



HAL
open science

Étude de PRMT2 dans le développement leucémique et l'inflammation

Camille Sauter

► **To cite this version:**

Camille Sauter. Étude de PRMT2 dans le développement leucémique et l'inflammation. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2023. Français. NNT : 2023UBFCI013 . tel-04551541

HAL Id: tel-04551541

<https://theses.hal.science/tel-04551541>

Submitted on 18 Apr 2024

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté

École Doctorale Environnements-Santé n°554

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Soutenue publiquement à Dijon le jeudi 23 novembre 2023 par

Camille SAUTER

Étude du rôle de PRMT2 dans le développement leucémique et l'inflammation

Composition du jury :

Dr Isabelle PLO	Rapporteuse
Dr Muriel LE ROMANCER	Rapporteuse
Dr Evelyne LAURET	Examinatrice
Pr François DELHOMMEAU	Examineur
Pr Jean-Noël BASTIE	Président du jury
Dr Laurent LEVADNY DELVA	Directeur de thèse
Dr Romain AUCAGNE	Co-directeur de thèse

**UMR 1231 Inserm, Équipe Epi2THM
UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne,
7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon**

*À celles et ceux qui ont été
emportés trop vite loin de moi.*

« La science n'atteint jamais son but parce que le but n'en finit pas de se dérober – et qu'en vérité, il n'y a pas de but : la science est une tâche infinie. Sa grandeur est de se présenter comme un rêve toujours inassouvi. »

Jean d'Ormesson

Remerciements

J'adresse ma profonde gratitude aux membres de mon jury de thèse, notamment les **Dr Muriel Le Romancer** et **Dr Isabelle Plo**, qui ont accepté d'évaluer ces travaux en tant que rapportrices ainsi que les **Pr Jean-Noël Bastie**, **Pr François Delhommeau** et **Dr Evelyne Lauret** qui ont jugé ce travail en qualité d'examineurs.

Laurent, merci de m'avoir accueillie au sein de ton équipe pour mon stage de Master 1, puis celui de Master 2, et d'avoir accepté de diriger cette thèse. Je te suis reconnaissante pour tous ces congrès que tu m'as encouragée à faire, et de m'avoir donné l'occasion unique d'en coorganiser un. Tu as toujours su trouver du temps pour moi, notamment pour l'analyse de mes résultats, les nombreuses discussions scientifiques ainsi que l'écriture d'une montagne de dossiers et de résumés en tous genres. Grâce à toi, je sais maintenant repérer les espaces en trop et je peux choisir entre l'anglais et l'américain à l'écrit (c'est facile, ce sont juste des Anglais fainéants...). Les récits de tes nombreux voyages, tes « mots d'esprit du jour », ainsi que tes blagues et jeux de mots dont tu as le secret vont me manquer.

Romain, je peux dire sans hésitation que tu es celui qui m'a tout appris de la recherche en biologie, alors que ça faisait plus d'un an que je n'avais pas touché une pipette lors de mon arrivée en Master 1. Merci d'avoir pris sur ton temps afin de toujours me montrer, me conseiller et me remettre dans la bonne direction lorsque j'en avais besoin. J'espère que cette première expérience en tant que co-directeur de thèse te laissera un bon souvenir. J'ai été ravie de travailler avec toi durant ces 6 années et je sais quelle chance auront les futurs étudiants qui seront à ma place.

Je souhaite remercier mes parents pour leur soutien indéfectible. **Maman, Papa**, les mots que je pourrais écrire ne seraient jamais à la hauteur de l'amour et l'affection que vous m'avez témoigné tout au long de mes études. Vous m'avez toujours laissé choisir ma voie tout en m'encourageant et en me poussant vers le haut. Je vous suis extrêmement reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi durant toutes ces années. Je veux également exprimer ma profonde sollicitude aux autres membres de ma famille, **Eliane, JJ, Sylvain** et **Esther** notamment, qui m'ont soutenu tout au long de mes études. Passer du temps avec vous me permet de me changer les idées et c'est toujours avec grand plaisir que je vous rends visite.

Tobias, je n'ai pas de frère mais je pense que tu es celui qui pourrait le plus s'en approcher. Je te remercie pour tous ces petits messages d'encouragement, même quand parfois la motivation était en baisse. Merci de suivre ta cousine dans ses idées toujours plus farfelues (organiser le voyage au Mexique en trois semaines, il fallait le faire !).

