data. L.M. carried out most of the experiments, I.M. performed the CRISP experiments, C.P. and F.F. helped

L.M. for bioinformatics' analysis of RNA-seq data. M.L.R. and I.M contributed in result discussions and provided material. L.C. coordinated the project. The manuscript was written by L.C., with contributions from L.M.

### **Conflict of interest.**

The authors have declared that no competing interests exist.

### **Data availability**

RNA sequencing data has been submitted to Gene Expression Omnibus (GEO) and are available with the GSE134194 submission number.

### **References**

1. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, et al. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**: 835–839.
2. Briskin C, O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a003178.
3. Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP (2016) Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol* **428**: 3831–3849.
4. Knutson TP, Lange CA (2014) Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer. *Pharmacol Ther* **142**: 114–125.
5. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* **9**: 1603–1614.
6. Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM (2003) Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9744–9749.
7. Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP (2001) Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* **8**: 269–280.
8. Faivre EJ, Lange CA (2007) Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* **27**: 466–480.
9. Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F (1998) Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* **17**: 2008–2018.

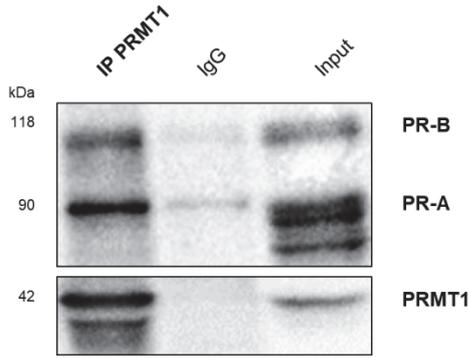
10. Vicent GP, Ballaré C, Nacht AS, Clausell J, Subtil-Rodríguez A, Quiles I, Jordan A, Beato M (2008) Convergence on chromatin of non-genomic and genomic pathways of hormone signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* **109**: 344–349.
11. Abdel-Hafiz HA, Horwitz KB (2014) Post-translational modifications of the progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* **140**: 80–89.
12. Lange CA, Shen T, Horwitz KB (2000) Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1032–1037.
13. Shen T, Horwitz KB, Lange CA (2001) Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol* **21**: 6122–6131.
14. Beato M, Vicent GP (2012) Impact of chromatin structure and dynamics on PR signaling. The initial steps in hormonal gene regulation. *Mol Cell Endocrinol* **357**: 37–42.
15. Jacobsen BM, Horwitz KB (2012) Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* **357**: 18–29.
16. Vicent GP, Nacht AS, Zaurin R, Font-Mateu J, Soronellas D, Le Dily F, Reyes D, Beato M (2013) Unliganded progesterone receptor-mediated targeting of an RNA-containing repressive complex silences a subset of hormone-inducible genes. *Genes Dev* **27**: 1179–1197.
17. Koh SS, Chen D, Lee YH, Stallcup MR (2001) Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem* **276**: 1089–1098.
18. Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, et al. (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* **293**: 853–857.
19. Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* **33**: 1–13.
20. Blanc RS, Richard S (2017) Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol Cell* **65**: 8–24.
21. Poulard C, Corbo L, Le Romancer M (2016) Protein arginine methylation/demethylation and cancer. *Oncotarget* **7**: 67532–67550.
22. Yang Y, Bedford MT (2013) Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* **13**: 37–50.
23. Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Kolytcheff C, Rostan M-C, Corbo L, Le Romancer M (2007) hCAF1, a new regulator of PRMT1-dependent arginine methylation. *J Cell Sci* **120**: 638–647.
24. Prévôt D, Morel AP, Voeltzel T, Rostan MC, Rimokh R, Magaud JP, Corbo L (2001) Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway. *J Biol Chem* **276**: 9640–9648.
25. Chapat C, Kolytcheff C, Le Romancer M, Auboeuf D, De La Grange P, Chettab K, Sentis S, Corbo L (2013) hCAF1/CNOT7 regulates interferon signalling by targeting STAT1. *EMBO J* **32**: 688–700.
26. Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, Corbo L (2008) Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* **31**: 212–221.
27. Poulard C, Rambaud J, Le Romancer M, Corbo L (2014) Proximity ligation assay to detect and localize the interactions of ER $\alpha$  with PI3-K and Src in breast cancer cells and tumor samples. *Methods Mol Biol* **1204**: 135–143.
28. Hagan CR, Daniel AR, Dressing GE, Lange CA (2012) Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Mol Cell Endocrinol* **357**: 43–49.

29. Faivre EJ, Daniel AR, Hillard CJ, Lange CA (2008) Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Mol Endocrinol* **22**: 823–837.
30. Eram MS, Shen Y, Szewczyk M, Wu H, Senisterra G, Li F, Butler KV, Kaniskan HÜ, Speed BA, Dela Seña C, et al. (2016) A Potent, Selective, and Cell-Active Inhibitor of Human Type I Protein Arginine Methyltransferases. *ACS Chem Biol* **11**: 772–781.
31. Stallcup MR, Chen D, Koh SS, Ma H, Lee YH, Li H, Schurter BT, Aswad DW (2000) Cooperation between protein-acetylating and protein-methylating co-activators in transcriptional activation. *Biochem Soc Trans* **28**: 415–418.
32. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AHFM, Günther T, Buettner R, Schüle R (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437**: 436–439.
33. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, Serandour AA, Serandour AAA, Birrell SN, Bruna A, et al. (2015) Progesterone receptor modulates ER $\alpha$  action in breast cancer. *Nature* **523**: 313–317.
34. Kovacevic Z, Menezes SV, Sahni S, Kalinowski DS, Bae D-H, Lane DJR, Richardson DR (2016) The Metastasis Suppressor, N-MYC Downstream-regulated Gene-1 (NDRG1), Down-regulates the ErbB Family of Receptors to Inhibit Downstream Oncogenic Signaling Pathways. *J Biol Chem* **291**: 1029–1052.
35. Menezes SV, Sahni S, Kovacevic Z, Richardson DR (2017) Interplay of the iron-regulated metastasis suppressor NDRG1 with epidermal growth factor receptor (EGFR) and oncogenic signaling. *J Biol Chem* **292**: 12772–12782.
36. Godbole M, Togar T, Patel K, Dharavath B, Yadav N, Janjuha S, Gardi N, Tiwary K, Terwadkar P, Desai S, et al. (2018) Up-regulation of the kinase gene SGK1 by progesterone activates the AP-1-NDRG1 axis in both PR-positive and -negative breast cancer cells. *J Biol Chem* **293**: 19263–19276.
37. Castel P, Ellis H, Bago R, Toska E, Razavi P, Carmona FJ, Kannan S, Verma CS, Dickler M, Chandarlapaty S, et al. (2016) PDK1-SGK1 Signaling Sustains AKT-Independent mTORC1 Activation and Confers Resistance to PI3K $\alpha$  Inhibition. *Cancer Cell* **30**: 229–242.
38. McCaig C, Potter L, Abramczyk O, Murray JT (2011) Phosphorylation of NDRG1 is temporally and spatially controlled during the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* **411**: 227–234.
39. Hill KK, Roemer SC, Jones DNM, Churchill MEA, Edwards DP (2009) A progesterone receptor co-activator (JDP2) mediates activity through interaction with residues in the carboxyl-terminal extension of the DNA binding domain. *J Biol Chem* **284**: 24415–24424.
40. Daniel AR, Gaviglio AL, Czaplicki LM, Hillard CJ, Housa D, Lange CA (2010) The progesterone receptor hinge region regulates the kinetics of transcriptional responses through acetylation, phosphorylation, and nuclear retention. *Mol Endocrinol* **24**: 2126–2138.
41. Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F (2003) Estrogen receptor- $\alpha$  directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**: 751–763.
42. Calvo V, Beato M (2011) BRCA1 counteracts progesterone action by ubiquitination leading to progesterone receptor degradation and epigenetic silencing of target promoters. *Cancer Res* **71**: 3422–3431.
43. Thompson D, Easton DF, Breast Cancer Linkage Consortium (2002) Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* **94**: 1358–1365.
44. Daniel AR, Knutson TP, Lange CA (2009) Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promoter selectivity. *Mol Cell Endocrinol* **308**: 47–52.

45. Dennis AP, Lonard DM, Nawaz Z, O'Malley BW (2005) Inhibition of the 26S proteasome blocks progesterone receptor-dependent transcription through failed recruitment of RNA polymerase II. *J Steroid Biochem Mol Biol* **94**: 337–346.
46. Chapat C, Chettab K, Simonet P, Wang P, De La Grange P, Le Romancer M, Corbo L (2017) Alternative splicing of CNOT7 diversifies CCR4-NOT functions. *Nucleic Acids Res* **45**: 8508–8523.
47. Albert TK, Hanzawa H, Legtenberg YIA, de Ruwe MJ, van den Heuvel FAJ, Collart MA, Boelens R, Timmers HTM (2002) Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex. *EMBO J* **21**: 355–364.
48. Zhang L, Tran N-T, Su H, Wang R, Lu Y, Tang H, Aoyagi S, Guo A, Khodadadi-Jamayran A, Zhou D, et al. (2015) Cross-talk between PRMT1-mediated methylation and ubiquitylation on RBM15 controls RNA splicing. *Elife* **4**:
49. Morettin A, Baldwin RM, Côté J (2015) Arginine methyltransferases as novel therapeutic targets for breast cancer. *Mutagenesis* **30**: 177–189.
50. Daniel AR, Gaviglio AL, Czaplicki LM, Hillard CJ, Housa D, Lange CA (2010) The Progesterone Receptor Hinge Region Regulates the Kinetics of Transcriptional Responses Through Acetylation, Phosphorylation, and Nuclear Retention. *Mol Endocrinol* **24**: 2126–2138.
51. Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**: 381–395.

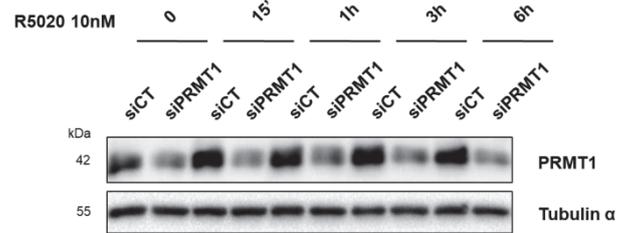
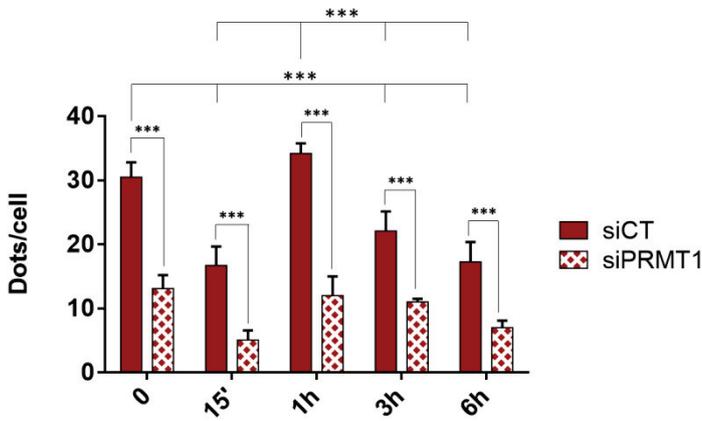
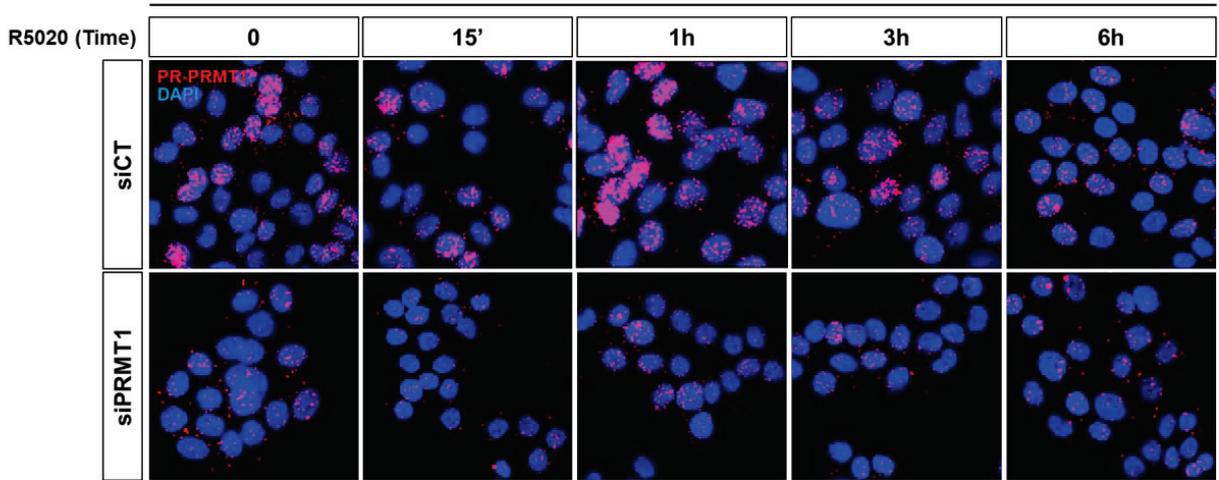
**Fig. 1**

**A.**



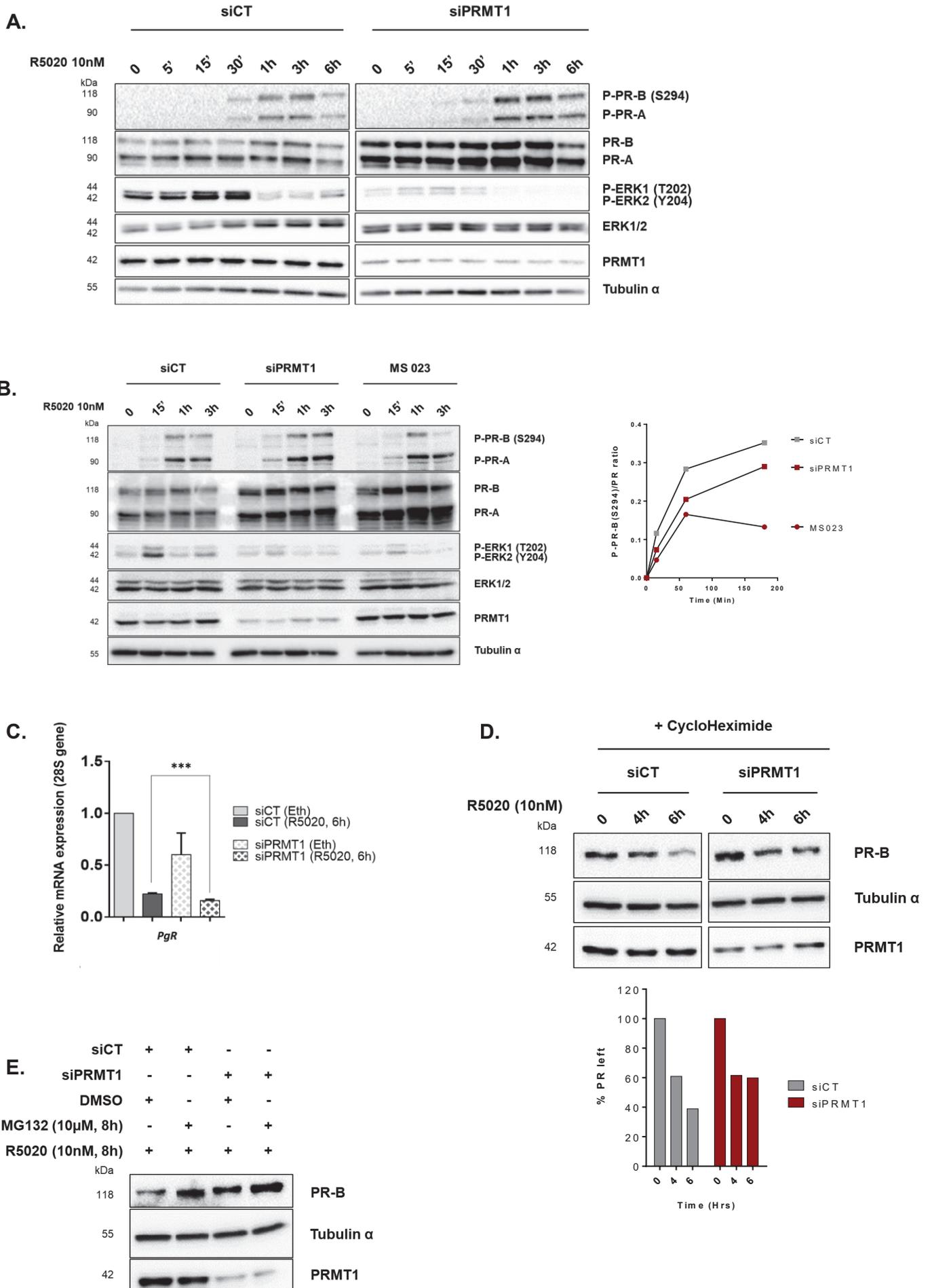
**B.**

**PR - PRMT1**

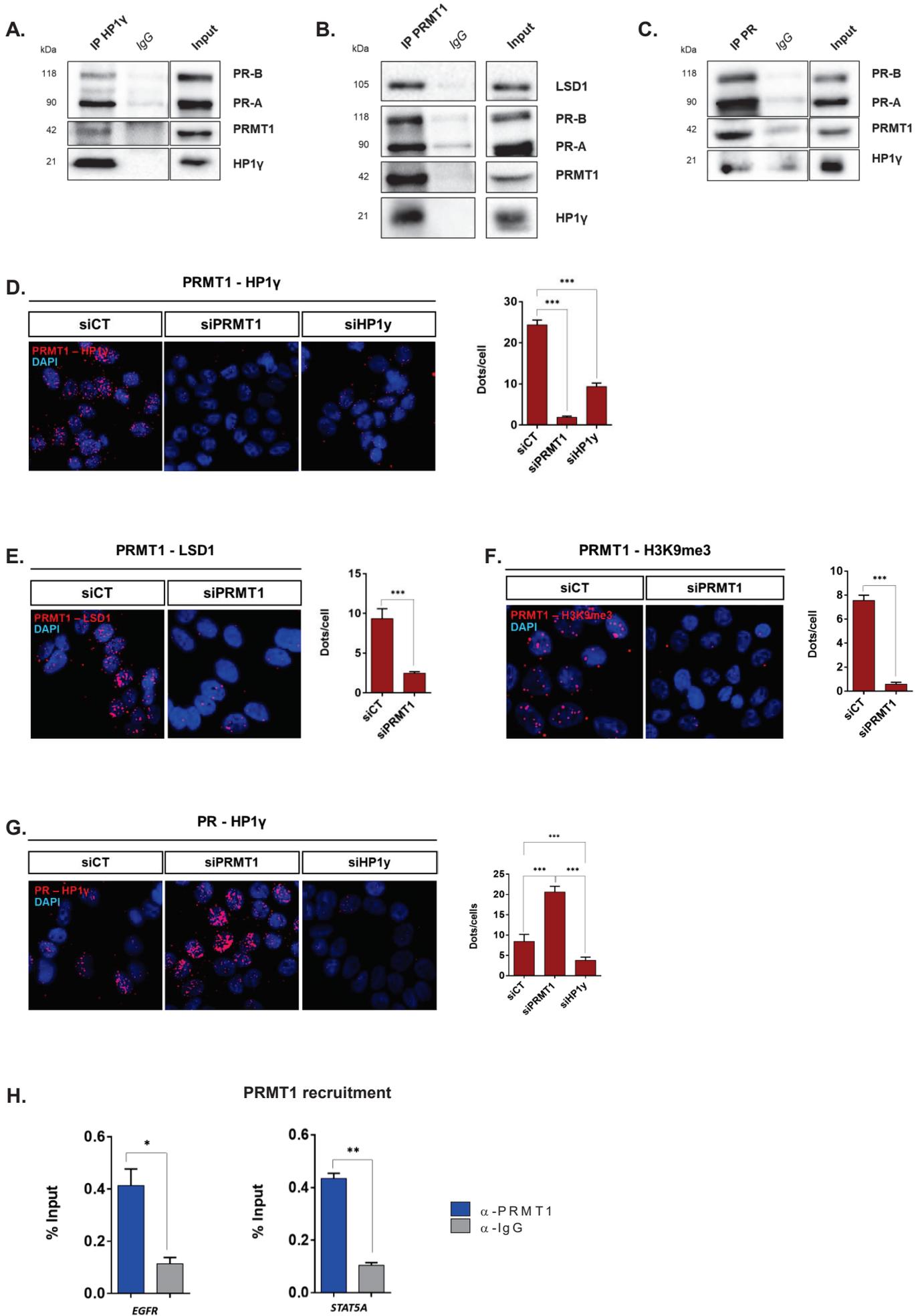


## **Figure legends**

**Fig. 1** | PRMT1 and PR interact in the nucleus of T47D breast cancer cells. **A.** Whole-cell extracts (WCE) of T47D were collected and subjected to immunoprecipitation (IP) using anti-PRMT1 antibody or control IgG, and immunoblotted with anti-PR. **B.** Proximity Ligation Assay (PLA) was used to detect the cellular co-localization of endogenous PRMT1 and PR in T47D, grown on coverslips in 12-well plates. Cells were transfected with control siRNA (siCT) or with siRNA against PRMT1 (siPRMT1) and were cultured in medium deprived of steroids for 48 h, prior to the addition of 10 nM R5020 for the indicated times. PLA for PR-PRMT1 interaction was performed with anti-PR and anti-PRMT1 specific antibodies. The nuclei were counterstained with DAPI (blue) (Obj: X60). The detected interactions are represented by red dots. Quantification of the number of signals per cell, shown in the lower panel was performed by computer-assisted analysis, as reported in the Materials and Methods section. The mean  $\pm$  SD of one experiment representative of three experiments is shown. The P-value was determined using the Student's t-test. \*\*\* indicates a  $P < 0.001$ . The efficacy of PRMT1 siRNA treatment analyzed by Western blot is shown in the lower panel (right).

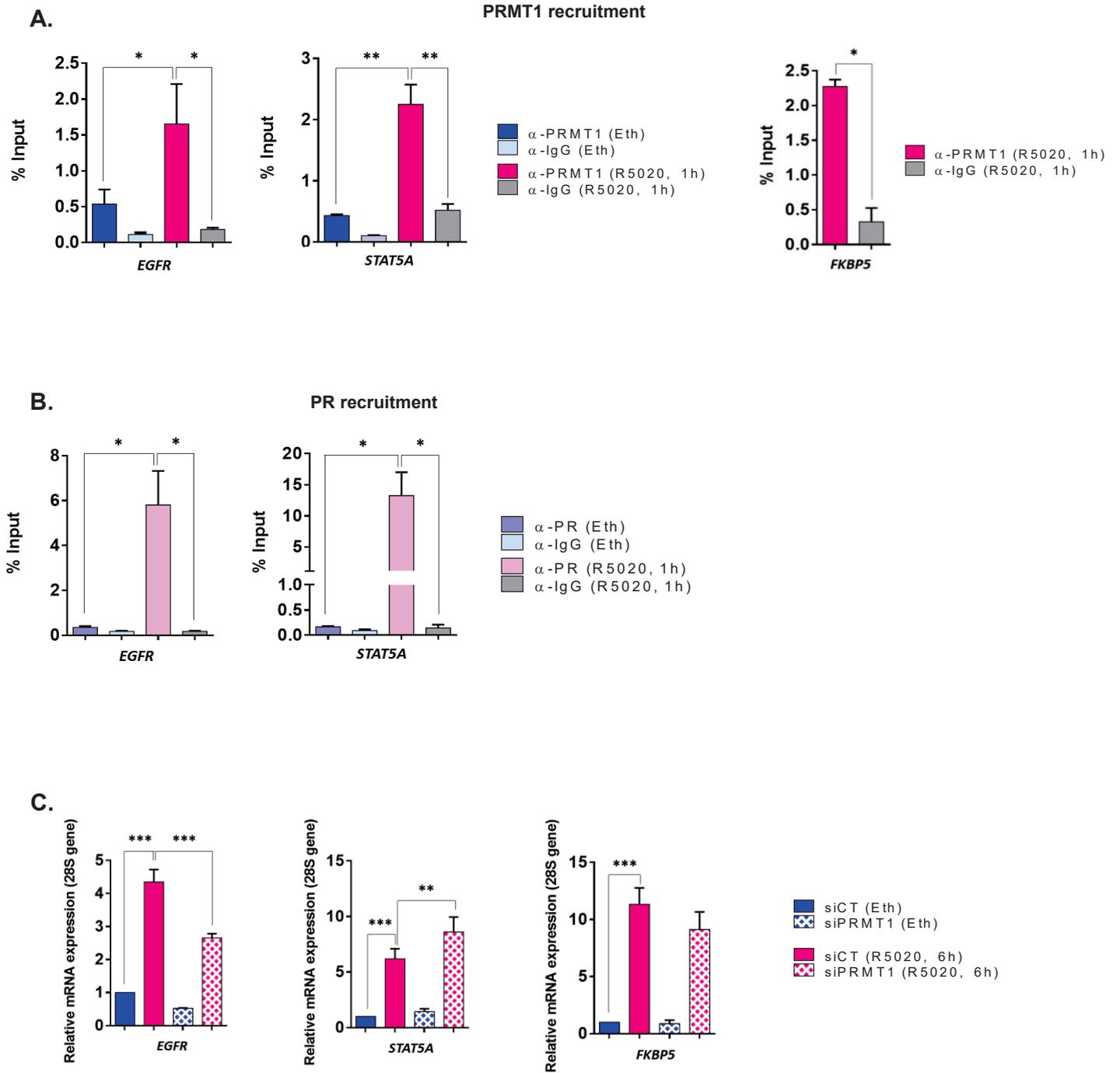


**Fig. 2** | PRMT1 affects progesterone signaling pathway. Cell extracts from T47D cells depleted or not for PRMT1 by siRNA **A.** or treated with 60 nM of MS023 inhibitor **B.**, grown in charcoal-stripped serum for 48h and treated with 10 nM of R5020 for the indicated times, were examined by Western blot analysis using the indicated antibodies (left panel). Quantification of phospho-PR [P-PR-B (S294)] band intensity relative to PR-B intensity was measured by ChemiDoc MP (Biorad). The ratio was calculated for each time points and is shown graphically (right panel). Data are representative of three independent experiments. **C.** PR mRNA level in T47D cells, silenced with PRMT1 siRNA (siPRMT1) or with siRNA control (siCT), treated with 10 nM of R5020 for 6h. The mean  $\pm$  SEM of three experiments is shown. The P-value was determined using the Student's t-test. \*\*\* indicates a  $P < 0.001$ . **D.** Half-life study of endogenous PR-B protein. Lysates from T47D cells depleted or not for PRMT1 as in A were collected at the indicated time points after addition of cycloheximide (CHX) and subjected to immunoblotting with the indicated antibodies. The amount of PR-B was quantified by densitometry and is shown relative to the amount of PR-B expressed in absence of cycloheximide. Data are shown graphically (lower panel) are representative of three independent experiments. **E.** Lysates from T47D cells depleted or not for PRMT1 as in A were treated for 8h with 10 $\mu$ M of the proteasome inhibitor MG132 or vehicle DMSO before R5020 treatment and then were immunoblotted with the indicated antibodies.

**Fig. 3**

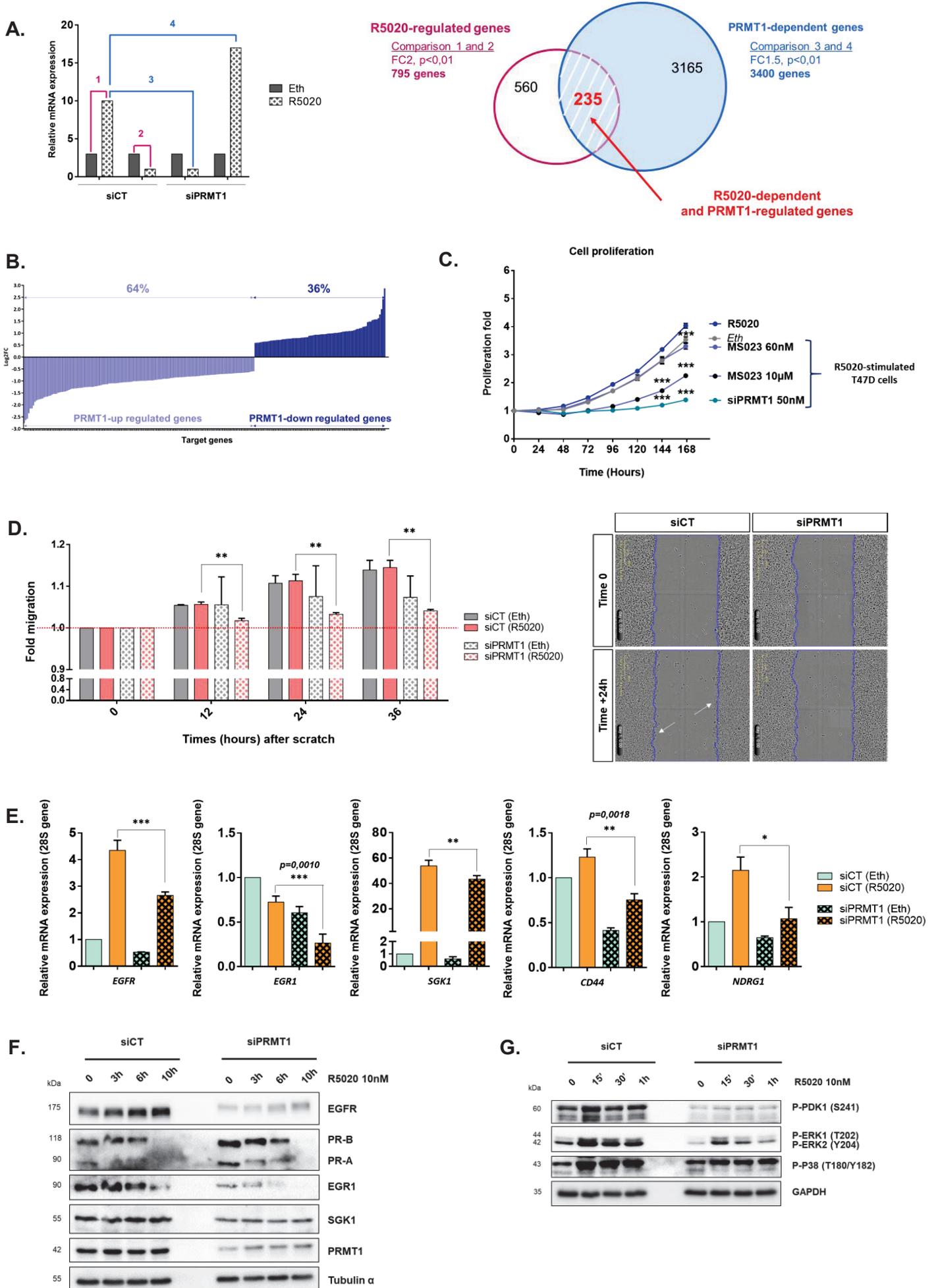
**Fig. 3** | PRMT1 targets the uPR-HP1 $\gamma$ -LSD1 repressive complex in nuclei of untreated T47D cells. T47D cells were grown for 48h in charcoal-stripped serum and then starved for 1 day in serum-free RPMI medium. Whole-cell extracts of T47D were collected and subjected to immunoprecipitation (IP) using **A.** an anti-HP1 $\gamma$ , **B.** an anti-PRMT1 or **C.** an anti-PR antibody or with control IgG, were then immunoblotted with the indicated antibodies by Western blot. **D-F.** T47D cells silenced with siRNA control, anti-PRMT1 or anti-HP1 $\gamma$  and grown as described in A, on coverslips in 12-well plates, were analyzed by PLA to detect the cellular interactions/co-localizations of endogenous PRMT1 and its different endogen partners, HP1 $\gamma$  (**D**), LSD1 (**E**) and H3K9me3 (**F**) in the nucleus of untreated T47D cells. The interactions were quantified as described in Fig. 1B. The mean  $\pm$  SD of one experiment representative of three experiments is shown. The P-value was determined using the Student's t-test. \*\*\* indicates a  $P < 0.001$ . The effect of siRNA treatments on protein expression was analyzed by Western blot and shown in the Fig. EV3B. **G.** Endogenous interactions between PR and HP1 $\gamma$  were analyzed by PLA, as described in D. **H.** T47D cells, grown as described in A, were collected and subjected to chromatin immunoprecipitation (ChIP) using an anti-PRMT1 antibody. The precipitated DNA fragments were used for qPCR analysis using specific primers for the indicated promoters with respect to the input DNA and normalized against a reference locus (human chromosome 1 gene). The mean  $\pm$  SEM of at least three experiments is shown. The P-value was determined using the Student's t-test. \* indicates a  $P < 0.05$  and \*\* indicates a  $P < 0.01$ .

**Fig. 4**



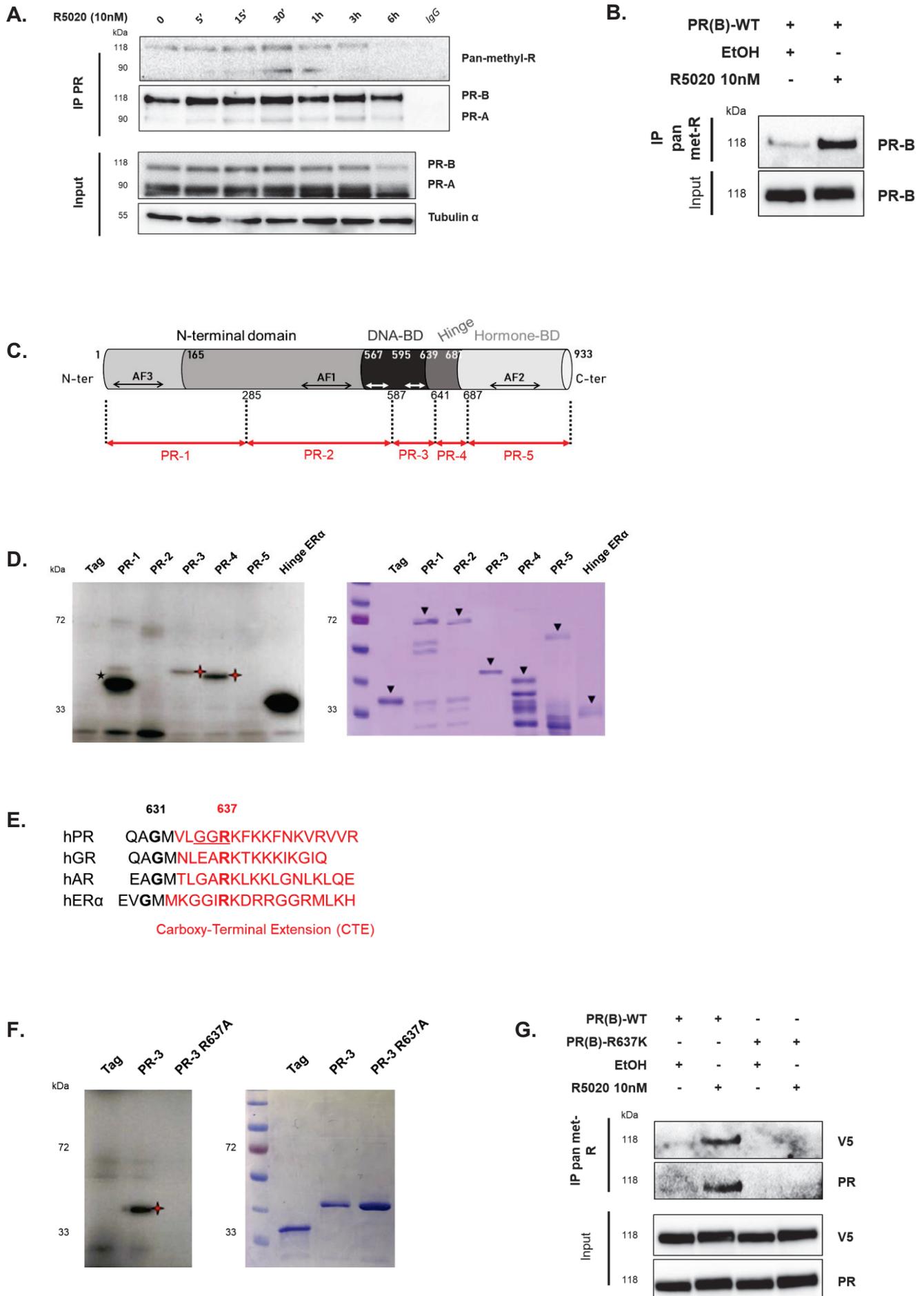
**Fig. 4** | PRMT1 is a transcriptional coregulator of activated PR in T47D cells. T47D cells, grown in charcoal-stripped serum for 48h and then treated with 10 nM R5020 for 1h, were subjected to ChIP assay using **A.** an anti-PRMT1 or **B.** an anti-PR antibody, or with control IgG. The precipitated DNA fragments were used for qPCR analysis using specific primers for the indicated promoters with respect to the input DNA and normalized to a reference locus (human chromosome 1 gene). The mean  $\pm$  SEM of at least three experiments is shown. The P-value was determined using the Student's t-test. \* indicated a  $P < 0.05$  and \*\* for a  $P < 0.01$ . **C.** T47D cells, depleted or not (siCT) for PRMT1 by siRNA (siPRMT1), were treated, or not (Eth) 6h with 10 nM of R5020. Total RNA was prepared and cDNAs analyzed by RT-qPCR with specific primers for EGFR, STAT5A and FKBP5. The values were normalized against 28S mRNA and represent the mean  $\pm$  SEM of three experiments. The P-value was determined using the Student's t-test. \*\* indicates a  $P < 0.01$  and \*\*\* indicates a  $P < 0.001$ .

**Fig. 5**

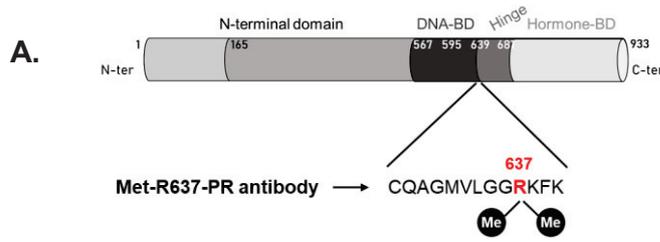


**Fig. 5** | PRMT1 regulates the R5020-induced proliferation and migration of T47D breast cancer cells. **A.** Genome-wide RNA-sequencing analysis was performed on T47D cells to identify the genes dependent on PRMT1 for R5020-regulated expression. *Left panel:* Hypothetical results of gene expression profiles for a given gene illustrate how specific pairwise comparisons between datasets for individual samples were performed. Numbered bars represent hypothetical mRNA levels from RNA-seq data for cells expressing the indicated siRNA (PRMT1 or CT) and treated for 6h with ethanol (Eth) or 10 nM of R5020. Colored numbers represent pairwise comparisons performed to determine sets of genes for which mRNA levels were significantly different between the samples. For instance, comparison 1 = set of R5020-regulated genes (fold change  $\geq 2$ , adjusted  $P < 0.01$ ); comparison 4 = set of PRMT1-dependent genes (fold change  $> 1.5$ , adjusted  $P < 0.01$ ). *Right panel:* Pink and white Venn diagram represents the R5020-regulated genes in cells expressing siCT (comparisons 1 and 2); blue Venn diagram, PRMT1-dependent genes in R5020-treated cells (comparisons 3 and 4). Overlap area (in red) indicates the number of genes shared among sets. Controls for T47D cell treatments are provided in the Fig. EV4A-C. **B.** Representation of fold changes ( $\log_2FC$ ) of all target gene expressions identified by RNA-sequencing analysis (235 genes). On the left (light blue), genes which are down-regulated with siPRMT1 (64%), thus positively regulated by PRMT1. On the right (dark blue), genes which are negatively regulated by PRMT1 (36%). **C.** Analysis of T47D cell proliferation by Incucyte technology. Cells were transfected with siCT or siPRMT1, and treated with 60 nM of MS023 (or DMSO) for 48h in charcoal-stripped serum, and then plated onto 96-well plates for analysis. Steroid hormones (10 nM) were added in the medium every 48h to ensure the proliferation of cells. Image acquisition was conducted every hour using the Incucyte software, which calculates the percentage of cell confluency according to time over 7 days. Results are represented as graphs showing the proliferation rate every 24h. The mean  $\pm$  SD of one experiment representative of three experiments is shown. The  $P$ -value was determined using the Student's t-test. \*\*\* indicates a  $P < 0.001$ . Western blot control on T47D cells transfected with siRNA or treated with PRMT1 inhibitor is shown in the Fig. EV4G. **D.** Cell migration of T47D cells, depleted or not for PRMT1 by siRNA and treated with 10 nM of R5020 or vehicle for 12h, 24h and 36h, was analyzed in a wound scratch assay, as reported in the Materials and Methods section. Briefly, wound closure was followed and evaluated with the Incucyte Live-Cell Imaging System and dedicated software (Essen Bioscience). *Left panel:* the bar plots indicate the cellular migration rate, with a direct comparison between untransfected cells and PRMT1-depleted cells. The mean  $\pm$  SD of one experiment representative of three experiments is shown. The  $P$ -value was determined using the Student's t-test. \*\* indicates a  $P < 0.01$ . *Right panel:* Images of cells 24h after the scratch wound. The blue line corresponds to the initial area of the wound. White arrows indicate cell migration areas. Western blot control on T47D cells transfected with siRNA is shown in the Fig. EV4H. **E.** T47D cells, transfected with siRNA against PRMT1 or siCT, were treated or not 6h with 10 nM of R5020. Total RNA was prepared and cDNAs analyzed by RT-qPCR with specific primers for the indicated PR target genes. The values were normalized against 28S mRNA and represent the mean  $\pm$  SD of at least three experiments. The  $P$ -value was determined using the Student's t-test. \* indicates a  $P < 0.05$ , \*\* indicates a  $P < 0.01$  and \*\*\* indicates a  $P < 0.001$ . **F-G.** Whole-cell extracts of T47D, depleted or not using siPRMT1 and treated with R5020 for the indicated times were collected and subjected to Western blot analysis using the indicated antibodies.

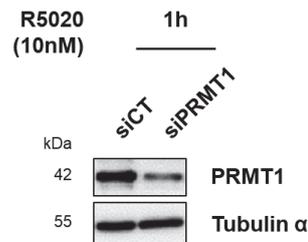
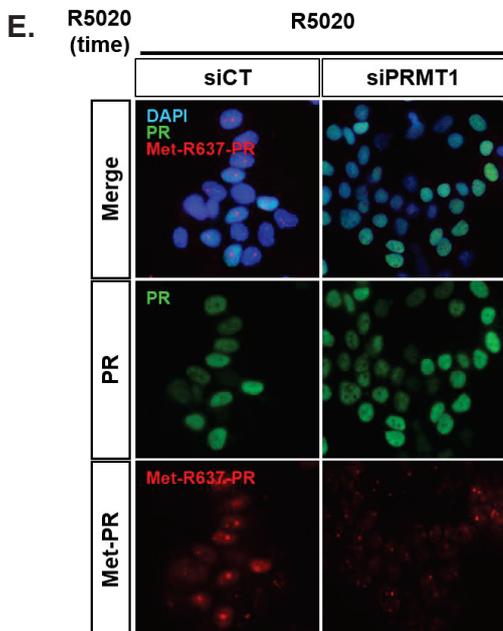
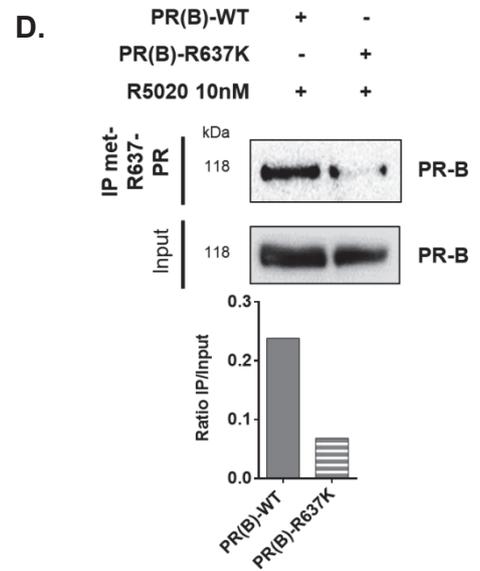
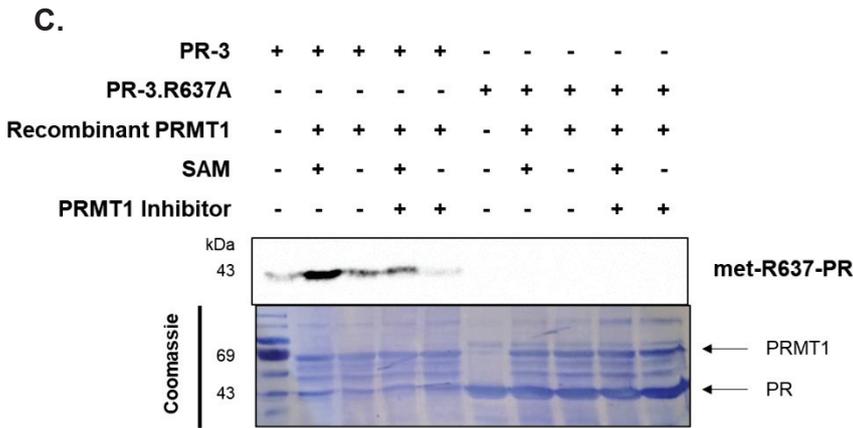
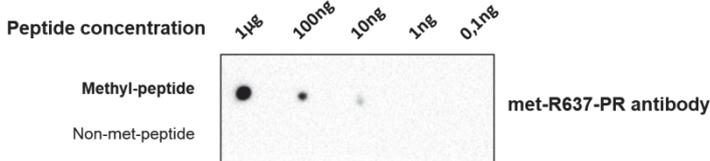
**Fig. 6**



**Fig. 6** | PR is methylated by PRMT1 in R5020-stimulated T47D breast cancer cells. **A.** Whole-cell extracts of T47D stimulated with 10 nM of R5020 for the indicated times were collected and subjected to immunoprecipitation (IP) using an anti-PR antibody or with control IgG, and immunoblotted with pan-methyl-R antibody and with anti-PR. **B.** T47D cells were transfected with V5-tagged PR-B expressing plasmid and then treated for 1h with 10 nM R5020 or vehicle. Lysates were IP with pan-methyl-R antibody and analyzed by immunoblot using the PR antibody. Results shown are representative of three independent experiments. **C.** Illustration of PR domains. PR regions that are subcloned with GST-tag and purified for *in vitro* methylation assay. **D.** An *in vitro* methylation assay was conducted by incubating different recombinant GST-PR fragments with <sup>3</sup>H-SAM (S-adenosyl-methionine) as the methyl donor and recombinant GST-PRMT1 as the enzyme, or recombinant CARM1 used as a control (Fig. EV5A). The methylated proteins were visualized by autoradiography. Red stars indicate the methylated fragments of PR. Black star indicates a bacteria associated contaminant, as the signal did not correspond to any detectable fragment by Coomassie blue staining gel, shown in the right panel. **E.** Alignment of the CTEs of steroid/nuclear receptors with conserved arginine ® sequence in a similar position in the CTE. **F.** An *in vitro* methylation experiment of WT and arginine mutated in PR-3. The red star indicates the methylated fragment of PR. The corresponding Coomassie-stained gel is shown in the right panel. **G.** T47D cells were transfected with V5-tagged PR-WT or -R637K encoding plasmids and then treated for 1h with 10 nM R5020, or vehicle ethanol. Lysates were immunoprecipitated with pan-methyl-R antibody and analyzed by immunoblot using V5 and PR antibodies. Results shown are representative of three independent experiments.