Je souhaite également remercier ma belle-famille. **Patrick, Régine, Arthur, Alizée**, merci de m'avoir accueillie au sein de votre famille, je m'y suis toujours sentie chez moi.

Les années passent mais notre amitié reste toujours la même depuis le lycée. **Delphine, Lilian**, vous êtes deux personnes incroyables. Nos soirées « jeux à distance » accompagnées de pirates, de fantômes ou de golf, m'ont aidée à penser à autre chose et me faisaient passer de très bons moments. C'est toujours un plaisir de vous accueillir à Dijon pour faire des Escape Games, ou fêter le nouvel An. Je me réjouis déjà d'être en mai 2024...

J'aimerais mentionner l'ensemble des personnes que j'ai connu au centre équestre des Allées Cavalières à Quetigny. Durant ces 5 années, je m'y suis sentie intégrée comme dans une deuxième famille. Nous avons vécu tout un tas de choses incroyables, tellement que je ne pourrais pas tout citer. **Eric**, je suis ravie que tu m'aies fait connaître le grand Dalero et que tu nous aies même emmené jusqu'aux championnats de France (ce n'était pas gagné d'avance).

À mes « copines de poney », ces amitiés qui ont largement dépassé les murs des boxes de nos chevaux. **Céline, Eva, Elisa, Frances** (et **Chloé** !), je garde en mémoire tous les fous rires, séances de ragots et potins du club, le « groupe apéro », et les sorties diverses aux quatre coins de la Bourgogne. Le carrousel des princesses Disney reste un souvenir inoubliable, tout comme Lamotte 2022 et 2023. Je vous souhaite le meilleur dans vos futures vies équestres.

Je remercie l'ensemble des personnes de l'équipe Delva (devenue Epi2THM) notamment le **Pr Mary Callanan**, responsable actuelle de l'équipe, pour son accueil. **Jean-Noël, Fabien**, je vous suis reconnaissante pour votre bienveillance à mon égard et vos précieux conseils sur ce projet de recherche ainsi que les moments passés en dehors du labo. **Baptiste (D), Baptiste (P), Aziza, Cindy** et **Manon** (tu fais presque partie de l'équipe, non ?), les soirées resto/bar étaient toujours de bons moments entre nous. **Cyril**, tu as réussi à éclairer ma lanterne sur les mystères de la bioinformatique, et tu as su réaliser toutes les analyses dont j'avais besoin dans un délai parfois très court.

Lorsque je suis arrivée à Dijon, je ne connaissais absolument personne. Pourtant, au bout d'à peine quelques semaines je m'y sentais bien, entourée de gens bienveillants. **John, Kevin, Aline, Abdel**, vous avez rendu mes deux années de Master bien plus agréables grâce à des soirées de détente entre amis pleines de fous rires. **Marine**, ce fut un plaisir d'être la « tata » de tes deux juments lorsque tu partais loin de Dijon. Je garde en tête ces longues balades à se raconter nos vies.

À tous les autres membres passés et présents du « troisième étage », qui m'ont apporté des discussions enrichissantes. Vous mettez une belle ambiance dans ce laboratoire où il fait bon travailler. J'aimerais également exprimer ma reconnaissance envers **Lucile** et **Alexandrine**, toujours prêtes à aider pour à peu près n'importe quel problème d'ordre administratif.

Pour terminer, je remercie profondément celui qui est mon compagnon de route depuis plus de 6 ans. **Aymeric**, tu as su me remotiver lorsque c'était nécessaire, tu m'as montré la lumière dans les moments où je ne voyais que du noir. Toutes les « discussions boulot » (allez, juste cinq minutes, promis), les sorties improvisées afin de se changer les idées sont toujours de très beaux souvenirs. J'ai vécu parmi les plus beaux moments de ma vie avec toi, je repense notamment à ces fabuleux voyages ensemble et j'espère qu'il y en aura plein d'autres encore. En un mot comme en mille, merci.