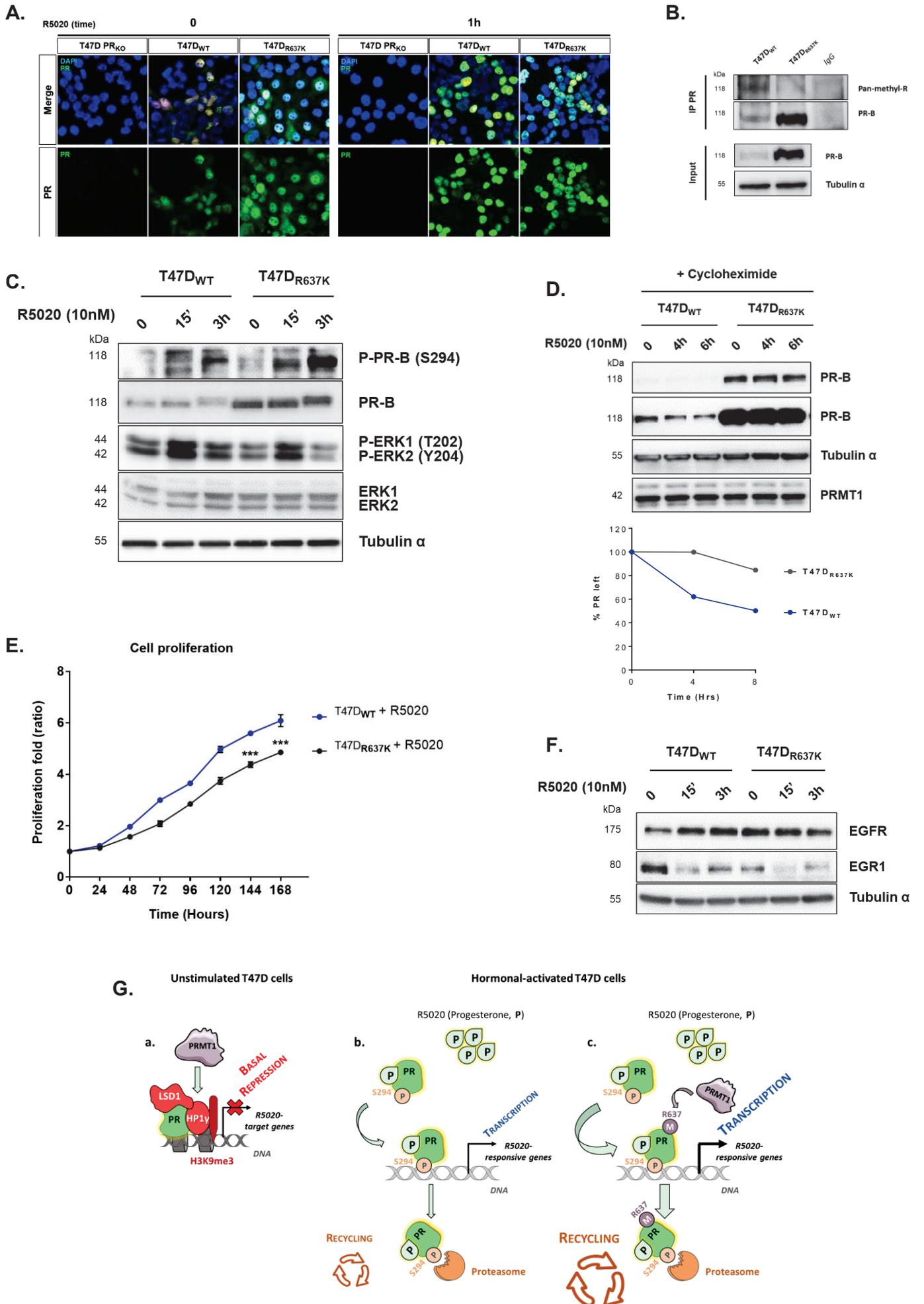


**B. Peptide sequences**  
 Methyl-peptide (628-640)[ME2AS]R637: NH<sub>2</sub>-CQAGMVLGG([Me2as]R)KFK-CONH<sub>2</sub>  
 Non-met-peptide (628-640): NH<sub>2</sub>-QAGMVLGGRKFK-CONH<sub>2</sub>



**Fig. 7** | Arginine 637 of PR is methylated by PRMT1 under progesterone treatment. **A.** Polyclonal peptide antibody (the met-R637-PR antibody) was generated using the annotated peptides encompassing asymmetrically dimethylated-R1637 as antigen. **B.** Dot-blot experiment was performed on different quantities of the indicated peptides, asymmetrically methylated or not at the arginine, and immunoblotted with the met-R637-PR antibody. Peptide sequences were done in the upper panel. **C** Western blotting analysis showed that met-R637-PR antibody only detected GST-PR-3 but not GST-PR3 R637A both methylated *in vitro* using cold SAM (S-adenosyl-methionine) as methyl donor and recombinant GST-PRMT1. The corresponding Coomassie-stained gel is shown in the lower panel. **D.** T47D cells were transfected with V5-tagged PR-WT or -R637K encoding plasmids and then treated for 1h with 10 nM R5020, or vehicle ethanol. Lysates were immunoprecipitated with the met-R637-PR antibody and analyzed by immunoblot with an anti-PR antibody. Western-Blot quantification for the immunoprecipitated methylated PR (met-R637-PR) was determined relative to input using ChemiDoc MP (Biorad). Results shown are representative of three independent experiments. **E.** Immunofluorescence assay was performed on T47D cells, transfected with either siCT or siPRMT1 and then stimulated with 10 nM of R5020 for 1h, using the met-R637-PR and anti-PR antibodies. The nuclei were counterstained with DAPI (blue) (Obj: X40). The effect of siRNA treatments on PRMT1 expression was verified by Western blot.

**Fig. 8**



**Fig. 8** | Inhibiting PR methylation decreases breast cancer cell proliferation and PR turnover. **A.** Immunofluorescence assay of T47D PR<sub>KO</sub>, T47D<sub>WT</sub> and T47D<sub>R637K</sub> cells, before and after stimulation with 10 nM of R5020 for 1h, stained with anti-PR antibody. The nuclei were counterstained with DAPI (blue) (Obj: X40). **B.** Whole-cell extracts of T47D<sub>WT</sub> or T47D<sub>R637K</sub>, stimulated with 10 nM of R5020 for 1h, were collected and subjected to immunoprecipitation (IP) using an anti-PR antibody or control IgG, and immunoblotted with pan-methyl-R antibody and with anti-PR. **C.** T47D<sub>wt</sub> and T47D<sub>R637K</sub> cells were stimulated with 10 nM of R5020 for the indicated times and total protein extracts were analyzed by blot using the indicated antibodies. **D.** Half-life of the endogenous PR-B in T47D<sub>WT</sub> and T47D<sub>R637K</sub> stable cells. Lysates from T47D<sub>WT</sub> and T47D<sub>R637K</sub> cells treated with cycloheximide (50 $\mu$ M) before the stimulation with R5020 for the indicated time points, were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. The amount of PR-B was quantified by densitometry and is shown relative to the amount of PR-B expressed in absence of cycloheximide. Data are shown graphically (lower panel) are representative of three independent experiments. Two different expositions are shown to quantify the PR-B band intensity for each time. The half-life curves are shown in the lower panel and are representative of three independent experiments. **E.** Analysis of T47D<sub>WT</sub> and T47D<sub>R637K</sub> cell's proliferation by Incucyte technology, performed as described in Fig. 5C. Image acquisition was conducted every hour using the Incucyte software, which calculates the percentage of cell confluency according to the time for 7 days. Results are represented as a graph showing the proliferation rate every 24h. The mean  $\pm$  SD of one experiment representative of three experiments is shown. The *P*-value was determined using the Student's t-test. \*\*\* indicates a *P* < 0.001. **F.** T47D<sub>wt</sub> and T47D<sub>R637K</sub> cells were stimulated with 10 nM of R5020 for the indicated times and total protein extracts were analyzed by Western blot using the indicated antibodies. **G.** Model for regulatory functions of PRMT1 in PR signaling. **(a)** In unstimulated cells, PRMT1 associates with unliganded PR (uPR) within the repressive LSD1/HP1 $\gamma$  complex on some progesterone-inducible genes, to maintain them in a silent state; **(b-c)** addition of progestin (R5020) leads to the phosphorylation of PR on Ser-294 (S294), the transcriptionally primed form of the receptor. **(c)** PRMT1 targets promoters of R5020-responsive genes and regulates their transcription, at least in part through the methylation of the receptor on the Arg-637. This modification controls the PR degradation, which constitutes a stimulatory switch that accelerates the recycling of receptors from pre-initiation complexes, required for active hormonal-dependent transcription.

## **Supplemental Information**

### **PRMT1 and arginine methylation modulate PR action in breast cancer.**

Lucie Malbeteau<sup>1,2</sup>, Coralie Poulard<sup>1,2</sup>, Ivan Mikaelian<sup>1,2</sup>, Frédéric Flamant<sup>1,3</sup>, Muriel Le Romancer<sup>1,2\*</sup>, and Laura Corbo<sup>1,2\*</sup>

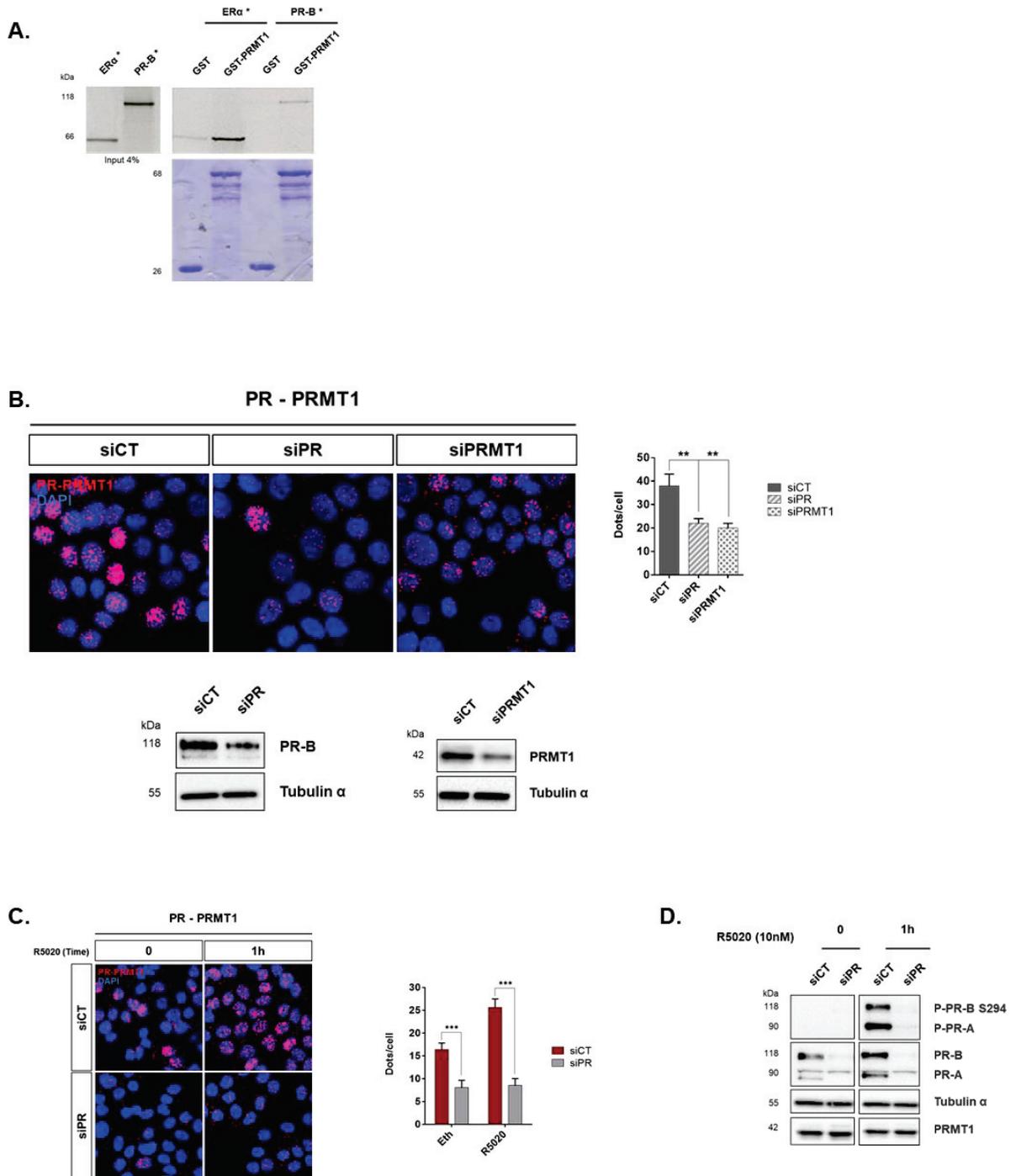
1 Université Lyon 1, F-69000, Lyon, France

2 Inserm U1052 CNRS UMR 5286, Cancer Research Center of Lyon, Centre Léon Bérard F-69008 Lyon, France

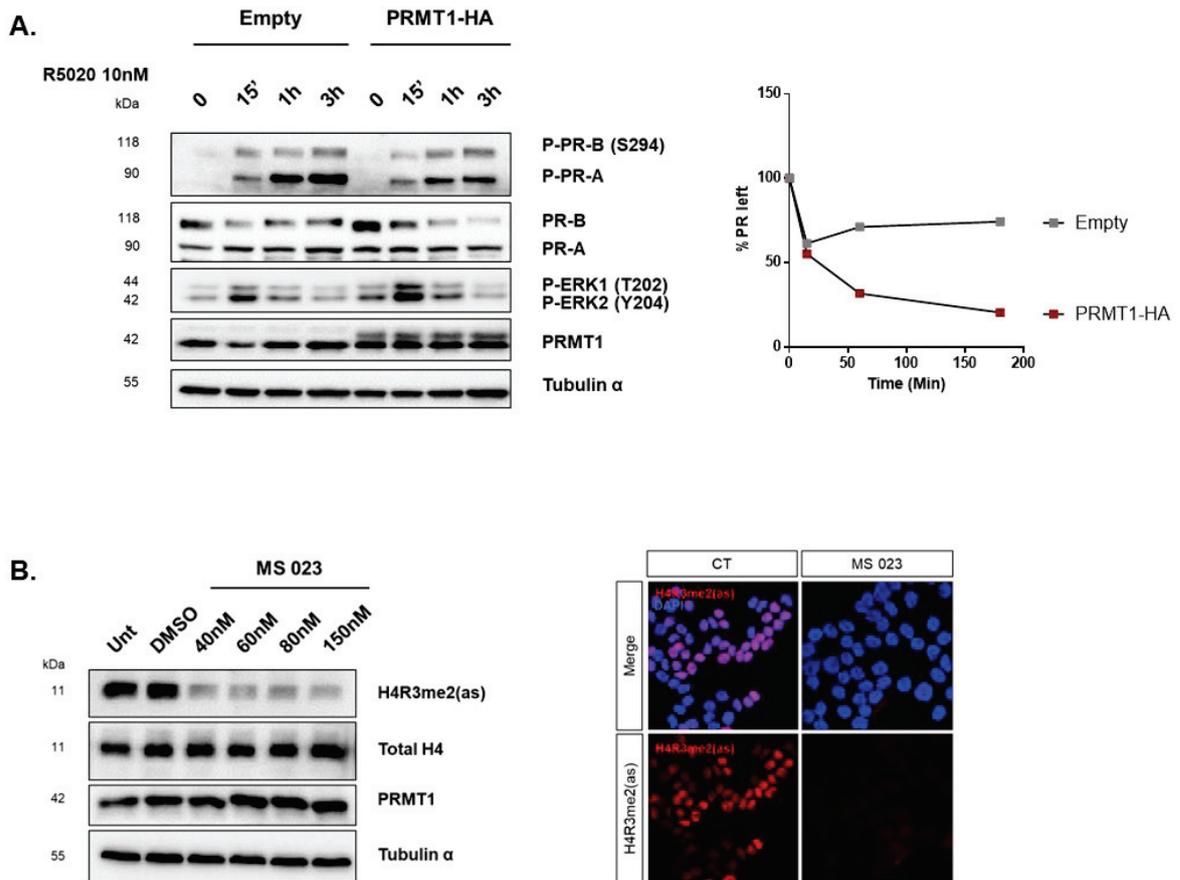
3 Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, INRA USC 1370, CNRS UMR 5242, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon cedex 07, France.

## **SUPPLEMENTAL DATA**

# Supplemental fig. 1



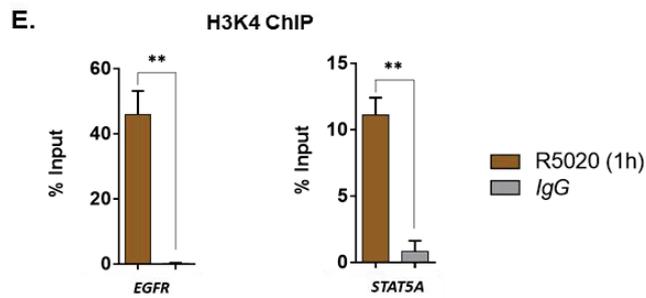
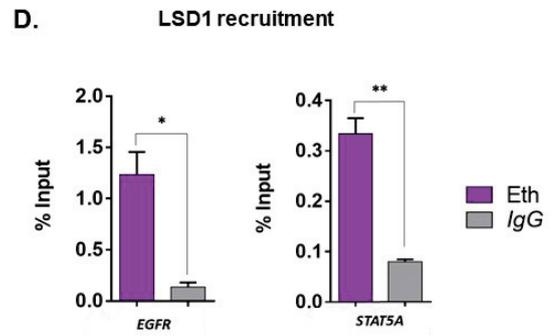
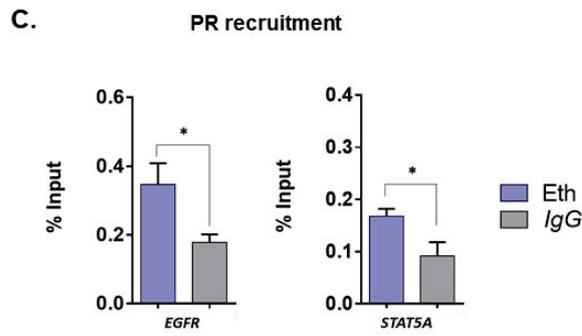
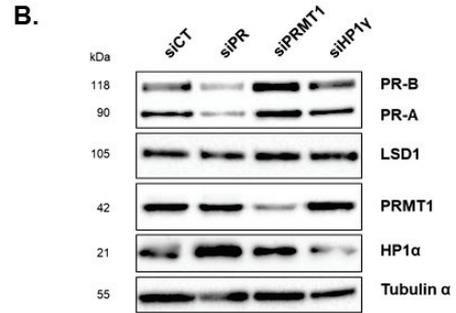
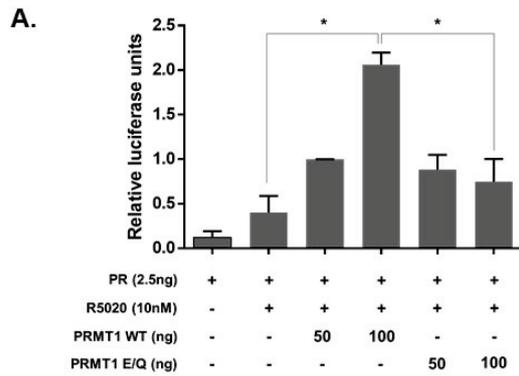
**Figure EV1, related to Fig. 1** | PRMT1 and PR interact in the nucleus of T47D breast cancer cells. **A.** Direct interaction between PR and PRMT1 was analyzed by GST-pulldown experiments.  $^{35}\text{S}$ -labeled *in vitro* translated PR-B and ER $\alpha$ , used as a positive control, were incubated with equivalent amounts of GST and GST-PRMT1 bound to glutathione-sepharose beads. The eluted proteins were analyzed by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. Autoradiograph (upper) and Coomassie staining (lower) are shown. **B-C.** Validation of the specificity of PRMT1-PR association detected by Ligation Assay (PLA). T47D were grown on coverslips in 12-well plates and transfected with siRNAs control (siCT) or against PR (siPR) or PRMT1 (siPRMT1). PLA was used to detect the cellular co-localization of endogenous PRMT1 and PR **B.** in unstimulated cells or **C.** after R5020 treatment (1h). The interactions are represented by red dots. The nuclei were counterstained with DAPI (blue) (Obj: X60). Quantification of the number of signals per cell was performed by computer-assisted analysis as reported in the Materials and Methods section and are shown in the right panels. The mean  $\pm$  SD of one experiment representative of three experiments is shown. The *P*-value was determined using the Student's t-test. \*\* indicates a  $P < 0.01$  and \*\*\* indicates a  $P < 0.001$  **D.** The effectiveness of PRMT1- and PR-siRNA treatments were analyzed by Western blot.

**Supplemental fig. 2**

**Fig. EV2 related to Fig. 2 | PRMT1 affects progesterone signaling pathway. A.** T47D cells were transiently transfected with HA-PRMT1 or empty-HA plasmids for 48h with JetPrime Reagent (Ozyme). Transfected cells were grown in charcoal-stripped medium for 48h and then stimulated with 10 nM of R5020 for the indicated times. Expression of indicated proteins were analyzed by Western blot (left panel). Quantification of PR-B band intensity for each time was measured by ChemiDoc software (Biorad) and compared to the time 0. Data are shown graphically (right panel) are representative of three independent experiments **B.** Analysis of MS023 inhibitor specificity. Left panel: immunoblot of R5020-stimulated T47D cells (1h), treated, or not (DMSO), with different quantities of MS023. Expression of indicated proteins were analyzed. Right panel:

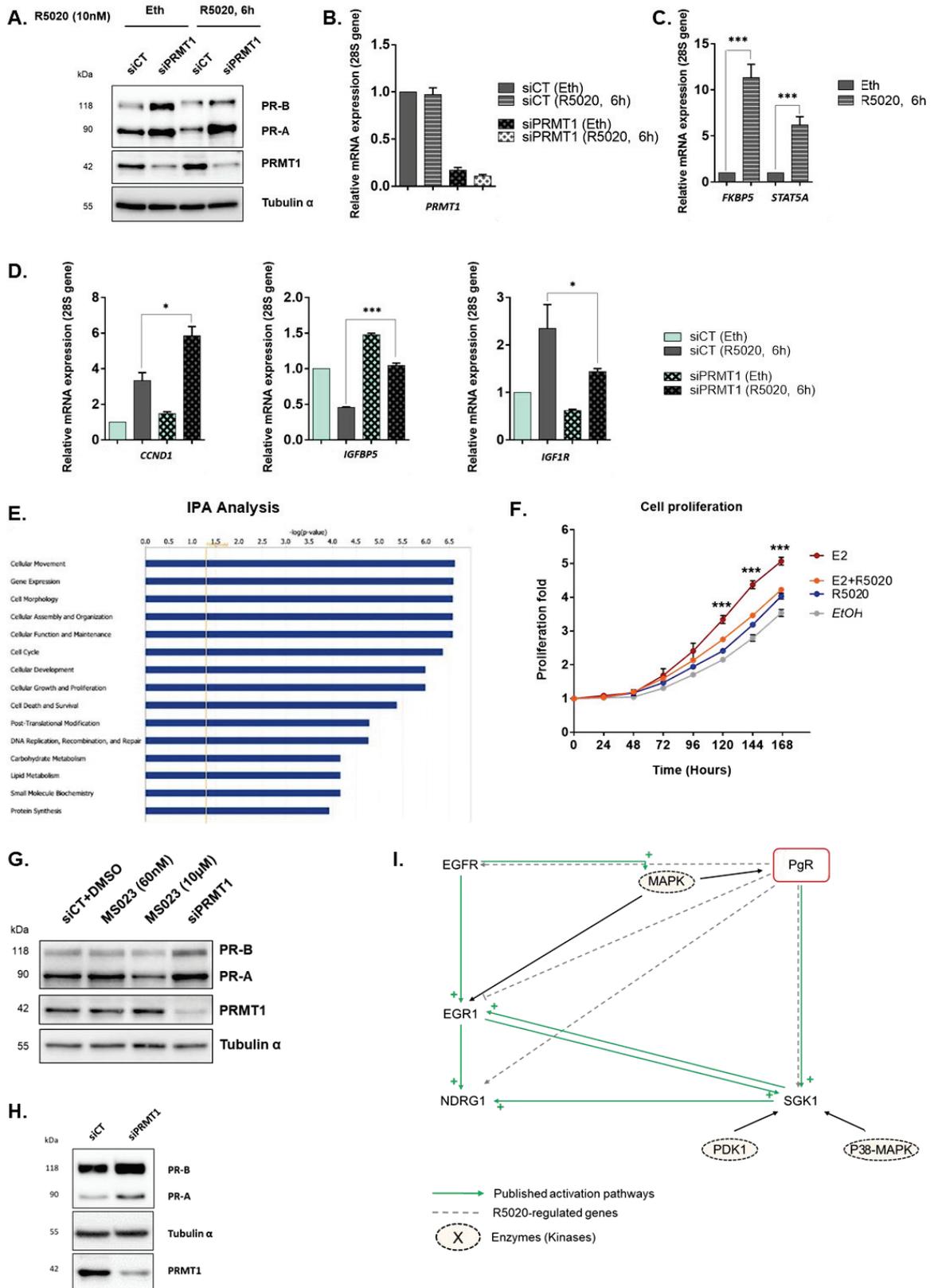
immunofluorescence of T47D cells, treated with 60 nM of MS023 and then stimulated 1h with 10 nM of R5020, using an anti-H4R3me2(as) primary antibody.

### Supplemental fig. 3

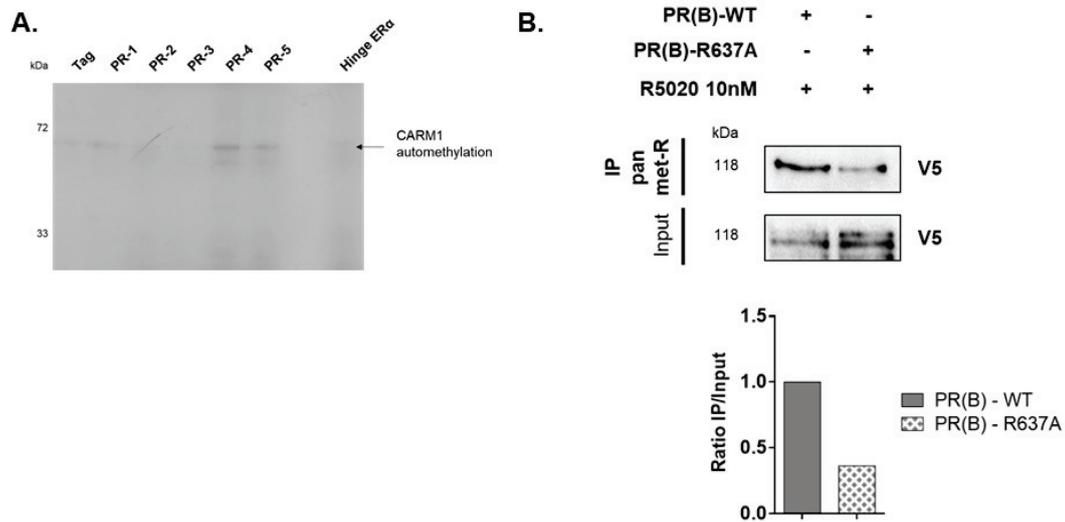


**Fig. EV3 related to Fig. 3 and Fig. 4** | PRMT1 targets the uPR-HP1 $\gamma$ -LSD1 repressive complex in nuclei of untreated-T47D cells. **A.** HeLa cells were transiently transfected with MMTV-LUC reporter plasmid and expression vectors encoding PR and wild type or mutant PRMT1 as indicated, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Transfected cells were grown in hormone-free medium for 48h in the presence or absence of 10 nM of R5020, and extracts of the harvested cells were tested for luciferase activity using the Promega luciferase assay kit. The results were normalized as indicated and presented as the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. The *P*-value was determined using the Student's *t*-test. \* indicates a *P* < 0.05. **B.** The effect of siRNA treatments on protein expression described in Fig 3D-G was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. **C-E.** Whole-cell extracts of T47D cells, grown for 48h in charcoal-stripped medium and then starved one more day in free-serum RPMI medium, were collected and subjected to ChIP using an anti-PR, an anti-LSD1 or an anti-H3K4me3 antibodies or control rabbit IgG. The precipitated DNA fragments were used for qPCR analysis using specific primers for the indicated promoters with respect to the input DNA and normalized against a reference locus (human chromosome 1 gene). The mean  $\pm$  SEM of at least three experiments is shown. The *P*-value was determined using the Student's *t*-test. \* indicates a *P* < 0.05 and \*\* indicates a *P* < 0.01.

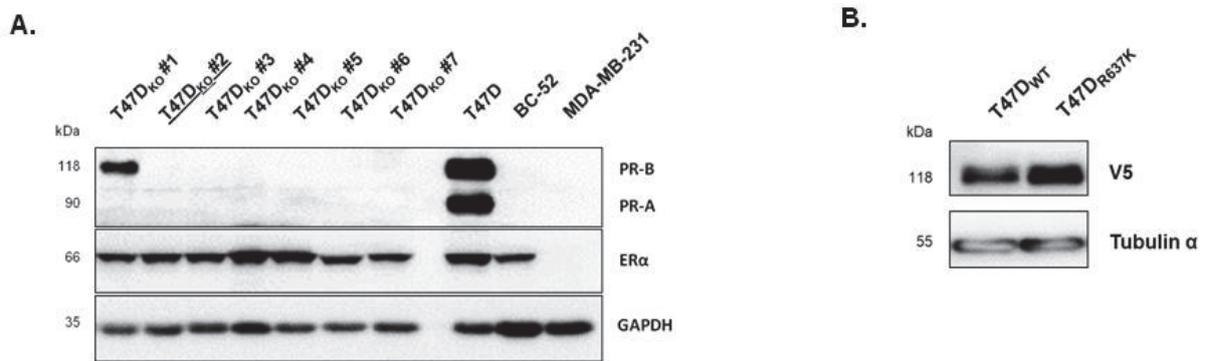
## Supplemental fig. 4



**Fig. EV4 related to Fig. 5** | PRMT1 is a transcriptional coregulator of activated PR in T47D cells. **A.** Western blot using total protein from T47D treated with either siCT or siPRMT1, and stimulated for 6h of R5020 and used for RNA-seq analysis. Western blot was performed with the indicated antibodies. **B-C.** qRT-PCRs using total mRNAs from T47D treated with either siCT or siPRMT1, and stimulated for 6h of R5020. Primers for FKBP5, STAT5A and PRMT1 genes or **D.** of the PR-target genes CCND1, IGFBP5 and IGF1R were used. The mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments is shown. The P-value was determined using the Student's t-test. \* indicated a  $P < 0.05$  and \*\*\* for a  $P < 0.001$ . **E.** Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of cellular functions for the 235 R5020-regulated genes that are dependent on PRMT1. The orange vertical line represents the fold of statistical significance. **F.** Analysis of T47D cell proliferation by Incucyte technology. Cells were grown for 48h in charcoal-stripped serum and then plated onto 96-well plates for analysis. Steroid hormones (10 nM) were added in the medium every 48h to ensure the proliferation of cells. Image acquisition and analysis were done as in Fig. 5C. The mean  $\pm$  SD of one experiment representative of three experiments is shown. The P-value was determined using the Student's t-test. \*\*\* indicates a  $P < 0.001$ . **G-H.** WB controls on T47D cells used for **F.** the Incucyte proliferation assay (Fig. 5C and Fig. EV4F) and for **G.** the wound scratch assay (Fig. 5D) are shown. **I.** Scheme of the regulation of proteins involved in migration and proliferation pathways dependent on PR, according to the literature.

**Supplemental fig. 5**

**Fig. EV5 related to Fig. 6 and 7** | PR is methylated on arginine residues in R5020-stimulated T47D breast cancer cells. **A.** An *in vitro* methylation assay was conducted by incubating different recombinant GST-PR fragments with  $^3\text{H}$ -SAM (S-adenosyl-methionine) as the methyl donor, and recombinant GST-CARM1 as the enzyme. The black arrow shows the automethylation of the enzyme. **B.** T47D cells, transfected either with V5-tagged PR-WT or -R637A encoding plasmids, were stimulated with 10 nM R5020 for 1h. Upper panel: lysates were immunoprecipitated with pan-methyl-R antibody and analyzed by immunoblot using V5 antibody. Results shown are representative of three independent experiments. Lower panel: Western-Blot quantification for the immunoprecipitated methylated PR (met-R637-PR) was determined relative to input using ChemiDoc MP (Biorad) to measure chemiluminescence from the immunoblots. Results shown are representative of three independent experiments.

**Supplemental fig. 6**

**Fig. EV6 related to Fig. 8 |** Inhibiting PR methylation decreases breast cancer cell proliferation and PR turnover. **A.** Whole-cell extracts of the different clones of T47D PR<sub>KO</sub> were collected and analyzed by western-blot for their expression of PR, using a PR-antibody, as well as ER $\alpha$ . The clone #2 (underlined) was chosen for stably re-expressing PR<sub>WT</sub> or PR<sub>R637K</sub>, as observed in experiences of Fig. 8. T47D (PR-positive cells), MDA-MB-231 and BC-52 (two PR-negative cell lines) were used as control of this experiment. **B.** Cell lysates of PR<sub>WT</sub> and PR<sub>R637K</sub>, used for the cell proliferation test shown in Fig. 8E, were collected and analyzed by western-blot for their expression of V5.

## Supplemental Material Section

- List of antibodies

Antibody	Company	Reference	Experiment					Species
			WB	IP	IF	PLA	ChIP	
EGFR	Cell Signaling / Ozyme	#4267	1:500					Rabbit
EGR1	SCBT	sc-515830	1:500					Mouse
ERK1/2	Cell Signaling / Ozyme	#4695	1:2000					Rabbit
GAPDH	SCBT	sc-4724	1:1000					Mouse
H3K4me3	Diagenode	C15410003					4µg	Rabbit
H3K9me3	ActiveMotif	#39161				1:1000		Rabbit
H4 total	Cell signaling	#13919	1:1000					Rabbit
H4R3me2(as)	ActiveMotif	#39705	1:500		1:1000			Rabbit
HP1γ	Abcam	ab10480		2µg				Rabbit
HP1γ	Abcam	ab66617	1:500			1:500		Rabbit
IgG	Cell Signaling / Ozyme	#2729		2µg			4µg	Rabbit
LSD1	SCBT	sc-53875	1:500			1:500		Mouse
LSD1	Cell Signaling / Ozyme	#2184					8µL	Rabbit
met-R637-PR	Home made		1:200	15µL	1:300			Rabbit
Pan-methyl-R	Cell Signaling / Ozyme	#13522	1:500	4µL				Rabbit
P-ERK1/2	Cell Signaling / Ozyme	#5726	1:2000					Rabbit
P-P38	Cell Signaling	#9211	1:500					Rabbit
P-PDK1	Cell Signaling	#3438	1:1000					Rabbit
P-PR S294	Cell Signaling / Ozyme	#13736	1:500					Rabbit
PR	SCBT	sc-7208	1:2000	2µg			4µg	Rabbit
PR	ThermoFischer	MA1-12626	1:1000		1:500	1:500		Mouse
PRMT1	Bethyl Laboratories / Euromedex	#A300-722A		2µg			4µg	Rabbit
PRMT1	Millipore / Merck	#07-404	1:2000			1:1000		Rabbit
PRMT1	Sigma / Merck	P1620	1:500			1:500		Mouse
SGK1	SCBT	sc-28338	1:300					Mouse
Tubulin α	Sigma / Merck	T6074	1:10000					Mouse
V5	Life Technologies	R920-25	1:1000					Mouse

**- List of primers**

Experiment	Target gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
RT-qPCR	<i>CCND1</i>	AAGCTCAAGTGGAACT	AGGAAGTTGTTGGGGC
	<i>CD44</i>	TTTGATTGCAGTCAACAGTC	GTTACACCCCAATCTTCATGTCCAC
	<i>EGFR</i>	GACAGGCCACCTCGTCG	CCGGCTCTCCCGATCAATAC
	<i>EGR1</i>	GGCGAGCAGCCCTACGAGC	GTATAGGTGATGGGGGGCAGTC
	<i>IGFBP5</i>	GGTTTGCCTCAACGAAAAGA	CGGTCCTTCTCACTGCTTC
	<i>IGF1R</i>	TGTCCAGGCCAAAAACAGGA	CGGGTTCACAGAGGCATACA
	<i>FKBP5</i>	GGATATACGCCAACATGTTCAA	CCATTGCTTTATTGGCCCTCT
	<i>NDRG1</i>	GGCAACCTGCACCTGTTCAAT	TGAGGAGAGTGGTCTTTGTTGGGT
	<i>PGR</i>	TGCCTGAAGTTTCGGCCAT	CGCCAACAGAGTGCCAAGA
	<i>PRMT1</i>	CGCCTCTGAAGAAGTGTCTCT	GATGCCAAAGTGTGCGTAGG
	<i>STAT5A</i>	AAGCCCACTGGAATGATGG	GGAGTCAAACCTCCAGGCCGA
	<i>SGK1</i>	CATAGGAGTTATTGGCAAT	CTTCCATCTCACTAACCA
	<i>28S</i>	CGATCCATCATCCGCAATG	AGCCAAGCTCAGGCCAAC
	ChIP-qPCR	<i>EGFR +1960</i>	GAATCTCTGGACTCTGTTCTCAGGTA
<i>FKBP5 - PRE</i>		TAATAGAGGGGCGAGAAGGCAGA	GGTAAGTGGGTGTGCTCGCTCA
<i>STAT5A +6896</i>		GGACTACTGTGAATTGGCTCGT	GCTTTCTGTTCTGTTCCCTGA
<i>hChr1 NG2</i>		CGGGGGTCTTTTTGGACCTT	GAAACACGGCTGCCAGAAAC
Plasmids	PR-1	GATATCTGACTGAGCTGAAGGCAAGG	CTCGAGTTACTGCTCCACCAGGGCGAC
	PR-2	GATATCTGGACGCGCCGATGGCGCCC	CTCGAGTTATGGGCTCGGCTGCTC
	PR-3	GATATCTGCAATACAGCTTCGAGCATTACC	CTCGAGTTACTTTTTAAATTTTCGACC
	PR-4	GATATCTGTTCAATAAAGTCAGAGTTG	CTCGAGTTATGGTGAATCAACTG
	PR-5	GATATCTGCTGATCAACCTGTTAATGAG	CTCGAGTTACTTTTTATGAAAGAGAAGG
	PR3-R637A	GCTGGCATGGTCCTTGGAGGTGCAAAATTTAAAAAGTAACTCGAG	
	PR-R637K	CAGGCTGGCATGGTCCTTGGAGGTAAAAATTTAAAAAGTCAATAAAGTC	GACTTTATTGAACTTTTTAAATTTTTTACCTCCAAGGACCATGCCAGCCTG

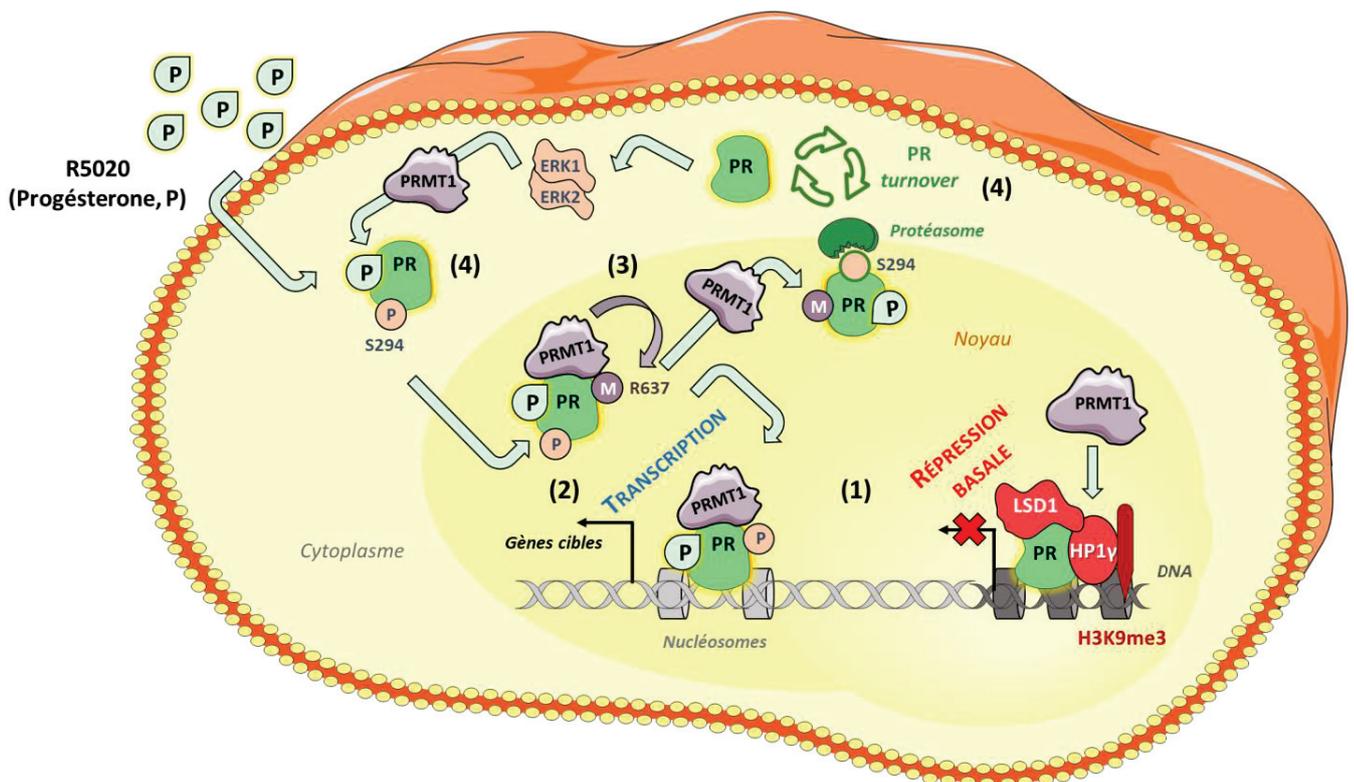
- **List of regulated genes found by RNA-Seq**

**DISCUSSION**  
**GÉNÉRALE ET**  
**PERSPECTIVES**



## Conclusions générales

L'étude que nous avons menée sur l'impact de PRMT1 et de son activité sur la signalisation du récepteur à la progestérone dans les cellules de cancer du sein T47D, a permis d'apporter différentes conclusions : (1) PRMT1 est recrutée dans des complexes protéiques impliqués dans la régulation de gènes cibles de PR, avec et sans hormone ; (2) Il agit comme un corégulateur transcriptionnel de PR, spécifique d'un ensemble de gènes dépendants de la progestérone, et notamment impliqués dans la prolifération et la migration cellulaires ; (3) La région *hinge* du récepteur est méthylée par l'enzyme sur l'arginine 637 *in vitro* et *in cellulo* ; (4) La méthylation de PR régule la stabilité du récepteur et son *turnover* protéique, probablement en impliquant la phosphorylation de PR. Ainsi, PRMT1 apparaît comme un nouveau modulateur important de l'activité transcriptionnelle du récepteur de la progestérone dans les cellules de cancer du sein (**figure 47**).



**Figure 47:** PRMT1, un nouveau modulateur de l'activité de PR.

Modèle du rôle de PRMT1 dans l'activité de PR. **(1-2)** PRMT1 se lie au récepteur dans le noyau et participe à la régulation transcriptionnelle de gènes cibles, avec et sans hormone. **(3)** L'enzyme méthyle PR sur l'arginine 637 de la région *hinge*, la forme méthylée est retrouvée dans le noyau des cellules. **(4)** Cette modification joue un rôle dans la stabilité du récepteur et dans son *turnover*, en intervenant probablement dans la phosphorylation du récepteur et donc dans son signal de dégradation par la protéasome.

## **Discussions et perspectives**

Notre équipe se focalise depuis de nombreuses années maintenant sur l'impact des modifications post-traductionnelles des récepteurs hormonaux dans le cancer du sein, ainsi que sur le rôle des PRMTs dans la signalisation tumorale (Choucair et al., 2019; Le Romancer et al., 2008; Poulard et al., 2012). En effet, *Le Romancer et al.* ont démontré que la méthylation d'ER $\alpha$  sur l'arginine 260 était nécessaire à la mise en place de la voie non génomique du récepteur. Cette voie est activée par les œstrogènes mais aussi par des facteurs de croissance comme l'IGF-1 (*Insulin-like Growth factor*). *Choucair et al.* ont mis en évidence par la suite que PRMT1 interagissait avec le récepteur membranaire de ce facteur (IGF-1R). La stimulation par IGF-1 active PRMT1, qui induit la méthylation du récepteur à l'œstrogène. Tous ces effets sont cytoplasmiques et corrèlent à l'activité non-génomique du récepteur aux œstrogènes.

L'étude que nous avons réalisée ici nous a permis de démontrer des fonctions novatrices pour PRMT1 dans la signalisation hormono-dépendante du cancer du sein, *via* des actions nucléaires, et impactant le récepteur de la progestérone.

### **1) PRMT1 est un corégulateur transcriptionnel spécifique de gènes cibles de PR.**

Pour commencer, nous avons démontré que l'interaction entre PRMT1 et le récepteur de la progestérone était nucléaire, et que PRMT1 était retrouvée sur les promoteurs des gènes cibles de PR que nous avons testés (STAT5A, EGFR, BCL-X et FKBP5). De plus, l'addition de l'hormone augmente le recrutement de l'enzyme sur ces sites (Fig. 1B et Fig.4A). PRMT1 étant décrite comme un coactivateur général de la transcription de récepteurs nucléaires (Koh et al., 2001), nous avons analysé l'expression des gènes cibles de PR lorsque l'expression de PRMT1 est éteinte. De manière intéressante, nous avons observé une régulation différente des taux d'ARNs messagers et l'existence de trois groupes distincts de gènes. En effet, l'inhibition de PRMT1 par si-ARN entraîne, soit l'augmentation de la transcription des cibles, soit une diminution, soit ne l'affecte pas. L'analyse à grande échelle par séquençage des ARNs de cellules T47D traitées 6h à l'agoniste R5020 et inhibées pour l'expression de PRMT1 a permis de confirmer cette observation à l'échelle du génome (Fig. 4C et 5A). Nous mettons donc en évidence, d'une part que PRMT1 n'est pas qu'un coactivateur de PR, mais plutôt un corégulateur puisqu'elle est capable également d'induire la répression de gènes, et d'autre part, que son impact n'est pas général puisque l'expression de certaines cibles, comme FKBP5, est indépendante de l'enzyme. C'est à notre connaissance la première fois que PRMT1 est décrite comme capable de réprimer l'activité transcriptionnelle d'un récepteur stéroïdien.

Cette fonction contraste en effet avec sa capacité de di-méthyler asymétriquement H4R3, une marque d'activation de la transcription bien connue (Wang et al., 2001). Or, nous avons également mis en évidence la participation de PRMT1 au sein d'un complexe multi-protéiques, décrit pour réprimer l'expression d'environ 20% de gènes cibles de PR en absence d'hormone. Associée notamment à LSD1 et HP1 $\gamma$ , PRMT1 interagit avec PR non lié (uPR) et ses partenaires au niveau de promoteurs décrits comme basalement réprimés (Fig. 3). Ce complexe, noté LSD1.com, utilise la capacité de « facteur pionnier » de PR pour se lier aux sites génomiques du récepteur et empêche l'activation de la transcription des gènes en bloquant notamment le recrutement d'enzymes impliquées dans l'ouverture de la chromatine, comme NURF et BAF (Vicent et al., 2013). La capacité de PR, non activé par son hormone, à exécuter un programme d'expression génique spécifique, fait écho à la découverte de Thornton sur l'existence d'un récepteur stéroïdien ancestral qui fonctionnait de manière indépendante du ligand (Thornton, 2001). L'étude de Beato a permis d'apporter des preuves sur la véracité de cette hypothèse phylogénétique et a surtout démontré que cette signalisation hormono-indépendante était essentielle dans l'activité nucléaire du récepteur (Nacht et al., 2016b).