Table des matières

INTRODUCTION	15
I. Le contrôle épigénétique de l'expression de gènes	16
A. L'avènement du concept d'épigénétique.....	16
B. Modifications épigénétiques.....	17
1. Le cas particulier des microARN.....	17
2. La méthylation des ARN : l'épitranscriptome.....	18
3. La méthylation de l'ADN.....	19
4. Les variants d'histones	21
5. Les modifications post-traductionnelles des histones	23
a) Acétylation et autres acylations.....	24
b) Méthylation	26
c) Phosphorylation	28
d) Autres modifications	30
C. Épigénétique et structuration de la chromatine	31
II. Les protéines arginines méthyltransférases.....	33
A. La méthylation de l'arginine.....	33
1. Le donneur de groupe méthyle : la SAM.....	34
2. Les différents types d'arginine méthylées	35
B. Structures protéiques des PRMT humaines	36
1. PRMT1, PRMT3, PRMT6 et PRMT8.....	38
2. CARM1.....	39
3. PRMT5	40
4. PRMT7 et PRMT9.....	40
C. Régulation de l'activité des PRMT	41
1. Phosphorylation des PRMT	41
2. Dégradation par ubiquitinylation	43
3. Contrôle de l'expression par les miARN	44
4. Régulation croisée entre PRMT	44
D. Les diverses fonctions des PRMT	45
1. Modulation de la transcription.....	45
2. Épissage et traduction de l'ARN messager	46
3. Implication dans les voies de signalisation.....	48
4. Contrôle du cycle cellulaire	50
5. Rôles dans la réponse aux dommages de l'ADN	51

E.	Les PRMT dans l'hématopoïèse.....	55
1.	Définition de l'hématopoïèse.....	55
2.	Fonctions des PRMT dans l'hématopoïèse.....	57
III.	Les PRMT dans les cancers.....	60
A.	Les PRMT dans les hémopathies malignes.....	60
1.	Nouvelle classification des hémopathies malignes.....	60
a)	Néoplasies lymphoïdes.....	60
b)	Néoplasies myéloïdes et histiocytaires/dendritiques.....	60
c)	Les leucémies aiguës myéloblastiques.....	61
2.	Fonctions des PRMT dans les hémopathies malignes.....	63
a)	PRMT1.....	64
b)	CARM1.....	65
c)	PRMT5.....	66
d)	PRMT6.....	69
e)	PRMT7.....	69
B.	Rôle des PRMT dans les cancers solides.....	70
C.	Les PRMT comme cibles dans les hémopathies malignes.....	70
1.	Utilisation d'inhibiteurs de PRMT.....	70
2.	Essais cliniques.....	73
IV.	PRMT2.....	75
A.	Structure protéique et isoformes.....	75
B.	Fonctions connues de PRMT2.....	77
1.	Co-activation et co-répression de protéines.....	77
2.	Régulation de la transcription.....	78
3.	Substrats connus de PRMT2.....	79
V.	Objectifs de la thèse.....	81
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	82
	RÉSULTATS.....	93
I.	Mise au point des modèles expérimentaux.....	94
A.	Modèles de souris <i>Prmt2</i> ^{-/-} et <i>Prmt2</i> ^{-/-} <i>MAF9</i> ^{het}	94
B.	Lignées cellulaires créées.....	96
C.	Anticorps anti-PRMT2.....	96
II.	Article « <i>PRMT2 Controls Inflammatory Signaling in Acute Myeloid Leukemia</i> ».....	98
III.	Résultats supplémentaires.....	137
A.	Étude du rôle de PRMT2 sur l'inflammation <i>in vivo</i>	137
B.	Lien entre PRMT2 et inflammation dans différentes cohortes de patients atteints de LAM.....	138

C.	Rôle de PRMT2 dans le microenvironnement tumoral	139
D.	Identification de nouveaux partenaires protéiques de PRMT2	141
E.	Recherche du rôle précis de PRMT2 sur la voie NF-κB.....	144
DISCUSSION	146
I.	Résumé des résultats	147
II.	Importance de l'inflammation dans les LAM	148
A.	Les cytokines inflammatoires dans les LAM.....	148
B.	Thérapeutique anti-inflammatoire dans le traitement des LAM	150
III.	Rôles des PRMT dans l'inflammation	152
A.	Effets de PRMT2 sur les voies de l'inflammation	152
B.	Implications des autres PRMT dans la voie NF-κB.....	155
IV.	Rôles de PRMT2 dans la progression des cancers.....	157
V.	Les nouveaux substrats de PRMT2.....	160
A.	Les protéines WAS et WIPF1 interagissent avec PRMT2.....	160
B.	Régulation croisée entre PRMT2 et PLZF	161
VI.	Rôles putatifs de PRMT2 dans la voie NF-κB dans les LAM.....	164
CONCLUSION	166
ANNEXES	169
I.	Revue « <i>Protein Arginine Methyltransferases as Therapeutic Targets in Hematological Malignancies</i> »	170
II.	Publications scientifiques	191
III.	Congrès.....	192
IV.	Formation d'étudiants.....	193
V.	Organisation d'un congrès international : EuroMeP.....	194
BIBLIOGRAPHIE	198