Au vu de nos résultats, PRMT1 joue un rôle plutôt structural au sein de ce complexe répressif. Premièrement, il semble peu probable que son rôle ici soit de di-méthyler H4R3, qui est une marque activatrice sur la chromatine (Li et al., 2010). De plus, notre étude montre que PR est méthylé dans les cellules, majoritairement après activation par son hormone (Fig. 6G), concordant avec l'hypothèse que PRMT1 soit recrutée dans ce complexe répressif pour participer à sa structure plutôt que pour agir en tant qu'enzyme. Enfin, nous avons observé par PLA que l'interaction entre PR et HP1 $\gamma$ , association qui ancre le complexe LSD1.com sur la chromatine, est significativement augmentée après délétion de PRMT1 par si-ARN (Fig. 3G). Par ailleurs, *Vicent et al.* ne démontrent aucune activité pour LSD1 et HDAC1/2 dans ce complexe, mis à part que leur présence est associée à la répression (Vicent et al., 2013). Néanmoins, par leurs propriétés enzymatiques, leur rôle sur ces promoteurs réprimés semble évident. L'acétylation est généralement associée à l'activation, ainsi, la présence de la déacétylase HDAC1/2 est cohérente avec la répression induite par le complexe. De plus, LSD1 déméthyle préférentiellement H3K4, une marque bien connue d'activation. L'activité de PRMT1 dans un complexe de répression transcriptionnel est à première vue moins évidente.

Or, de préalables études ont déjà décrit des rôles de répresseur génique pour cette PRMT (Lafleur et al., 2014; Yang and Bedford, 2013). Nos données sont cohérentes avec cette idée, puisque 43% des gènes indépendants de la progestérone sont réprimés transcriptionnellement par PRMT1 dans les cellules T47D, d'après notre analyse à grande échelle (données non montrées). L'analyse de *Gene Ontology* par le logiciel d'analyse GOrilla

révèle notamment un enrichissement de gènes impliqués dans le métabolisme d'ARN mais aussi dans la régulation de la transcription par l'ARN Polymérase II. La présence de PRMT1 au sein de ce complexe LSD1.com sur la chromatine n'est donc pas aberrante. D'autant plus qu'une étude, parue dans *Molecular Cell* en 2003, a démontré que PRMT1 régulait négativement l'activité de l'ARN Pol II et l'activation de la transcription en aval, en méthylant un facteur nécessaire à l'activité de l'enzyme (SPT5). SPT5 est associée à la forme non phosphorylée du CTD et sa phosphorylation, ainsi que celle de l'enzyme, le convertit en un stimulateur de l'élongation transcriptionnelle, une fois que les facteurs généraux de transcription sont dissociés (cf. page 53). Sa méthylation par PRMT1 réduit sa capacité d'interaction avec l'ARN Pol II et constitue donc un frein à l'activité de l'enzyme sur la transcription génique (Kwak et al., 2003). PRMT1 pourrait donc participer à la répression induite par le complexe LSD1.com en méthylant des facteurs qui pourraient bloquer la liaison ou l'activité de l'ARN Pol II.

## **2) PRMT1 contrôle la prolifération des cellules, notamment en méthylant PR.**

L'implication de PRMT1 dans la prolifération des cellules tumorales mammaires a déjà été préalablement reportée et ce, dans plusieurs modèles (cancer triple négatif, luminal, etc.). Nos résultats concordent donc avec la littérature (pour revue : Morettin et al., 2015). L'ensemble de ces études a mis en avant différents mécanismes par lesquels PRMT1 régule ce processus (régulation de l'EMT, sensibilisation des cellules à une thérapie ou encore par l'expression spécifique de son isoforme PRMT1v2). Par notre présente étude, nous démontrons un nouveau mode de régulation utilisé par PRMT1.

Nous avons inhibé l'expression de PRMT1 par si-ARN dans des cellules déprivées en facteurs de croissance, cytokines et hormones stéroïdiennes pendant 48h (par utilisation de *charcoal-stripped fetal bovine serum*). Nous avons ensuite stimulé ces cellules toutes les 48h par 10 nM de progestérone afin d'activer, spécifiquement, le récepteur PR, et nous avons analysé leur prolifération par Incucyte. Nous avons démontré que l'absence de PRMT1 réduit significativement la capacité proliférative des cellules T47D (Fig. 5C). De plus, l'analyse des transcrits par RNA-Séq a mis en avant que PRMT1 régule positivement des gènes impliqués dans ce phénotype, comme EGFR et EGR1 par exemple (Fig. 5E et 5F). Ces résultats rappellent l'activité de coactivateur transcriptionnel de PRMT1. Plusieurs hypothèses peuvent alors être avancées quant aux mécanismes par lesquels l'enzyme agit. Son impact peut être dépendant de son rôle sur la chromatine, par di-méthylation des histones H4R3, par induction d'autres modifications activatrices des queues d'histones ou par recrutement de complexes activateurs type p300, SRC-1, etc.) (Kraus and Wong, 2003; Wang et al., 2001).

Une autre hypothèse envisageable est que PRMT1 puisse directement contrôler l'activité nucléaire de PR, par sa capacité de méthyler des protéines non-histones. L'expertise de notre équipe dans les modifications post-traductionnelles des récepteurs hormono-dépendants nous a poussé à tester cette idée en premier. Par essais de méthylation *in vitro*, nous avons montré que PRMT1 ciblait l'arginine 637, localisée dans la région *hinge*, à la limite avec le domaine de liaison à l'ADN (**figure 46**). Nous avons retrouvé cette modification dans les cellules activées par la progestérone (Fig. 6G). Afin d'en apprendre plus sur la relevance de cette nouvelle modification post-traductionnelle du récepteur dans les cellules tumorales, nous avons établi une lignée stable T47D dans laquelle le gène *PgR* a été éteint par CRISPR-Cas9 puis remplacé par une version codant la forme mutée du récepteur R637K (T47D<sub>R637K</sub>), où le récepteur n'est plus méthylable. L'analyse de ces cellules a montré que, d'une part, elles répondent à la progestérone en induisant la phosphorylation du récepteur, mais d'autre part, que l'incapacité de méthylation du récepteur entraîne une diminution de la quantité des cibles EGFR et EGR1, associée à une baisse significative de la prolifération cellulaire, comparées aux T47D<sub>WT</sub> (Fig. 8D et 8E). Ainsi, en méthylant PR, PRMT1 module directement l'activité du récepteur, un acteur clé dans la prolifération des cellules tumorales hormono-dépendantes.

Dans un souci d'efficacité, nous avons fait le choix de ne ré-exprimer que l'isoforme PR-B dans les cellules stables T47D<sub>WT</sub> et T47D<sub>R637K</sub>. En effet, l'établissement de ces lignées est chronophage et nous voulions avoir le temps d'analyser les effets de cette mutation *in cellulo*. Nous avons donc choisi de nous concentrer sur l'isoforme responsable de la majorité de la signalisation de PR dans les cellules du sein, à savoir PR-B, en nous basant sur les études préalablement réalisées (Briskin, 2013; Mulac-Jericic et al., 2003). Cette option nous a permis de mettre en évidence que la méthylation de l'Arg-637 est importante dans la régulation de la signalisation nucléaire de PR-B dans les cellules tumorales mammaires. Or, les études s'intéressant aux différences fonctionnelles des deux isoformes PR-A et PR-B ont démontré des régulations géniques différentes, par leur capacité à lier des corégulateurs distincts ou à reconnaître les sites de liaison à l'ADN différents (cf. page 92) (Singhal et al., 2017). Notamment, il a été démontré que PR-A joue un rôle de répresseur sur l'activité de PR-B, en partie dû au domaine inhibiteur N-terminal qui n'est apparent et fonctionnel que sur l'isoforme le plus court (**figure 29**). L'analyse de la prolifération des cellules T47D, comparées à celle des T47D<sub>WT</sub> (dans lesquelles seul PR-B est exprimé), a révélé que ces dernières prolifèrent plus que la lignée originale (données non montrées). Ceci peut s'expliquer par l'absence de PR-A et de son rôle inhibiteur sur la signalisation de PR-B.

Il nous paraît donc intéressant d'établir de nouvelles lignées stables T47D<sub>WT</sub> et T47D<sub>R637K</sub>, dans lesquelles PR-A serait co-exprimé avec PR-B, et d'analyser si sa présence modifie le phénotype des cellules.

### 3) PRMT1 est impliquée dans la stabilité du récepteur.

Dans un second temps, après avoir identifié la méthylation de PR et le résidu ciblé, nous avons cherché à décrypter par quel(s) mécanisme(s) la modification, et PRMT1, contrôlaient la transcription des gènes cibles, notamment ceux liés à la régulation de la prolifération. Les modifications post-traductionnelles de PR contrôlent des processus divers et variés : la dimérisation, la liaison à l'ADN, les interactions protéiques, la stabilité, etc. (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014). Aucun évènement de méthylation d'arginines n'a pour l'heure été reporté sur PR. De plus, l'arginine 637, un résidu conservé dans la famille des récepteurs stéroïdiens, est méthylée par PRMT1 sur ER $\alpha$  mais cette modification est impliquée dans la voie non-génomique du récepteur, ce qui ne corrèle pas avec les effets nucléaires dépendants du si-PRMT1 que nous observons dans la signalisation de la progestérone (Hill et al., 2012; Le Romancer et al., 2008). Nous n'avions donc pas d'indications préalables quant au rôle de la méthylation de R637 sur PR.

L'établissement de la lignée stable T47D<sub>R637K</sub> a mis en évidence que ce résidu était impliqué dans la stabilité du récepteur. En effet, ces cellules expriment plus fortement le récepteur, et ce même en absence d'hormone, comparées aux cellules T47D<sub>WT</sub> (Fig. 8A et 8C). L'établissement de ces deux lignées ayant été fait simultanément et de la même manière, il nous paraît peu probable que cette différence soit due à un effet d'expérimentation. De plus, une fois activé par l'hormone, le récepteur PR<sub>R637K</sub> est stabilisé, comme le souligne la figure 8B. En réponse à son ligand, le récepteur nucléaire est recyclé (dégradé) pour permettre une signalisation contrôlée (pour revue : Nawaz and O'Malley, 2004). Dans le cas de PR, la stimulation au R5020 induit, entre autres, l'activation par phosphorylation des kinases ERK1/ERK2 (Fig. 2A et 2B). Ces dernières phosphorylent PR sur le résidu 294 (Fig. 2A et 2B) et cette modification constitue un signal de dégradation, reconnu par la voie du protéasome dépendante de l'ubiquitination préalable du récepteur (Lange et al., 2000). Après traitement au progestatif, les cellules PR<sub>WT</sub> induisent l'activation rapide et transitoire des kinases ERK1/2, puis la phosphorylation du récepteur (Fig. 8C) et enfin, après 6h de traitement, une dégradation progressive de la protéine, puisque seulement 30% des PRs sont encore présents (Fig. 8B). D'après *Lange et al.*, l'inhibition de l'activité du protéasome ou de la phosphorylation des MAPKs empêche la formation des formes ubiquitinées de PR et, à terme, sa dégradation.

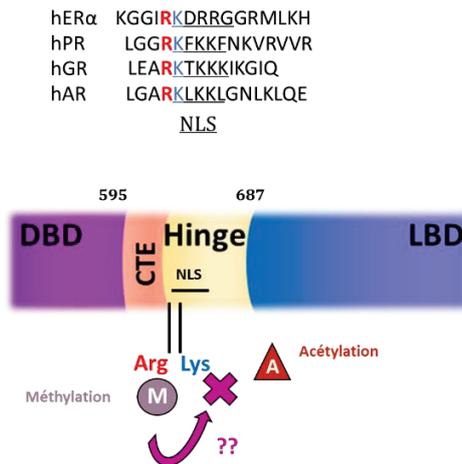
Dans les cellules PR<sub>R637K</sub>, l'activation des kinases ERK1/2 est réduite et le *turnover* de PR est fortement impacté, car près de 90% des récepteurs sont encore présents après 6h de stimulation hormonale (Fig. 8B). Nous retrouvons ces deux mêmes troubles de la signalisation avec l'inhibition de PRMT1 par si-ARN dans les cellules T47D, appuyant l'hypothèse selon laquelle l'enzyme régule la stabilité du récepteur, en le méthylant.

Le recyclage du récepteur stéroïdien est étroitement corrélé à son activité. L'utilisation de l'inhibiteur du protéasome MG132 empêche la transcription médiée par ER $\alpha$ , mais aussi par TR et par PR (Lonard et al., 2000). Plus spécifiquement, la stabilisation de PR par des inhibiteurs d'ubiquitination et/ou par des inhibiteurs de phosphorylation de la voie MAPK induit une transcription hyper-activée et non contrôlée (Shen et al., 2001). Dans notre étude, nous avons noté que PR est hyper-phosphorylé lorsque PRMT1 est inhibée par si-ARN, et le résultat est similaire dans les cellules PR<sub>R637K</sub> comparées aux cellules PR<sub>WT</sub> (Fig. 2 et 8C). Ces observations confirment que PRMT1, par son implication dans le *turnover* protéique de PR, régule son activation transcriptionnelle. De plus, l'analyse de cibles impliquées dans la prolifération comme EGFR et EGR1 sont impactées dans les cellules où PR est stabilisé (T47D<sub>siPRMT1</sub> et T47D<sub>R637K</sub>), renforçant l'existence d'un lien fonctionnel entre phosphorylation, stabilité et activité du récepteur, lien modulé par PRMT1 (**figure 47**).

L'impact de la méthylation de l'Arg-637 sur l'activité nucléaire du récepteur n'est pas étonnante, au vu de la localisation de ce résidu. L'arginine précède le signal de localisation nucléaire (NLS) dans la région *hinge*, à la frontière avec le DBD (**figure 18**). Cette région charnière est notamment impliquée dans la liaison à l'ADN, dans la localisation nucléaire ou encore dans les interactions avec des corégulateurs (cf. page 69) (Tetel et al., 1997). Les lysines du NLS (K638-K641, cf. **figures 44 et 48**) sont essentielles à la fonction appropriée du signal, à savoir l'entrée du récepteur dans le noyau, pour lui permettre d'agir en tant que facteur de transcription. Ces lysines sont acétylées en réponse à la progestérone et cette modification contrôle la localisation nucléaire du récepteur, ainsi que sa phosphorylation (Daniel et al., 2010). Il est intéressant de noter que les mutants non acétylables (PR<sub>K-A</sub>) présentent une activation transcriptionnelle défectueuse et sont plus stables que les récepteurs sauvages. De plus, de précédentes études ont montré que les mutations des résidus R637 et K638 du motif conservé RKXKK entraînent une diminution de la liaison de PR sur la chromatine, et les résultats sont similaires pour AR (Roemer et al., 2006).

Ainsi, une piste d'étude intéressante serait la relation fonctionnelle entre méthylation et acétylation du motif NLS. Au vu de la proximité proche entre l'Arg-637 et les lysines acétylées, on peut imaginer que la méthylation, qui apporte au résidu une charge hydrophobe conséquente, masque la lysine adjacente (Lys-638).

Le mutant non-acétylable présentant un phénotype proche de celui de notre mutant non-méthylable (stabilité, phosphorylation perturbée, troubles dans la transcription), il serait pertinent d'étudier la cinétique du dépôt des marques pour voir si l'Arg-637 est méthylée en première et empêche l'acétylation de la Lys-638. Cette hypothèse serait un début de réponse pour expliquer les effets majeurs induits par ces modifications post-traductionnelles sur l'activité nucléaire du récepteur PR.



**Figure 48:** Un lien entre méthylation et acétylation du NLS de PR ?

A la recherche des mécanismes responsables de ce phénomène, il est tentant de supposer que les effets de PRMT1 sur la stabilité PR peuvent être régulés par le *cross-talk* entre phosphorylation et ubiquitination (cf. page 119). En effet, notre laboratoire avait précédemment montré que PRMT1 interagissait physiquement avec le complexe CCR4-NOT, *via* la sous-unité CAFv2 (CNOT7 v2), régulant l'activité de la méthyltransférase PRMT1 (Chapat et al., 2017; Robin-Lespinasse et al., 2007). De plus, CNOT4, une sous-unité du complexe CCR4-NOT, s'est révélée être une ligase E3 et des données récentes ont montré qu'une protéine de liaison à l'ARN, RBM15, est méthylée par PRMT1, ce qui active son ubiquitination et sa dégradation par CNOT4 (Zhang et al., 2015). Dans les études futures, il sera intéressant d'étudier si PRMT1 méthyle et induit la dégradation du récepteur à la progestérone par le recrutement de la E3 ligase CNOT4.

#### 4). PRMT1, un intermédiaire clé dans la relation ER $\alpha$ -PR des cellules mammaires ?

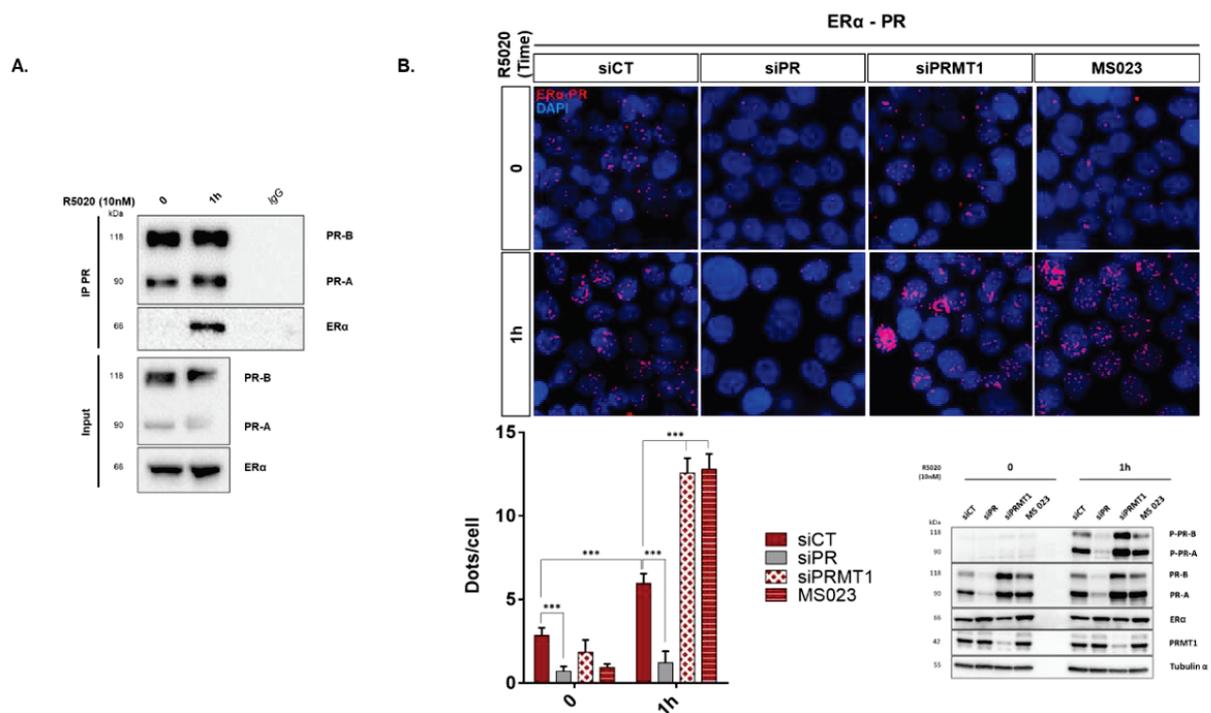
Les hormones stéroïdiennes ovariennes, œstrogènes et progestérone, sont des régulateurs centraux dans le développement du sein normal et jouent aussi un rôle dans le cancer du sein.

La relation de cause à effet entre les hormones et le cancer du sein est illustrée notamment par le fait que l'âge des premières règles, des grossesses ou encore de la ménopause impactent considérablement le risque d'apparition du cancer, et que l'ablation des ovaires réduit ce risque. Paradoxalement, la présence de leur récepteur respectif, ER $\alpha$  et PR (dans 75% des cancers du sein), est un biomarqueur de bon pronostic et leur expression reste le principal marqueur prédictif de la réactivité endocrinienne. Les agents thérapeutiques qui ciblent la signalisation des œstrogènes, et par conséquent celle de la progestérone, restent les traitements les plus efficaces pour lutter contre la progression des cancers ER $\alpha$ + / PR+ (pour revue : Hilton et al., 2018). En raison de son rôle clairement établi dans la prolifération et la croissance tumorales dans le sein, la signalisation de l'œstrogène est depuis longtemps une cible thérapeutique attractive.

À l'inverse, l'attention portée aux progestatifs en tant que thérapie a considérablement diminué depuis des années. Cependant, un ensemble d'études rapporte un rôle protecteur de cette hormone, notamment par sa capacité à contrecarrer les effets prolifératifs des œstrogènes dans le sein (pour revues : Carroll et al., 2017; McGuire et al., 1985). L'étude de *Mohammed et al.* a mis en lumière un mécanisme sous-jacent de l'effet inhibiteur des progestatifs sur la croissance tumorale mammaire. Cela implique la redistribution du complexe transcriptionnel d'ER $\alpha$  sur la chromatine, relocalisation dirigée par PR. Ce dernier permet la séquestration du récepteur aux œstrogènes de ses cibles pro-prolifératives, ce qui bloque la croissance (Mohammed et al., 2015). Un fait particulièrement intéressant dans ce mécanisme est la dépendance de la présence de la progestérone. En effet, PR doit être activé pour être capable d'inhiber la fonction proliférative d'ER $\alpha$ . D'après nos résultats, PR est méthylé quand il est activé ; de plus, PRMT1 est un corégulateur transcriptionnel connu de PR, et d'ER $\alpha$  également (Green and Carroll, 2007). Au vu de l'importance de cette enzyme sur le contrôle de l'activité nucléaire des récepteurs stéroïdiens, un rôle de PRMT1 dans le *crossstalk* entre ER $\alpha$  et PR n'est pas exclue, sachant d'autant plus que les deux récepteurs sont des cibles de l'enzyme.

Nos résultats préliminaires confirment une interaction entre les deux récepteurs dans les cellules T47D, interaction significativement augmentée en présence de progestérone (**figure 49**). L'analyse par PLA nous permet d'affirmer que l'interaction est majoritairement nucléaire. De plus, l'inhibition de l'expression de PRMT1 et/ou de son activité révèle que l'interaction ER $\alpha$ -PR est significativement augmentée, et ce toujours dans le noyau (**figure 49B**). Cet effet de PRMT1 semble donc dépendant de la méthylation. L'approfondissement de l'idée selon laquelle PRMT1 puisse être un partenaire important de PR dans la relocalisation du complexe d'ER $\alpha$  nécessite d'autres expériences.

Il faudrait dans un premier temps analyser si l'absence de PRMT1 perturbe la capacité de PR à relocaliser ER $\alpha$  sur de nouveaux promoteurs. Dans la même idée, il nous paraît judicieux d'analyser si une perte de l'expression de l'enzyme perturbe la transcription des gènes sur lesquels le complexe se relocalise. Ayant déjà démontré l'implication de PRMT1 dans la transcription dépendante de PR, un rôle de cette enzyme dans le *crossstalk* nucléaire entre ER $\alpha$  et PR s'avère très plausible et soulève, à notre sens, un grand intérêt dans l'avancée de la compréhension des cancers du sein hormono-dépendants. En effet, PRMT1 est impliquée dans la prolifération et la survie des cellules tumorales mammaires, et notamment en contrôlant la signalisation des récepteurs.



**Figure 49:** PRMT1 est impliquée dans l'interaction entre ER $\alpha$  et PR.

**A.** Co-Immuno-précipitation de PR dans des cellules T47D, stimulées ou non (0) à la progestérone (1h). La condition IgG sert de contrôle négatif. ER $\alpha$  est co-immunoprécipité avec PR sous stimulation hormonale. **B.** L'interaction ER $\alpha$ -PR est analysée et confirmée par PLA. Majoritairement nucléaire, elle est significativement augmentée lorsque l'expression de PRMT1 est inhibée (siPRMT1) ou que son activité est bloquée (MS023).

Inhiber PRMT1 pour bloquer ses effets délétères sur la croissance est inenvisageable, au vu de la multitude de substrats de l'enzyme et de son implication dans divers processus cellulaires. Néanmoins, moduler l'interaction ER $\alpha$ -PR en jouant sur PRMT1 et la méthylation peut être une piste intéressante. *Varricchio et al.* ont par exemple produit un peptide qui bloque spécifiquement l'interaction entre ER $\alpha$  et Src et qui induit, en aval, une inhibition de la voie Src/ERK ainsi que de l'expression de la cible Cycline D1 (*Varricchio et al., 2007*). Ce

peptide mime la région du récepteur qui interagit avec la protéine Src et se lie à elle, par compétition avec le récepteur endogène. Contrairement aux inhibiteurs de signalisation courants, il n'interfère pas avec la signalisation d'autres récepteurs. Ainsi, une meilleure caractérisation du rôle de PRMT1 dans cette interaction nucléaire entre ER $\alpha$  et PR pourrait permettre, à terme, de contrôler plus finement la croissance des cellules mammaires dans les tumeurs hormono-dépendantes.

#### **5). L'étude de la relevance de la méthylation de PR dans la physiologie *in vivo*.**

Nos résultats, démontrant l'existence de la di-méthylation asymétrique de PR dans les cellules tumorales T47D activées par la progestérone, nous poussent à envisager une suite dans le projet, visant à analyser la pertinence de cette nouvelle modification de PR dans les tumeurs mammaires.

Nous avons utilisé l'anticorps contre l'Arg-637 di-méthylée de PR (anti-met-R637-PR) dans des expériences d'immunohistochimie (IHC) sur des tumeurs PR+, mises à disposition par le service d'anatomo-pathologie du Centre Léon Bérard, et réalisées par notre collaboratrice, le Dr. Isabelle Treilleux. Cet essai fut malheureusement sans succès. Nous supposons que l'anticorps n'est pas assez concentré et/ou purifié, le signal spécifique dans les cellules étant déjà difficile à obtenir. L'absence de signal spécifique dans les IHC peut être également révélatrice d'un faible pourcentage de récepteurs PR di-méthylés dans les tumeurs. En effet, nous n'avons aucune idée de la proportion de récepteurs modifiés, que ce soit dans les cellules ou dans les tissus. De plus, nous n'avons analysé qu'une petite quantité d'échantillons (quatre tumeurs PR+, choisies aléatoirement) et il n'est pas à exclure que ces analyses aient été faites sur des tumeurs qui n'exprimaient pas assez fortement PR.

Afin d'en apprendre plus sur l'expression de la forme di-méthylée de PR *in vivo*, nous avons envisagé différentes approches. La première consiste à produire un anticorps plus spécifique, plus concentré et plus purifié, afin d'optimiser le signal en IHC. Cette option est en discussion avec notre collaborateur Covalab, producteur de l'anticorps anti-met-R637-PR. Une autre possibilité de contourner le problème de faible efficacité de l'anticorps serait de travailler dans un modèle où la méthylation de PR est amplifiée, afin d'optimiser les chances d'obtenir un signal. Le groupe de Bedford a mis au point des modèles murins dans lesquels différentes PRMTs sont surexprimées. Notamment, ils ont induit la surexpression spécifique de PRMT1 dans les glandes mammaires saines, et dans un modèle de cancer du sein, fournissant des outils précieux pour l'étude de l'enzyme mais aussi, pour celle de la méthylation de ses cibles, dont PR (Bao et al., 2018).

L'utilisation en IHC de coupes histologiques des glandes mammaires de ces souris, dans lesquelles la méthylation de PRMT1 est augmentée, pourrait nous permettre d'identifier si la forme méthylée de PR est retrouvée dans les tissus, sains et/ou tumoraux.

Enfin, outre l'IHC, le PLA peut nous permettre de visualiser la méthylation dans les tissus. En effet, nous avons mis au point dans l'équipe une méthode de PLA *in situ*, pour la détection de complexes protéiques dans des échantillons tumoraux (Poulard et al., 2014). Nous planifions dans un premier temps de mettre au point l'interaction entre PR et PRMT1, comme nous l'avons observée dans les cellules T47D. De plus, le PLA est aussi utile pour étudier une modification post-traductionnelle, en utilisant par exemple un anticorps contre le récepteur PR et un autre contre les arginines asymétriquement di-méthylées (anticorps adme-R, cf. papier, Fig. 6). Nous avons mis au point ce « duo d'anticorps » dans les cellules T47D (données non montrées) et nous souhaiterions l'essayer sur des coupes de tissus, de glandes mammaires saines et cancéreuses. Nous analyserons par la suite si l'association PR-PRMT1 et/ou la présence de la forme di-méthylée de PR dans les tumeurs sont corrélées à des facteurs pronostiques classiques (taille tumorale, grade de SBR et statut ganglionnaire).

Ces approches *in situ* peuvent être complémentaires à l'établissement d'un modèle murin, dans lequel les cellules exprimant de manière stable la mutation R637K (T47<sub>R637K</sub>) seraient injectées. Cette expérience nous permettrait d'observer si ces dernières ont la capacité d'induire la formation de tumeurs dans des souris immunodéficientes et ainsi de tester leur potentiel tumorigénique *in vivo*. Nous serions alors en mesure de confirmer, ou non, nos résultats *in cellulo*, de l'impact de la méthylation de PR sur la prolifération et la migration tumorales.

## **Références bibliographiques**

- A -

Abdel-Hafiz, H.A., and Horwitz, K.B. (2012). Control of progesterone receptor transcriptional synergy by SUMOylation and deSUMOylation. *BMC Mol. Biol.* *13*, 10.

Abdel-Hafiz, H.A., and Horwitz, K.B. (2014). Post-translational modifications of the progesterone receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *140*, 80–89.

Abramovich, C., Yakobson, B., Chebath, J., and Revel, M. (1997). A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. *EMBO J.* *16*, 260–266.

Adamopoulos, P.G., Mavrogiannis, A.V., Kontos, C.K., and Scorilas, A. (2019). Novel alternative splice variants of the human protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) gene, discovered using next-generation sequencing. *Gene* *699*, 135–144.

Albig, W., Kioschis, P., Poustka, A., Meergans, K., and Doenecke, D. (1997). Human Histone Gene Organization: Nonregular Arrangement within a Large Cluster. *Genomics* *40*, 314–322.

Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C., and Aviles, F.X. (1980). The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature* *288*, 675–679.

Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS\*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *51*, 786–794.

Annunziato, A. (2008) DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin | Learn Science at Scitable.

Archer, T.K., Cordingley, M.G., Wolford, R.G., and Hager, G.L. (1991). Transcription factor access is mediated by accurately positioned nucleosomes on the mouse mammary tumor virus promoter. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 688–698.

Archer, T.K., Deroo, B.J., and Fryer, C.J. (1997). Chromatin Modulation of Glucocorticoid and Progesterone Receptor Activity. *Trends Endocrinol. Metab.* *8*, 384–390.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 10148–10152.

Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P., and Richards, G. (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *38*, 655–662.

Aspillaga, M.O., Whittaker, P.G., Grey, C.E., and Lind, T. (1983). Endocrinologic events in early pregnancy failure. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *147*, 903–908.

Ayton, P.M., and Cleary, M.L. (2001). Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* 20, 5695.

- B -

Bachmann, I.M., Halvorsen, O.J., Collett, K., Stefansson, I.M., Straume, O., Haukaas, S.A., Salvesen, H.B., Otte, A.P., and Akslen, L.A. (2006). EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 268–273.

Baichwal, V.R., Park, A., and Tjian, R. (1992). The cell-type-specific activator region of c-Jun juxtaposes constitutive and negatively regulated domains. *Genes Dev.* 6, 1493–1502.

Baldwin, R.M., Morettin, A., Paris, G., Goulet, I., and Côté, J. (2012). Alternatively spliced protein arginine methyltransferase 1 isoform PRMT1v2 promotes the survival and invasiveness of breast cancer cells. *Cell Cycle* 11, 4597–4612.

Ballaré, C., Uhrig, M., Bechtold, T., Sancho, E., Domenico, M.D., Migliaccio, A., Auricchio, F., and Beato, M. (2003). Two Domains of the Progesterone Receptor Interact with the Estrogen Receptor and Are Required for Progesterone Activation of the c-Src/Erk Pathway in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1994–2008.

Ballaré, C., Castellano, G., Gaveglia, L., Althammer, S., González-Vallinas, J., Eyra, E., Le Dily, F., Zaurin, R., Soronellas, D., Vicent, G.P., et al. (2013). Nucleosome-Driven Transcription Factor Binding and Gene Regulation. *Mol. Cell* 49, 67–79.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120.

Bao, X., Wang, Y., Li, X., Li, X.-M., Liu, Z., Yang, T., Wong, C.F., Zhang, J., Hao, Q., and Li, X.D. (2014). Identification of “erasers” for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach. *ELife* 3.

Bao, J., Lorenzo, A.D., Lin, K., Lu, Y., Zhong, Y., Sebastian, M.M., Muller, W.J., Yang, Y., and Bedford, M.T. (2018). Mouse models of overexpression reveal distinct oncogenic roles for different type I protein arginine methyltransferases. *Cancer Res.* canres.1995.2018.

Barettino, D., Vivanco Ruiz, M.M., and Stunnenberg, H.G. (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *EMBO J.* 13, 3039–3049.

Barker, K.T., Jackson, L.E., and Crompton, M.R. (1997). BRK tyrosine kinase expression in a high proportion of human breast carcinomas. *Oncogene* 15, 799–805.

- Baumann, H., Paulsen, K., Kovács, H., Berglund, H., Wright, A.P., Gustafsson, J.A., and Härd, T. (1993). Refined solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Biochemistry* 32, 13463–13471.
- Baxevanis, A.D., Arents, G., Moudrianakis, E.N., and Landsman, D. (1995). A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucleic Acids Res.* 23, 2685–2691.
- Beato, M., and Vicent, G.P. (2011). When every minute counts: the enzymatic complexity associated with the activation of hormone-dependent genes. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 2407–2409.
- Beaudoin, C., Bonenfant, M., and Tremblay, Y. (1997). Regulation of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 isomerase type 1 and estradiol-17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase mRNA levels by calcium in human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 133, 63–71.
- Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol. Cell* 33, 1–13.
- Bedford, M.T., and Richard, S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* 18, 263–272.
- Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J., and Woodcock, C.L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 14173–14178.
- Bellance, C., Khan, J.A., Meduri, G., Guiochon-Mantel, A., Lombès, M., and Loosfelt, H. (2013). Progesterone receptor isoforms PRA and PRB differentially contribute to breast cancer cell migration through interaction with focal adhesion kinase complexes. *Mol. Biol. Cell* 24, 1363–1374.
- Berthet, C., Guéhenneux, F., Revol, V., Samarut, C., Lukaszewicz, A., Dehay, C., Dumontet, C., Magaud, J.-P., and Rouault, J.-P. (2002). Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 7, 29–39.
- Bharath, M.M.S., Chandra, N.R., and Rao, M.R.S. (2003). Molecular modeling of the chromatosome particle. *Nucleic Acids Res.* 31, 4264–4274.
- Björnström, L., and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 19, 833–842.
- Blanc, R.S., and Richard, S. (2017). Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol. Cell* 65, 8–24.

- Blanco, J.C.G., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.-J., Walker, K.K., Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y., and Ozato, K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.* *12*, 1638–1651.
- Bocchinfuso, W.P., Lindzey, J.K., Hewitt, S.C., Clark, J.A., Myers, P.H., Cooper, R., and Korach, K.S. (2000). Induction of mammary gland development in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* *141*, 2982–2994.
- Böhm, L., and Crane-Robinson, C. (1984). Proteases as structural probes for chromatin: The domain structure of histones: Review. *Biosci. Rep.* *4*, 365–386.
- Boisvert, F.-M., Déry, U., Masson, J.-Y., and Richard, S. (2005a). Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes Dev.* *19*, 671–676.
- Boisvert, F.-M., Rhie, A., Richard, S., and Doherty, A.J. (2005b). The GAR Motif of 53BP1 is Arginine Methylated by PRMT1 and is Necessary for 53BP1 DNA Binding Activity. *Cell Cycle* *4*, 1834–1841.
- Boonyaratanakornkit, V., Scott, M.P., Ribon, V., Sherman, L., Anderson, S.M., Maller, J.L., Miller, W.T., and Edwards, D.P. (2001). Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol. Cell* *8*, 269–280.
- Böttger, A., Islam, M.S., Chowdhury, R., Schofield, C.J., and Wolf, A. (2015). The oxygenase Jmjd6—a case study in conflicting assignments. *Biochem. J.* *468*, 191–202.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- $\alpha$ . *Nature* *375*, 377.
- Briskin, C. (2002). Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *7*, 39–48.
- Briskin, C., and O'Malley, B. (2010). Hormone Action in the Mammary Gland. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*.
- Briskin, C. (2013). Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 385–396.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* *84*, 843–851.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.-Å., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* *389*, 753.
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* *56*, 549–561.

- Calvo, V., and Beato, M. (2011). BRCA1 Counteracts Progesterone Action by Ubiquitination Leading to Progesterone Receptor Degradation and Epigenetic Silencing of Target Promoters. *Cancer Res.* *71*, 3422–3431.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR 75*, 50–83.
- Carroll, J.S., Hickey, T.E., Tarulli, G.A., Williams, M., and Tilley, W.D. (2017). Deciphering the divergent roles of progestogens in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 54–64.
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 Is a Histone Arginine Demethylase. *Science* *318*, 444–447. Bao, J., Lorenzo, A.D., Lin, K., Lu, Y., Zhong, Y., Sebastian, M.M., Muller, W.J., Yang, Y., and Bedford, M.T. (2018). Mouse models of overexpression reveal distinct oncogenic roles for different type I protein arginine methyltransferases. *Cancer Res.* *canres.1995.2018*.
- Chapat, C., Chettab, K., Simonet, P., Wang, P., De La Grange, P., Le Romancer, M., and Corbo, L. (2017). Alternative splicing of CNOT7 diversifies CCR4-NOT functions. *Nucleic Acids Res.* *45*, 8508–8523.
- Chapman, J.R., and Jackson, S.P. (2008). Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep.* *9*, 795–801.
- Charier, G., Couprie, J., Alpha-Bazin, B., Meyer, V., Quéméneur, E., Guérois, R., Callebaut, I., Gilquin, B., and Zinn-Justin, S. (2004). The Tudor Tandem of 53BP1: A New Structural Motif Involved in DNA and RG-Rich Peptide Binding. *Structure* *12*, 1551–1562.
- Chen, F., and Wagner, P.D. (1994). 14-3-3 proteins bind to histone and affect both histone phosphorylation and dephosphorylation. *FEBS Lett.* *347*, 128–132.
- Cheng, X., and Roberts, R.J. (2001). AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res.* *29*, 3784–3795.
- Cheung, N., Chan, L.C., Thompson, A., Cleary, M.L., and So, C.W.E. (2007). Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1208–1215.
- Cheung, P., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to Chromatin through Histone Modifications. *Cell* *103*, 263–271.
- Chlebowski, R.T., Manson, J.E., Anderson, G.L., Cauley, J.A., Aragaki, A.K., Stefanick, M.L., Lane, D.S., Johnson, K.C., Wactawski-Wende, J., Chen, C., et al. (2013). Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women’s Health Initiative Observational Study. *J. Natl. Cancer Inst.* *105*, 526–535.

- Choucair, A., Pham, T.H., Omarjee, S., Jacquemetton, J., Kassem, L., Trédan, O., Rambaud, J., Marangoni, E., Corbo, L., Treilleux, I., et al. (2019). The arginine methyltransferase PRMT1 regulates IGF-1 signaling in breast cancer. *Oncogene* 38, 4015–4027.
- Chowdhury, D., Keogh, M.-C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S., and Lieberman, J. (2005).  $\gamma$ -H2AX Dephosphorylation by Protein Phosphatase 2A Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. *Mol. Cell* 20, 801–809.
- Chung, H.H., Sze, S.K., Tay, A.S.L., and Lin, V.C.-L. (2014a). Acetylation at Lysine 183 of Progesterone Receptor by p300 Accelerates DNA Binding Kinetics and Transactivation of Direct Target Genes. *J. Biol. Chem.* 289, 2180–2194.
- Chung, H.H., Sze, S.K., Woo, A.R.E., Sun, Y., Sim, K.H., Dong, X.M., and Lin, V.C.-L. (2014b). Lysine methylation of progesterone receptor at activation function 1 regulates both ligand independent activity and ligand sensitivity of the receptor. *J. Biol. Chem.* jbc.M113.522839.
- Clark, R.J., and Felsenfeld, G. (1971). Structure of Chromatin. *Nature. New Biol.* 229, 101–106.
- Clarke, N., Arenzana, N., Hai, T., Minden, A., and Prywes, R. (1998). Epidermal Growth Factor Induction of the c-jun Promoter by a Rac Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1065–1073.
- Condon, J.C., Hardy, D.B., Kovaric, K., and Mendelson, C.R. (2006). Up-Regulation of the Progesterone Receptor (PR)-C Isoform in Laboring Myometrium by Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B May Contribute to the Onset of Labor through Inhibition of PR Function. *Mol. Endocrinol.* 20, 764–775.
- Connaghan-Jones, K.D., Heneghan, A.F., Miura, M.T., and Bain, D.L. (2008). Thermodynamic Dissection of Progesterone Receptor Interactions at the Mouse Mammary Tumor Virus Promoter: Monomer Binding and Strong Cooperativity Dominate the Assembly Reaction. *J. Mol. Biol.* 377, 1144–1160.
- Cook, J.R., Lee, J.-H., Yang, Z.-H., Krause, C.D., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. (2006). FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 472–481.
- Cork, D.M.W., Lennard, T.W.J., and Tyson-Capper, A.J. (2008). Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* 10, 207.
- Côté, J., Boisvert, F.-M., Boulanger, M.-C., Bedford, M.T., and Richard, S. (2002). Sam68 RNA Binding Protein Is an In Vivo Substrate for Protein Arginine N-Methyltransferase 1. *Mol. Biol. Cell* 14, 274–287.
- Creinin, M.D. (2000). Medical abortion regimens: historical context and overview. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183, S3-9.

Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., et al. (2004). Histone Deimination Antagonizes Arginine Methylation. *Cell* 118, 545–553.

Cutress, M.L., Whitaker, H.C., Mills, I.G., Stewart, M., and Neal, D.E. (2008). Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J. Cell Sci.* 121, 957–968.

Cutter, A., and Hayes, J.J. (2015). A Brief Review of Nucleosome Structure. *FEBS Lett.* 589, 2914–2922.

- D -

Dahmus, M.E. (1996). Reversible Phosphorylation of the C-terminal Domain of RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem.* 271, 19009–19012.

Daniel, A.R., Faivre, E.J., and Lange, C.A. (2007). Phosphorylation-dependent antagonism of sumoylation derepresses progesterone receptor action in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 2890–2906.

Daniel, A.R., Gaviglio, A.L., Czaplicki, L.M., Hillard, C.J., Housa, D., and Lange, C.A. (2010). The progesterone receptor hinge region regulates the kinetics of transcriptional responses through acetylation, phosphorylation, and nuclear retention. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 24, 2126–2138.

Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1.9Å Resolution††We dedicate this paper to the memory of Max Perutz who was particularly inspirational and supportive to T.J.R. in the early stages of this study. *J. Mol. Biol.* 319, 1097–1113.

Deroo, B.J., and Archer, T.K. (2001). Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo. *Oncogene* 20, 3039–3046.

Derry, J.J., Prins, G.S., Ray, V., and Tyner, A.L. (2003). Altered localization and activity of the intracellular tyrosine kinase BRK/Sik in prostate tumor cells. *Oncogene* 22, 4212.

Déry, U., Coulombe, Y., Rodrigue, A., Stasiak, A., Richard, S., and Masson, J.-Y. (2008). A Glycine-Arginine Domain in Control of the Human MRE11 DNA Repair Protein. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3058–3069.

Dhar, S., Vemulapalli, V., Patananan, A.N., Huang, G.L., Di Lorenzo, A., Richard, S., Comb, M.J., Guo, A., Clarke, S.G., and Bedford, M.T. (2013). Loss of the major Type I arginine methyltransferase PRMT1 causes substrate scavenging by other PRMTs. *Sci. Rep.* 3, 1311.

Di Martile, M., Del Bufalo, D., and Trisciuglio, D. (2016). The multifaceted role of lysine acetylation in cancer: prognostic biomarker and therapeutic target. *Oncotarget* 7, 55789–55810.

Dillon, S.C., Zhang, X., Trievel, R.C., and Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol.* *6*, 227.

Dolganov, G.M., Maser, R.S., Novikov, A., Tosto, L., Chong, S., Bressan, D.A., and Petrini, J.H. (1996). Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4832–4841.

Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R.R., and Richmond, T.J. (2004). Nucleosome Arrays Reveal the Two-Start Organization of the Chromatin Fiber. *Science* *306*, 1571–1573.

Douziech, M., Coin, F., Chipoulet, J.-M., Arai, Y., Ohkuma, Y., Egly, J.-M., and Coulombe, B. (2000). Mechanism of Promoter Melting by the Xeroderma Pigmentosum Complementation Group B Helicase of Transcription Factor IIH Revealed by Protein-DNA Photo-Cross-Linking. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 8168–8177.

Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Piñol-Roma, S., and Burd, C.G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* *62*, 289–321.

Dürnberger, H., and Kratochwil, K. (1980). Specificity of tissue interaction and origin of mesenchymal cells in the androgen response of the embryonic mammary gland. *Cell* *19*, 465–471.

Dutnall, R.N., and Ramakrishnan, V. (1997). Twists and turns of the nucleosome: tails without ends. *Structure* *5*, 1255–1259.

Dynan, W.S., and Tjian, R. (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* *35*, 79–87.

- E -

Eick, G.N., and Thornton, J.W. (2011). Evolution of steroid receptors from an estrogen-sensitive ancestral receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* *334*, 31–38.

Eram, M.S., Shen, Y., Szewczyk, M., Wu, H., Senisterra, G., Li, F., Butler, K.V., Kaniskan, H.Ü., Speed, B.A., Dela Seña, C., et al. (2016). A Potent, Selective, and Cell-Active Inhibitor of Human Type I Protein Arginine Methyltransferases. *ACS Chem. Biol.* *11*, 772–781.

Erbacher, A.I.M., Rönnefarth, V.M., and Decker, P. (2007). Circulating nucleosomes due to a defective clearance of dying cells: Consequences for systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* *40*, 311–314.

Escriva, H., Bertrand, S., and Laudet, V. (2004). The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem.* *40*, 11–26.

Fabbrizio, E., El Messaoudi, S., Polanowska, J., Paul, C., Cook, J.R., Lee, J.-H., Nègre, V., Rousset, M., Pestka, S., Le Cam, A., et al. (2002). Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep.* 3, 641–645.

Faivre, E.J., Daniel, A.R., Hillard, C.J., and Lange, C.A. (2008). Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 823–837.

Filippakopoulos, P., Picaud, S., Mangos, M., Keates, T., Lambert, J.-P., Barsyte-Lovejoy, D., Felletar, I., Volkmer, R., Müller, S., Pawson, T., et al. (2012). Histone Recognition and Large-Scale Structural Analysis of the Human Bromodomain Family. *Cell* 149, 214–231.

Finlay-Schultz, J., Gillen, A.E., Brechbuhl, H.M., Ivie, J.J., Matthews, S.B., Jacobsen, B.M., Bentley, D.L., Kabos, P., and Sartorius, C.A. (2017). Breast Cancer Suppression by Progesterone Receptors Is Mediated by Their Modulation of Estrogen Receptors and RNA Polymerase III. *Cancer Res.* 77, 4934–4946.

Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003a). Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 172–183.

Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. (2003b). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* 17, 1870–1881.

Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116–1122.

Fisher, T.L., and Blenis, J. (1996). Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90<sup>rsk</sup>. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1212–1219.

Flötotto, T., Niederacher, D., Hohmann, D., Heimerzheim, T., Dall, P., Djahansouzi, S., Bender, H.G., and Hanstein, B. (2004). Molecular mechanism of estrogen receptor (ER) $\alpha$ -specific, estradiol-dependent expression of the progesterone receptor (PR) B-isoform. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 131–142.

Fondell, J.D., Roy, A.L., and Roeder, R.G. (1993). Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. *Genes Dev.* 7, 1400–1410.

Freedman, L.P., Luisi, B.F., Korszun, Z.R., Basavappa, R., Sigler, P.B., and Yamamoto, K.R. (1988). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* 334, 543.

Fuhrmann, J., Clancy, K.W., and Thompson, P.R. (2015). Chemical Biology of Protein Arginine Modifications in Epigenetic Regulation. *Chem. Rev.* *115*, 5413–5461.

- G -

Gao, G., Zhang, L., Villarreal, O.D., He, W., Su, D., Bedford, E., Moh, P., Shen, J., Shi, X., Bedford, M.T., et al. (2019). PRMT1 loss sensitizes cells to PRMT5 inhibition. *Nucleic Acids Res.* *47*, 5038–5048.

Gao, Y., Zhao, Y., Zhang, J., Lu, Y., Liu, X., Geng, P., Huang, B., Zhang, Y., and Lu, J. (2016). The dual function of PRMT1 in modulating epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence in breast cancer cells through regulation of ZEB1. *Sci. Rep.* *6*, 19874.

Garcia, C.R., Pincus, G., and Rock, J. (1956). Effects of certain 19-nor steroids on the normal human menstrual cycle. *Science* *124*, 891–893.

Garg, D., Ng, S.S.M., Baig, K.M., Driggers, P., and Segars, J. (2017). Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* *28*, 656–668.

Gary, J.D., and Clarke, S. (1998). RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *61*, 65–131.

Gary, J.D., Lin, W.J., Yang, M.C., Herschman, H.R., and Clarke, S. (1996). The predominant protein-arginine methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *271*, 12585–12594.

Gayatri, S., and Bedford, M.T. (2014). Readers of Histone Methylarginine Marks. *Biochim. Biophys. Acta* *1839*, 702–710.

Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacol. Rev.* *58*, 685–704.

Gery, S., Tanosaki, S., Bose, S., Bose, N., Vadgama, J., and Koeffler, H.P. (2005). Down-regulation and growth inhibitory role of C/EBPalpha in breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 3184–3190.

Giangrande, P.H., and McDonnell, D.P. (1999). The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog. Horm. Res.* *54*, 291–313; discussion 313–314.

Giangrande, P.H., Pollio, G., and McDonnell, D.P. (1997). Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* *272*, 32889–32900.

Gieske, M.C., Kim, H.J., Legan, S.J., Koo, Y., Krust, A., Chambon, P., and Ko, C. (2008). Pituitary gonadotroph estrogen receptor-alpha is necessary for fertility in females. *Endocrinology* *149*, 20–27.

Giguère, V. (1999). Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocr. Rev.* 20, 689–725.

Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M.H., and Shaw, P.E. (1995). ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J.* 14, 951–962.

Goulet, I., Gauvin, G., Boisvenue, S., and Côté, J. (2007). Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 282, 33009–33021.

Graham, J.D., Yeates, C., Balleine, R.L., Harvey, S.S., Milliken, J.S., Bilous, A.M., and Clarke, C.L. (1995). Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 55, 5063–5068.

Graham, J.D., Yager, M.L., Hill, H.D., Byth, K., O'Neill, G.M., and Clarke, C.L. (2005). Altered Progesterone Receptor Isoform Expression Remodels Progestin Responsiveness of Breast Cancer Cells. *Mol. Endocrinol.* 19, 2713–2735.

Green, K.A., and Carroll, J.S. (2007). Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nat. Rev. Cancer* 7, 713–722.

Green, S., and Chambon, P. (1987). Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature* 325, 75.

Green, D.M., Marfatia, K.A., Crafton, E.B., Zhang, X., Cheng, X., and Corbett, A.H. (2002). Nab2p Is Required for Poly(A) RNA Export in *Saccharomyces cerevisiae* and Is Regulated by Arginine Methylation via Hmt1p. *J. Biol. Chem.* 277, 7752–7760.

Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349.

Grunstein, M., Hecht, A., Fisher-Adams, G., Wan, J., Mann, R.K., Strahl-Bolsinger, S., Laroche, T., and Gasser, S. (1995). The regulation of euchromatin and heterochromatin by histones in yeast. *J Cell Sci* 1995, 29–36.

#### - H -

Haelens, A., Tanner, T., Denayer, S., Callewaert, L., and Claessens, F. (2007). The Hinge Region Regulates DNA Binding, Nuclear Translocation, and Transactivation of the Androgen Receptor. *Cancer Res.* 67, 4514–4523.

Hagan, C.R., Regan, T.M., Dressing, G.E., and Lange, C.A. (2011). ck2-Dependent Phosphorylation of Progesterone Receptors (PR) on Ser81 Regulates PR-B Isoform-Specific Target Gene Expression in Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* 31, 2439–2452.

Hagan, C.R., Daniel, A.R., Dressing, G.E., and Lange, C.A. (2012). Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 357, 43–49.

- Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999). RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *9*, 132–139.
- Happel, N., and Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* *431*, 1–12.
- Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B.A., Dahlman, K., Freedman, L.P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K.R., Gustafsson, J.A., and Kaptein, R. (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* *249*, 157–160.
- Haverinen, M., Passinen, S., Syväälä, H., Pasanen, S., Manninen, T., Tuohimaa, P., and Ylikomi, T. (2001). Heat shock protein 90 and the nuclear transport of progesterone receptor. *Cell Stress Chaperones* *6*, 256–262.
- Henry, K.W., Wyce, A., Lo, W.-S., Duggan, L.J., Emre, N.C.T., Kao, C.-F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M.A., and Berger, S.L. (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev.* *17*, 2648–2663.
- Hershko, A., Ciechanover, A., and Rose, I.A. (1979). Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 3107–3110.
- Hill, K.K., Roemer, S.C., Churchill, M.E.A., and Edwards, D.P. (2012). Structural and Functional Analysis of Domains of the Progesterone Receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* *348*, 418–429.
- Hillier, S.G., Whitelaw, P.F., and Smyth, C.D. (1994). Follicular oestrogen synthesis: the ‘two-cell, two-gonadotrophin’ model revisited. *Mol. Cell. Endocrinol.* *100*, 51–54.
- Hilton, H.N., Clarke, C.L., and Graham, J.D. (2018). Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. *Mol. Cell. Endocrinol.* *466*, 2–14.
- Hirata, S., Shoda, T., Kato, J., and Hoshi, K. (2002). Novel isoforms of the mRNA for human female sex steroid hormone receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *83*, 25–30.
- Hirschhorn, J.N., Brown, S.A., Clark, C.D., and Winston, F. (1992). Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev.* *6*, 2288–2298.
- Honda, M., Nakashima, K., and Katada, S. (2017). PRMT1 regulates astrocytic differentiation of embryonic neural stem/precursor cells. *J. Neurochem.* *142*, 901–907.
- Horwitz, K.B., Jackson, T.A., Bain, D.L., Richer, J.K., Takimoto, G.S., and Tung, L. (1996). Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol. Endocrinol.* *10*, 1167–1177.
- Hou, W., Nemitz, S., Schopper, S., Nielsen, M.L., Kessels, M.M., and Qualmann, B. (2018). Arginine Methylation by PRMT2 Controls the Functions of the Actin Nucleator Cobl. *Dev. Cell* *45*, 262–275.e8.

Hovland, A.R., Powell, R.L., Takimoto, G.S., Tung, L., and Horwitz, K.B. (1998). An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* *273*, 5455–5460.

Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., et al. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* *102*, 279–291.

Hu, X., and Lazar, M.A. (2000). Transcriptional Repression by Nuclear Hormone Receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* *11*, 6–10.

Huang, P., Chandra, V., and Rastinejad, F. (2010). Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 247–272.

Huyen, Y., Zgheib, O., Jr, R.A.D., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* *432*, 406.

- I -

Ikuta, M., Kornienko, M., Byrne, N., Reid, J.C., Mizuarai, S., Kotani, H., and Munshi, S.K. (2007). Crystal structures of the N-terminal kinase domain of human RSK1 bound to three different ligands: Implications for the design of RSK1 specific inhibitors. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *16*, 2626–2635.

- J -

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *461*, 1071–1078.

Jacobsen, B.M., Jambal, P., Schittone, S.A., and Horwitz, K.B. (2009). ALU repeats in promoters are position-dependent co-response elements (coRE) that enhance or repress transcription by dimeric and monomeric progesterone receptors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *23*, 989–1000.

Jain, K., Warmack, R.A., Debler, E.W., Hadjikyriacou, A., Stavropoulos, P., and Clarke, S.G. (2016). Protein Arginine Methyltransferase Product Specificity Is Mediated by Distinct Active-site Architectures. *J. Biol. Chem.* *291*, 18299–18308.

Javaid, N., and Choi, S. (2017). Acetylation- and Methylation-Related Epigenetic Proteins in the Context of Their Targets. *Genes* *8*, 196.

Josefowicz, S.Z., Shimada, M., Armache, A., Li, C.H., Miller, R.M., Lin, S., Yang, A., Dill, B.D., Molina, H., Park, H.-S., et al. (2016). Chromatin kinases act on transcription factors and histone tails in regulation of inducible transcription. *Mol. Cell* *64*, 347–361.

- Kadmiel, M., and Cidlowski, J.A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* *34*, 518–530.
- Kagan, R.M., and Clarke, S. (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* *310*, 417–427.
- Kamieniarz, K., Izzo, A., Dundr, M., Tropberger, P., Ozretić, L., Kirfel, J., Scheer, E., Tropel, P., Wiśniewski, J.R., Tora, L., et al. (2012). A dual role of linker histone H1.4 Lys 34 acetylation in transcriptional activation. *Genes Dev.* *26*, 797–802.
- Kassavetis, G.A., Joazeiro, C.A., Pisano, M., Geiduschek, E.P., Colbert, T., Hahn, S., and Blanco, J.A. (1992). The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor, TFIIB. *Cell* *71*, 1055–1064.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* *9*, 1603–1614.
- Katz, J.E., Dlakić, M., and Clarke, S. (2003). Automated Identification of Putative Methyltransferases from Genomic Open Reading Frames. *Mol. Cell. Proteomics* *2*, 525–540.
- Khorasanizadeh, S., and Rastinejad, F. (2001). Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 384–390.
- Kim, J.L., Nikolov, D.B., and Burley, S.K. (1993). Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* *365*, 520–527.
- Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S.A., Ghosh, D., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P., Hayes, D.F., et al. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 11606–11611.
- Koh, S.S., Chen, D., Lee, Y.-H., and Stallcup, M.R. (2001). Synergistic Enhancement of Nuclear Receptor Function by p160 Coactivators and Two Coactivators with Protein Methyltransferase Activities. *J. Biol. Chem.* *276*, 1089–1098.
- Kojetin, D.J., and Burris, T.P. (2013). Small Molecule Modulation of Nuclear Receptor Conformational Dynamics: Implications for Function and Drug Discovery. *Mol. Pharmacol.* *83*, 1–8.
- Kornberg, R.D., and Thomas, J.O. (1974). Chromatin Structure: Oligomers of the Histones. *Science* *184*, 865–868.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* *128*, 693–705.

Kraus, W.L., and Wong, J. (2003). Nuclear receptor-dependent transcription with chromatin. *FEBS J.* 2275–2283.

Kraus, W.L., Montano, M.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1994). Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 8, 952–969.

Kraus, W.L., McInerney, E.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1995). Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 12314–12318.

Krause, C.D., Yang, Z.-H., Kim, Y.-S., Lee, J.-H., Cook, J.R., and Pestka, S. (2007). Protein arginine methyltransferases: Evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* 113, 50–87.

Kumar, R., and McEwan, I.J. (2012). Allosteric Modulators of Steroid Hormone Receptors: Structural Dynamics and Gene Regulation. *Endocr. Rev.* 33, 271–299.

Kumar, R., Lee, J.C., Bolen, D.W., and Thompson, E.B. (2001). The Conformation of the Glucocorticoid Receptor AF1/tau1 Domain Induced by Osmolyte Binds Co-regulatory Proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 18146–18152.

Kwak, Y.T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K.-J., Surabhi, R.M., Miller, B., Gehrig, P., and Gaynor, R.B. (2003). Methylation of SPT5 Regulates Its Interaction with RNA Polymerase II and Transcriptional Elongation Properties. *Mol. Cell* 11, 1055–1066.

- L -

Lafleur, V.N., Richard, S., and Richard, D.E. (2014). Transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) by the protein arginine methyltransferase PRMT1. *Mol. Biol. Cell* 25, 925–935.

Lakowski, T.M., and Frankel, A. (2009). Kinetic analysis of human protein arginine N-methyltransferase 2: formation of monomethyl- and asymmetric dimethyl-arginine residues on histone H4. *Biochem. J.* 421, 253–261.

Lange, C.A., Richer, J.K., Shen, T., and Horwitz, K.B. (1998). Convergence of Progesterone and Epidermal Growth Factor Signaling in Breast Cancer POTENTIATION OF MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE PATHWAYS. *J. Biol. Chem.* 273, 31308–31316.

Lange, C.A., Shen, T., and Horwitz, K.B. (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1032–1037.

Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 207–226.

- Lavery, D.N., and Mcewan, I.J. (2005). Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem. J.* *391*, 449–464.
- Le Guezennec, X., Vermeulen, M., Brinkman, A.B., Hoeijmakers, W.A.M., Cohen, A., Lasonder, E., and Stunnenberg, H.G. (2006). MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 843–851.
- Le Romancer, M., Treilleux, I., Leconte, N., Robin-Lespinnasse, Y., Sentis, S., Bouchekioua-Bouzaghrou, K., Goddard, S., Gobert-Gosse, S., and Corbo, L. (2008). Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol. Cell* *31*, 212–221.
- Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S., and Bedford, M.T. (2005a). PRMT8, a New Membrane-bound Tissue-specific Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family. *J. Biol. Chem.* *280*, 32890–32896.
- Lee, J.-H., Cook, J.R., Yang, Z.-H., Mirochnitchenko, O., Gunderson, S.I., Felix, A.M., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. (2005b). PRMT7, a New Protein Arginine Methyltransferase That Synthesizes Symmetric Dimethylarginine. *J. Biol. Chem.* *280*, 3656–3664.
- Levin, E.R. (2009). Membrane oestrogen receptor  $\alpha$  signalling to cell functions. *J. Physiol.* *587*, 5019–5023.
- Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* *442*, 91–95.
- Li, X., Hu, X., Patel, B., Zhou, Z., Liang, S., Ybarra, R., Qiu, Y., Felsenfeld, G., Bungert, J., and Huang, S. (2010). H4R3 methylation facilitates beta-globin transcription by regulating histone acetyltransferase binding and H3 acetylation. *Blood* *115*, 2028–2037.
- Li, Y., Sabari, B.R., Panchenko, T., Wen, H., Zhao, D., Guan, H., Wan, L., Huang, H., Tang, Z., Zhao, Y., et al. (2016). Molecular Coupling of Histone Crotonylation and Active Transcription by AF9 YEATS Domain. *Mol. Cell* *62*, 181–193.
- Lin, W.-J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., and Herschman, H.R. (1996). The Mammalian Immediate-early TIS21 Protein and the Leukemia-associated BTG1 Protein Interact with a Protein-arginine N-Methyltransferase. *J. Biol. Chem.* *271*, 15034–15044.
- Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., and Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* *118*, 699–713.
- Liu, Y.X., and Hsueh, A.J. (1986). Synergism between granulosa and theca-interstitial cells in estrogen biosynthesis by gonadotropin-treated rat ovaries: studies on the two-cell, two-gonadotropin hypothesis using steroid antisera. *Biol. Reprod.* *35*, 27–36.

Liu, L., Sun, W., Fan, X., Xu, Y., Cheng, M., and Zhang, Y. (2019). Methylation of C/EBP $\alpha$  by PRMT1 inhibits its tumor suppressive function in breast cancer. *Cancer Res.* canres.3211.2018.

Liu, R., Gao, J., Yang, Y., Qiu, R., Zheng, Y., Huang, W., Zeng, Y., Hou, Y., Wang, S., Leng, S., et al. (2018). PHD finger protein 1 (PHF1) is a novel reader for histone H4R3 symmetric dimethylation and coordinates with PRMT5-WDR77/CRL4B complex to promote tumorigenesis. *Nucleic Acids Res.* 46, 6608–6626.

Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2000). The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol. Cell* 5, 939–948.

Lu, H., Flores, O., Weinmann, R., and Reinberg, D. (1991). The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 10004–10008.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.

Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Shyamala, G., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266–2278.

- M -

Macias, H., and Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 533–557.

Madauss, K.P., Stewart, E.L., and Williams, S.P. (2007). The evolution of progesterone receptor ligands. *Med. Res. Rev.* 27, 374–400.

Mahadevan, L.C., Willis, A.C., and Barratt, M.J. (1991). Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* 65, 775–783.

Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* 10, 955–960.

Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835–839.

Maresca, T.J., and Heald, R. (2006). The Long and the Short of it: Linker Histone H1 is Required for Metaphase Chromosome Compaction. *Cell Cycle* 5, 589–591.

Matsui, T., Segall, J., Weil, P.A., and Roeder, R.G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255, 11992–11996.

- Maurer-Stroh, S., Dickens, N.J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., and Ponting, C.P. (2003). The Tudor domain “Royal Family”: Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 69–74.
- Mazaira, G.I., Zgajnar, N.R., Lotufo, C.M., Daneri-Becerra, C., Sivils, J.C., Soto, O.B., Cox, M.B., and Galigniana, M.D. (2018). The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges. *Nucl. Recept. Res.* *5*.
- McEwan, I.J. (2004). Sex, drugs and gene expression: signalling by members of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem.* *40*, 1–10.
- McGhee, J.D., and Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome Structure. *Annu. Rev. Biochem.* *49*, 1115–1156.
- McGuire, W.L., Cavalli, F., Bonomi, P., and Alexieva-Figussch, J. (1985). Progestin therapy for breast cancer: a panel discussion. *Breast Cancer Res. Treat.* *6*, 213–220.
- Melvin, V.S., Roemer, S.C., Churchill, M.E.A., and Edwards, D.P. (2002). The C-terminal Extension (CTE) of the Nuclear Hormone Receptor DNA Binding Domain Determines Interactions and Functional Response to the HMGB-1/-2 Co-regulatory Proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 25115–25124.
- Meyer, M.E., Quirin-Stricker, C., Lerouge, T., Bocquel, M.T., and Gronemeyer, H. (1992). A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* *267*, 10882–10887.
- Meyer, R., Wolf, S.S., and Obendorf, M. (2007). PRMT2, a member of the protein arginine methyltransferase family, is a coactivator of the androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *107*, 1–14.
- Michael, W.M., Choi, M., and Dreyfuss, G. (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* *83*, 415–422.
- Migliori, V., Müller, J., Phalke, S., Low, D., Bezzi, M., Mok, W.C., Sahu, S.K., Gunaratne, J., Capasso, P., Bassi, C., et al. (2012). Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 136–144.
- Minsky, N., Shema, E., Field, Y., Schuster, M., Segal, E., and Oren, M. (2008). Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat. Cell Biol.* *10*, 483–488.
- Misrahi, M., Venencie, P.Y., Saugier-veber, P., Sar, S., Dessen, P., and Milgrom, E. (1993). Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta* *1216*, 289–292.
- Mohammed, H., Russell, I.A., Stark, R., Rueda, O.M., Hickey, T.E., Tarulli, G.A., Serandour, A.A., Serandour, A.A.A., Birrell, S.N., Bruna, A., et al. (2015). Progesterone receptor modulates ER $\alpha$  action in breast cancer. *Nature* *523*, 313–317.

Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 384–391.

Morettin, A., Baldwin, R.M., and Côté, J. (2015). Arginine methyltransferases as novel therapeutic targets for breast cancer. *Mutagenesis* *30*, 177–189.

Morettin, A., Paris, G., Bouzid, Y., Baldwin, R.M., Falls, T.J., Bell, J.C., and Côté, J. (2017). Tudor Domain Containing Protein 3 Promotes Tumorigenesis and Invasive Capacity of Breast Cancer Cells. *Sci. Rep.* *7*, 5153.

Morris, J.R., Boutell, C., Keppler, M., Densham, R., Weekes, D., Alamshah, A., Butler, L., Galanty, Y., Pangon, L., Kiuchi, T., et al. (2009). The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* *462*, 886–890.

Moussatche, P., and Lyons, T.J. (2012). Non-genomic progesterone signalling and its non-canonical receptor. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 200–204.

Mowen, K.A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B.T., Shuai, K., Herschman, H.R., and David, M. (2001). Arginine Methylation of STAT1 Modulates IFN $\alpha$ / $\beta$ -Induced Transcription. *Cell* *104*, 731–741.

Moyal, L., Lerenthal, Y., Gana-Weisz, M., Mass, G., So, S., Wang, S.-Y., Eppink, B., Chung, Y.M., Shalev, G., Shema, E., et al. (2011). Requirement of ATM-dependent monoubiquitylation of histone H2B for timely repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* *41*, 529–542.

Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., and Conneely, O.M. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* *289*, 1751–1754.

Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., and Conneely, O.M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9744–9749.

Murakami, K., Tsai, K.-L., Kalisman, N., Bushnell, D.A., Asturias, F.J., and Kornberg, R.D. (2015). Structure of an RNA polymerase II preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 13543–13548.

Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (1996). Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. *Cell* *84*, 889–897.

– N –

Nacht, A.S., Pohl, A., Zaurin, R., Soronellas, D., Quilez, J., Sharma, P., Wright, R.H., Beato, M., and Vicent, G.P. (2016a). Hormone-induced repression of genes requires BRG1-mediated H1.2 deposition at target promoters. *EMBO J.* *35*, 1822–1843.

Nacht, A.S., Beato, M., and Vicent, G.P. (2016b). Steroid hormone receptors silence genes by a chromatin-targeted mechanism similar to those used for gene activation. *Transcription* *8*, 15–20.

Nagy, L., and Schwabe, J.W.R. (2004). Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 317–324.

Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I.S. (2001). Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly. *Science* *292*, 110–113.

Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., et al. (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev.* *20*, 966–976.

Nawaz, Z., and O'Malley, B.W. (2004). Urban Renewal in the Nucleus: Is Protein Turnover by Proteasomes Absolutely Required for Nuclear Receptor-Regulated Transcription? *Mol. Endocrinol.* *18*, 493–499.

Niewmierzycka, A., and Clarke, S. (1999). S-Adenosylmethionine-dependent Methylation in *Saccharomyces cerevisiae* IDENTIFICATION OF A NOVEL PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE. *J. Biol. Chem.* *274*, 814–824.

Nonet, M.L., and Young, R.A. (1989). Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II. *Genetics* *123*, 715–724.

North, J.A., Javaid, S., Ferdinand, M.B., Chatterjee, N., Picking, J.W., Shoffner, M., Nakkula, R.J., Bartholomew, B., Ottesen, J.J., Fishel, R., et al. (2011). Phosphorylation of histone H3(T118) alters nucleosome dynamics and remodeling. *Nucleic Acids Res.* *39*, 6465–6474.

Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* *97*, 161–163.

- 0 -

Olins, A.L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid Chromatin Units (v Bodies). *Science* *183*, 330–332.

Olins, D.E., and Olins, A.L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 809.

Osborne, T.C., Obiany, O., Zhang, X., Cheng, X., and Thompson, P.R. (2007). Protein Arginine Methyltransferase 1: Positively Charged Residues in Substrate Peptides Distal to the Site of Methylation Are Important for Substrate Binding and Catalysis. *Biochemistry* *46*, 13370–13381.

Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* *4*, 281–300.

Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 993.

- P -

Paik, W.K., and Kim, S. (1971). Protein Methylation. *Science* 174, 114–119.

Pan, G., and Greenblatt, J. (1994). Initiation of transcription by RNA polymerase II is limited by melting of the promoter DNA in the region immediately upstream of the initiation site. *J. Biol. Chem.* 269, 30101–30104.

Park, J.-A., Kim, A.-J., Kang, Y., Jung, Y.-J., Kim, H.K., and Kim, K.-C. (2011). Deacetylation and Methylation at Histone H3 Lysine 9 (H3K9) Coordinate Chromosome Condensation during Cell Cycle Progression. *Mol. Cells* 31, 343–349.

Passos, D.O., Quaresma, A.J.C., and Kobarg, J. (2006). The methylation of the C-terminal region of hnRNPQ (NSAP1) is important for its nuclear localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 517–525.

Patounas, O., Papacharalampous, I., Eckerich, C., Markopoulos, G.S., Kolettas, E., and Fackelmayer, F.O. (2018). A novel splicing isoform of protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) that lacks the dimerization arm and correlates with cellular malignancy. *J. Cell. Biochem.* 119, 2110–2123.

Pauerstein, C.J., Eddy, C.A., Croxatto, H.D., Hess, R., Siler-Khodr, T.M., and Croxatto, H.B. (1978). Temporal relationships of estrogen, progesterone, and luteinizing hormone levels to ovulation in women and infrahuman primates. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130, 876–886.

Paweletz, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 72–75.

Pawlak, M.R., Scherer, C.A., Chen, J., Roshon, M.J., and Ruley, H.E. (2000). Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4859–4869.

Pedersen, M.T., and Helin, K. (2010). Histone demethylases in development and disease. *Trends Cell Biol.* 20, 662–671.

Pek, J.W., Anand, A., and Kai, T. (2012). Tudor domain proteins in development. *Development* 139, 2255–2266.

Petit-Topin, I., Turque, N., Fagart, J., Fay, M., Ulmann, A., Gainer, E., and Rafestin-Oblin, M.-E. (2009). Met909 Plays a Key Role in the Activation of the Progesterone Receptor and Also in the High Potency of 13-Ethyl Progestins. *Mol. Pharmacol.* 75, 1317–1324.

Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S., and Yamamoto, K.R. (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* 348, 166–168.

Pissios, P., Tzamelis, I., Kushner, P.J., and Moore, D.D. (2000). Dynamic Stabilization of Nuclear Receptor Ligand Binding Domains by Hormone or Corepressor Binding. *Mol. Cell* 6, 245–253.

Platero, J.S., Hartnett, T., and Eisenberg, J.C. (1995). Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J.* 14, 3977–3986.

Platet, N., Cathiard, A.M., Gleizes, M., and Garcia, M. (2004). Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 51, 55–67.

Poulard, C., Treilleux, I., Lavergne, E., Bouchekioua-Bouzaghrou, K., Goddard-Léon, S., Chabaud, S., Trédan, O., Corbo, L., and Le Romancer, M. (2012). Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers. *EMBO Mol. Med.* 4, 1200–1213.

Poulard, C., Rambaud, J., Hussein, N., Corbo, L., and Le Romancer, M. (2014). JMJD6 regulates ER $\alpha$  methylation on arginine. *PLoS One* 9, e87982.

Poulard, C., Rambaud, J., Le Romancer, M., and Corbo, L. (2014). Proximity ligation assay to detect and localize the interactions of ER $\alpha$  with PI3-K and Src in breast cancer cells and tumor samples. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1204, 135–143.

Pourteimoor, V., Mohammadi-Yeganeh, S., and Paryan, M. (2016). Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37, 14479–14499.

Prenzel, T., Begus-Nahrman, Y., Kramer, F., Hennion, M., Hsu, C., Gorsler, T., Hintermair, C., Eick, D., Kremmer, E., Simons, M., et al. (2011). Estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells relies upon proteasome-dependent monoubiquitination of histone H2B. *Cancer Res.* 71, 5739–5753.

Prévôt, D., Morel, A.P., Voeltzel, T., Rostan, M.C., Rimokh, R., Magaud, J.P., and Corbo, L. (2001). Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 9640–9648.

#### - R -

Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M., and Sigler, P.B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375, 203.

Rastinejad, F., Huang, P., Chandra, V., and Khorasanizadeh, S. (2013). Understanding Nuclear Receptor Form and Function Using Structural Biology. *J. Mol. Endocrinol.* 51, T1–T21.

Rawal, N., Rajpurohit, R., Lischwe, M.A., Williams, K.R., Paik, W.K., and Kim, S. (1995). Structural specificity of substrate for S-adenosylmethionine protein arginine N-methyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1248, 11–18.

- Renaud, J.P., and Moras\*, D. (2000). Structural studies on nuclear receptors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 1748–1769.
- Renaud, J.-P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR- $\gamma$  ligand-binding domain bound to all- trans retinoic acid. *Nature* 378, 681.
- Rho, J., Choi, S., Jung, C.-R., and Im, D.-S. (2007). Arginine methylation of Sam68 and SLM proteins negatively regulates their poly(U) RNA binding activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 466, 49–57.
- Rhodes, D. (1997). Chromatin structure: The nucleosome core all wrapped up. *Nature* 389, 231–232.
- Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Manning, N.G., Abel, M.G., Wolf, D.M., and Horwitz, K.B. (2002). Differential Gene Regulation by the Two Progesterone Receptor Isoforms in Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 5209–5218.
- Richmond, T.J., and Davey, C.A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145.
- Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311, 532–537.
- Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Kolytcheff, C., Rostan, M.-C., Corbo, L., and Romancer, M.L. (2007). hCAF1, a new regulator of PRMT1-dependent arginine methylation. *J. Cell Sci.* 120, 638–647.
- Robinson, P.J., and Rhodes, D. (2006). Structure of the ‘30nm’ chromatin fibre: A key role for the linker histone. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 336–343.
- Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A.S., Duffraisse, M., and Laudet, V. (2001). How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet. TIG* 17, 554–556.
- Robinson-Rechavi, M., Garcia, H.E., and Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *J. Cell Sci.* 116, 585–586.
- Roemer, S.C., Donham, D.C., Sherman, L., Pon, V.H., Edwards, D.P., and Churchill, M.E.A. (2006). Structure of the Progesterone Receptor-Deoxyribonucleic Acid Complex: Novel Interactions Required for Binding to Half-Site Response Elements. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 20, 3042–3052.
- Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1992). Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends Biochem. Sci.* 17, 93–98.
- Ryan, K.J., and Petro, Z. (1966). Steroid Biosynthesis by Human Ovarian Granulosa and Thecal Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 46–52.

Ryan, K.J., Petro, Z., and Kaiser, J. (1968). Steroid formation by isolated and recombined ovarian granulosa and thecal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *28*, 355–358.

- S -

Sabari, B.R., Tang, Z., Huang, H., Yong-Gonzalez, V., Molina, H., Kong, H.E., Dai, L., Shimada, M., Cross, J.R., Zhao, Y., et al. (2015). Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation. *Mol. Cell* *58*, 203–215.

Safe, S., and Kim, K. (2008). NONCLASSICAL GENOMIC ER/Sp AND ER/AP-1 SIGNALING PATHWAYS. *J. Mol. Endocrinol.* *41*, 263–275.

Salomon, D.S., and Sherman, M.I. (1976). Gonadotrophin Stimulation of Progesterone Synthesis by Midpregnancy Mouse Ovarian Cells in Vitro. *Endocrinology* *99*, 800–808.

Samalecos, A., and Gellersen, B. (2008). Systematic expression analysis and antibody screening do not support the existence of naturally occurring progesterone receptor (PR)-C, PR-M, or other truncated PR isoforms. *Endocrinology* *149*, 5872–5887.

Sartorius, C.A., Melville, M.Y., Hovland, A.R., Tung, L., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B. (1994). A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *8*, 1347–1360.

Sassone-Corsi, P., Mizzen, C.A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A., and Allis, C.D. (1999). Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* *285*, 886–891.

Savkur, R.S., and Burris, T.P. (2004). The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J. Pept. Res.* *63*, 207–212.

Scarpin, K.M., Graham, J.D., Mote, P.A., and Clarke, C.L. (2009). Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl. Recept. Signal.* *7*.

Scheuermann, J.C., de Ayala Alonso, A.G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R.K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T.W., and Müller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* *465*, 243–247.

Schneider, M.A., Davies, M.C., and Honour, J.W. (1993). The timing of placental competence in pregnancy after oocyte donation. *Fertil. Steril.* *59*, 1059–1064.

Schulman, I.G., Chakravarti, D., Juguilon, H., Romo, A., and Evans, R.M. (1995). Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the TATA-binding protein mediate hormone-dependent transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8288–8292.

- Schwartz, J.A., Zhong, L., Deighton-Collins, S., Zhao, C., and Skafar, D.F. (2002). Mutations Targeted to a Predicted Helix in the Extreme Carboxyl-terminal Region of the Human Estrogen Receptor- $\alpha$  Alter Its Response to Estradiol and 4-Hydroxytamoxifen. *J. Biol. Chem.* *277*, 13202–13209.
- Schwerk, C., Klotzbücher, M., Sachs, M., Ulber, V., and Klein-Hitpass, L. (1995). Identification of a transactivation function in the progesterone receptor that interacts with the TAFII110 subunit of the TFIID complex. *J. Biol. Chem.* *270*, 21331–21338.
- Scorilas, A., Black, M.H., Talieri, M., and Diamandis, E.P. (2000). Genomic Organization, Physical Mapping, and Expression Analysis of the Human Protein Arginine Methyltransferase 1 Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *278*, 349–359.
- Sekhar, S.C., Venkatesh, J., Cheriyan, V.T., Muthu, M., Levi, E., Assad, H., Meister, P., Undyala, V.V., Gauld, J.W., and Rishi, A.K. (2019). A H2AX–CARP-1 Interaction Regulates Apoptosis Signaling Following DNA Damage. *Cancers* *11*.
- Seto, E., and Yoshida, M. (2014). Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*, a018713.
- Shahbazian, M.D., and Grunstein, M. (2007). Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 75–100.
- Shen, E.C., Henry, M.F., Weiss, V.H., Valentini, S.R., Silver, P.A., and Lee, M.S. (1998). Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev.* *12*, 679–691.
- Shen, T., Horwitz, K.B., and Lange, C.A. (2001). Transcriptional Hyperactivity of Human Progesterone Receptors Is Coupled to Their Ligand-Dependent Down-Regulation by Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Phosphorylation of Serine 294. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6122–6131.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* *119*, 941–953.
- Shiio, Y., and Eisenman, R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 13225–13230.
- Shyamala, G., Yang, X., Cardiff, R.D., and Dale, E. (2000). Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 3044–3049.
- Singhal, H., Greene, M.E., Zarnke, A.L., Laine, M., Abosy, R.A., Chang, Y.-F., Dembo, A.G., Schoenfelt, K., Vadhi, R., Qiu, X., et al. (2017). Progesterone receptor isoforms, agonists and antagonists differentially reprogram estrogen signaling. *Oncotarget* *9*, 4282–4300.
- Sitruk-Ware, R., and Spitz, I.M. (2003). Pharmacological properties of mifepristone: toxicology and safety in animal and human studies. *Contraception* *68*, 409–420.

Slechta, R.F., Chang, M.C., and Pincus, G. (1954). Effects of progesterone and related compounds on mating and pregnancy in the rat. *Fertil. Steril.* 5, 282–293.

Smith, W.A., Schurter, B.T., Wong-Staal, F., and David, M. (2004). Arginine Methylation of RNA Helicase A Determines Its Subcellular Localization. *J. Biol. Chem.* 279, 22795–22798.

Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G.R., Rampersaud, N., Dyson, M.H., Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C., and Arthur, J.S.C. (2003). MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J.* 22, 2788–2797.

Song, L., Wang, L., Li, Y., Xiong, H., Wu, J., Li, J., and Li, M. (2010). Sam68 up-regulation correlates with, and its down-regulation inhibits, proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells. *J. Pathol.* 222, 227–237.

Soutourina, J. (2018). Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 262–274.

Stanczyk, F.Z., and Bhavnani, B.R. (2014). Use of medroxyprogesterone acetate for hormone therapy in postmenopausal women: Is it safe? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 142, 30–38.

Stanczyk, F.Z., and Henzl, M.R. (2001). Use of the name “Progestin.” *Contraception* 64, 1–2.

Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41.

Strahl, B.D., Briggs, S.D., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Koh, S.S., Ma, H., Cook, R.G., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Stallcup, M.R., et al. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Curr. Biol.* 11, 996–1000.

Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213–1226.

- T -

Takeuchi, T., Yamazaki, Y., Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Kondo, S., Motoyama, J., and Higashinakagawa, T. (1995). Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev.* 9, 1211–1222.

Takimoto, G.S., Tung, L., Abdel-Hafiz, H., Abel, M.G., Sartorius, C.A., Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Bain, D.L., and Horwitz, K.B. (2003). Functional properties of the N-terminal region of progesterone receptors and their mechanistic relationship to structure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, 209–219.

Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., et al. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016–1028.

- Tang, J., Frankel, A., Cook, R.J., Kim, S., Paik, W.K., Williams, K.R., Clarke, S., and Herschman, H.R. (2000). PRMT1 Is the Predominant Type I Protein Arginine Methyltransferase in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 275, 7723–7730.
- Taylor, A.H., McParland, P.C., Taylor, D.J., and Bell, S.C. (2009). The cytoplasmic 60 kDa progesterone receptor isoform predominates in the human amniochorion and placenta at term. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 7, 22.
- Tee, W.-W., Pardo, M., Theunissen, T.W., Yu, L., Choudhary, J.S., Hajkova, P., and Surani, M.A. (2010). Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency. *Genes Dev.* 24, 2772–2777.
- Tetel, M.J., Jung, S., Carbajo, P., Ladtkow, T., Skafar, D.F., and Edwards, D.P. (1997). Hinge and amino-terminal sequences contribute to solution dimerization of human progesterone receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 11, 1114–1128.
- Thomson, S., Clayton, A.L., Hazzalin, C.A., Rose, S., Barratt, M.J., and Mahadevan, L.C. (1999). The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J.* 18, 4779–4793.
- Thomson, S., Clayton, A.L., and Mahadevan, L.C. (2001). Independent Dynamic Regulation of Histone Phosphorylation and Acetylation during Immediate-Early Gene Induction. *Mol. Cell* 8, 1231–1241.
- Thornton, J.W. (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5671–5676.
- Torres-Padilla, M.-E., Parfitt, D.-E., Kouzarides, T., and Zernicka-Goetz, M. (2007). Histone arginine methylation regulates cell fate and pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 445, 214–218.
- Treviño, L.S., Bingman, W.E., Edwards, D.P., and Weigel, N. (2013). The Requirement for p42/p44 MAPK Activity in Progesterone Receptor-Mediated Gene Regulation is Target Gene-Specific. *Steroids* 78, 542–547.
- Troffer-Charlier, N., Cura, V., Hassenboehler, P., Moras, D., and Cavarelli, J. (2007). Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains. *EMBO J.* 26, 4391–4401.
- Trojer, P., Zhang, J., Yonezawa, M., Schmidt, A., Zheng, H., Jenuwein, T., and Reinberg, D. (2009). Dynamic Histone H1 Isoform 4 Methylation and Demethylation by Histone Lysine Methyltransferase G9a/KMT1C and the Jumonji Domain-containing JMJD2/KDM4 Proteins. *J. Biol. Chem.* 284, 8395–8405.

Trotter, K.W., and Archer, T.K. (2007). Nuclear receptors and chromatin remodeling machinery. *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266, 162–167.

Tsai, W.-C., Reineke, L.C., Jain, A., Jung, S.Y., and Lloyd, R.E. (2017). Histone arginine demethylase JMJD6 is linked to stress granule assembly through demethylation of the stress granule-nucleating protein G3BP1. *J. Biol. Chem.* 292, 18886–18896.

Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811.

Tung, L., Mohamed, M.K., Hoeffler, J.P., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B. (1993). Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 7, 1256–1265.

Tung, L., Shen, T., Abel, M.G., Powell, R.L., Takimoto, G.S., Sartorius, C.A., and Horwitz, K.B. (2001). Mapping the Unique Activation Function 3 in the Progesterone B-receptor Upstream Segment TWO LXXLL MOTIFS AND A TRYPTOPHAN RESIDUE ARE REQUIRED FOR ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* 276, 39843–39851.

- U -

Umesono, K., and Evans, R.M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139–1146.

Uttarkar, S., Piontek, T., Dukare, S., Schomburg, C., Schlenke, P., Berdel, W.E., Müller-Tidow, C., Schmidt, T.J., and Klempnauer, K.-H. (2016). Small-Molecule Disruption of the Myb/p300 Cooperation Targets Acute Myeloid Leukemia Cells. *Mol. Cancer Ther.* 15, 2905–2915.

- V -

Vadnais, C., Chen, R., Fraszczak, J., Yu, Z., Boulais, J., Pinder, J., Frank, D., Khandanpour, C., Hébert, J., Dellaire, G., et al. (2018). GFI1 facilitates efficient DNA repair by regulating PRMT1 dependent methylation of MRE11 and 53BP1. *Nat. Commun.* 9, 1418.

Varricchio, L., Migliaccio, A., Castoria, G., Yamaguchi, H., Falco, A. de, Domenico, M.D., Giovannelli, P., Farrar, W., Appella, E., and Auricchio, F. (2007). Inhibition of Estradiol Receptor/Src Association and Cell Growth by an Estradiol Receptor  $\alpha$  Tyrosine-Phosphorylated Peptide. *Mol. Cancer Res.* 5, 1213–1221.

Vicent, G.P., Ballaré, C., Nacht, A.S., Clausell, J., Subtil-Rodríguez, A., Quiles, I., Jordan, A., and Beato, M. (2006). Induction of progesterone target genes requires activation of Erk and Msk kinases and phosphorylation of histone H3. *Mol. Cell* 24, 367–381.

Vicent, G.P., Nacht, A.S., Zaurin, R., Font-Mateu, J., Soronellas, D., Le Dily, F., Reyes, D., and Beato, M. (2013). Unliganded progesterone receptor-mediated targeting of an RNA-containing repressive complex silences a subset of hormone-inducible genes. *Genes Dev.* 27, 1179–1197.

Visser, H.P., Gunster, M.J., Kluin-Nelemans, H.C., Manders, E.M., Raaphorst, F.M., Meijer, C.J., Willemze, R., and Otte, A.P. (2001). The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 112, 950–958.

Volle, D.H. (2016). Nuclear receptors as pharmacological targets, where are we now? *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3777–3780.

- W -

Wada, K., Inoue, K., and Hagiwara, M. (2002). Identification of methylated proteins by protein arginine N-methyltransferase 1, PRMT1, with a new expression cloning strategy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1591, 1–10.

Walport, L.J., Hopkinson, R.J., Chowdhury, R., Schiller, R., Ge, W., Kawamura, A., and Schofield, C.J. (2016). Arginine demethylation is catalysed by a subset of JmJc histone lysine demethylases. *Nat. Commun.* 7.

Wang, H., Huang, Z.-Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P., et al. (2001). Methylation of Histone H4 at Arginine 3 Facilitating Transcriptional Activation by Nuclear Hormone Receptor. *Science* 293, 853–857.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004a). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873–878.

Wang, L., Pal, S., and Sif, S. (2008). Protein arginine methyltransferase 5 suppresses the transcription of the RB family of tumor suppressors in leukemia and lymphoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6262–6277.

Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.-H., Perlin, J.R., Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., et al. (2004b). Human PAD4 Regulates Histone Arginine Methylation Levels via Demethylination. *Science* 306, 279–283.

Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S.A., et al. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* 184, 205–213.

Wang et al, 2001 Methylation of Histone H4 at Arginine 3 Facilitating Transcriptional Activation by Nuclear Hormone Receptor | Science.

Wei, L.L., and Miner, R. (1994). Evidence for the existence of a third progesterone receptor protein in human breast cancer cell line T47D. *Cancer Res.* 54, 340–343.

- Wei, L.L., Gonzalez-Aller, C., Wood, W.M., Miller, L.A., and Horwitz, K.B. (1990). 5'-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 4, 1833–1840.
- Wei, L.L., Norris, B.M., and Baker, C.J. (1997). An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62, 287–297.
- Weintraub, H. (1985). Assembly and propagation of repressed and depressed chromosomal states. *Cell* 42, 705–711.
- Weiss, V.H., McBride, A.E., Soriano, M.A., Filman, D.J., Silver, P.A., and Hogle, J.M. (2000). The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1165.
- Willson, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D., and Henke, B.R. (2000). The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J. Med. Chem.* 43, 527–550.
- Winter, S., Simboeck, E., Fischle, W., Zupkovitz, G., Dohnal, I., Mechtler, K., Ammerer, G., and Seiser, C. (2008). 14-3-3 Proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation. *EMBO J.* 27, 88–99.
- Wintzerith, M., Acker, J., Vicaire, S., Vigneron, M., and Kedinger, C. (1992). Complete sequence of the human RNA polymerase II largest subunit. *Nucleic Acids Res.* 20, 910.
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Krüger, S., and Mann, M. (2007). Mass Spectrometric Mapping of Linker Histone H1 Variants Reveals Multiple Acetylations, Methylations, and Phosphorylation as Well as Differences between Cell Culture and Tissue. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 72–87.
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., and Mann, M. (2008). N $\epsilon$ -Formylation of lysine is a widespread post-translational modification of nuclear proteins occurring at residues involved in regulation of chromatin function. *Nucleic Acids Res.* 36, 570–577.
- Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer, M., Rockman, M.V., and Romano, L.A. (2003). The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1377–1419.
- Wu, H., Min, J., Lunin, V.V., Antoshenko, T., Dombrovski, L., Zeng, H., Allali-Hassani, A., Campagna-Slater, V., Vedadi, M., Arrowsmith, C.H., et al. (2010). Structural Biology of Human H3K9 Methyltransferases. *PLoS ONE* 5.
- Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renaud, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* 3, 87.

Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H., and Allis, C.D. (2005). WDR5 Associates with Histone H3 Methylated at K4 and Is Essential for H3 K4 Methylation and Vertebrate Development. *Cell* 121, 859–872.

- X -

Xu, C., and Henry, M.F. (2004). Nuclear export of hnRNP Hrp1p and nuclear export of hnRNP Npl3p are linked and influenced by the methylation state of Npl3p. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10742–10756.

Xu, H.E., Stanley, T.B., Montana, V.G., Lambert, M.H., Shearer, B.G., Cobb, J.E., McKee, D.D., Galardi, C.M., Plunket, K.D., Nolte, R.T., et al. (2002). Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature* 415, 813–817.

- Y -

Yang, Y., and Bedford, M.T. (2013). Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 37–50.

Yang, Y., Lu, Y., Espejo, A., Wu, J., Xu, W., Liang, S., and Bedford, M.T. (2010). TDRD3 is an Effector Molecule for Arginine Methylated Histone Marks. *Mol. Cell* 40, 1016–1023.

Yu, S., Kim, T., Yoo, K.H., and Kang, K. (2017). The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486, 752–758.

Yu, Z., Vogel, G., Coulombe, Y., Dubeau, D., Spehalski, E., Hébert, J., Ferguson, D.O., Masson, J.Y., and Richard, S. (2012). The MRE11 GAR motif regulates DNA double-strand break processing and ATR activation. *Cell Res.* 22, 305–320.

- Z -

Zaret, K.S., and Carroll, J.S. (2011). Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev.* 25, 2227–2241.

Zhang, L., Tran, N.-T., Su, H., Wang, R., Lu, Y., Tang, H., Aoyagi, S., Guo, A., Khodadadi-Jamayran, A., Zhou, D., et al. (2015). Cross-talk between PRMT1-mediated methylation and ubiquitylation on RBM15 controls RNA splicing. *ELife* 4, e07938.

Zhang, X., and Cheng, X. (2003). Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Struct. Lond. Engl.* 1993 11, 509–520.

Zhang, X., Zhou, L., and Cheng, X. (2000). Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *EMBO J.* 19, 3509–3519.

Zhao, Q., Rank, G., Tan, Y.T., Li, H., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Cerruti, L., Curtis, D.J., Patel, D.J., Allis, C.D., et al. (2009). PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 304–311.

Zheng, L., Lin, V.C., and Mu, Y. (2016). Exploring Flexibility of Progesterone Receptor Ligand Binding Domain Using Molecular Dynamics. *PLOS ONE* *11*, e0165824.

Zhong, J., Ding, L., Bohrer, L.R., Pan, Y., Liu, P., Zhang, J., Sebo, T.J., Karnes, R.J., Tindall, D.J., Deursen, J. van, et al. (2014). p300 Acetyltransferase Regulates Androgen Receptor Degradation and PTEN-Deficient Prostate Tumorigenesis. *Cancer Res.* *74*, 1870–1880.

Zhu, W., and Nelson, C.M. (2013). Adipose and mammary epithelial tissue engineering. *Biomatter* *3*.

Zhu, Q., Pao, G.M., Huynh, A.M., Suh, H., Tonnu, N., Nederlof, P., Gage, F.H., and Verma, I.M. (2011). BRCA1 tumor suppression occurs via heterochromatin mediated silencing. *Nature* *477*, 179–184.

Zubay, G., and Doty, P. (1959). The isolation and properties of deoxyribonucleoprotein particles containing single nucleic acid molecules. *J. Mol. Biol.* *1*, 1-IN1.