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique simplifiée de la biogenèse des miARN canoniques	17
Figure 2. Voies de méthylation de l'ADN	20
Figure 3. Distribution des îlots CpG dans les génomes de mammifères.....	21
Figure 4. Les différentes histones et leurs variants	22
Figure 5. Statut de la chromatine et effet sur la transcription de gènes	23
Figure 6. Les différentes acétylations des queues d'histones	24
Figure 7. Les différentes classes d'acylations des queues d'histones et leurs cibles.....	26
Figure 8. Les différentes méthylations des queues d'histones	27
Figure 9. Les différentes phosphorylations des queues d'histones	29
Figure 10. Liste non exhaustive des différentes modifications post-traductionnelles des queues d'histones	30
Figure 11. Représentation des densités de potentiels électriques en trois dimensions du complexe HP1 α -dinucléosome	32
Figure 12. Schéma simplifié du contrôle métabolique de la méthylation de l'arginine	34
Figure 13. Types de méthylation possibles par les PRMT	36
Figure 14. Schématisation des domaines des neuf PRMT humaines.....	37
Figure 15. Structure en trois dimensions d'un dimère de PRMT8 humain.....	38
Figure 16. Structure par cristallographie de PRMT5 humaine dans un complexe hétéro-octamérique avec MEP50	40
Figure 17. Dualité des fonctions de la phosphorylation de PRMT5	42
Figure 18. Sites connus de méthylation de l'arginine sur les queues d'histones par les PRMT	46
Figure 19. La méthylation des résidus arginine module l'épissage des pré-ARNm	48
Figure 20. Fonctions de PRMT1 dans les voies de signalisation liées au TGF	49
Figure 21. Les rôles des PRMT dans la régulation du cycle cellulaire	51
Figure 22. Rôles des PRMT dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN	53
Figure 23. Représentation schématique de l'hématopoïèse adulte	56
Figure 24. Les différentes fonctions cellulaires des PRMT dans les hémopathies malignes	64

Figure 25. PRMT5 interagit avec un large éventail de protéines impliquées dans un grand nombre de fonctions cellulaires	68
Figure 26. Les isoformes humaines de PRMT2	76
Figure 27. Validation du modèle de souris <i>Prmt2^{-/-}</i> et transplantation de cellules <i>Prmt2/MAF9^{het}</i>	95
Figure 28. Validation d'un anticorps ciblant spécifiquement PRMT2.....	97
Figure 29. Injections de LPS in vivo	137
Figure 30. Expression de PRMT2 et de divers gènes liés à NF-κB dans différentes cohortes de patients atteints de LAM	139
Figure 31. Allogreffes de cellules LLC1 et MC-38 dans des souris WT et <i>Prmt2^{-/-}</i>	140
Figure 32. Protéines interagissant avec la protéine de fusion citrine-PRMT2.....	142
Figure 33. Étude du rôle de PRMT2 sur la voie NF-κB	145
Figure 34. Rôles connus de PRMT2 sur les voies de signalisation NF-κB et JAK/STAT3.....	154
Figure 35. Rôles de différentes PRMT dans la modulation de la transcription dépendante de NF-κB	156
Figure 36. Rôles ambivalents de PRMT2 dans la progression tumorale.....	159
Figure 37. Étude de l'interaction entre PLZF et PRMT2	163
Figure 38. Rôles putatifs de PRMT2 sur le contrôle la voie de signalisation NF-κB	165
Figure 39. Expression de PRMT2 lors de la différenciation des HL-60.....	168

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des leucémies aiguës myéloïdes selon l’OMS (5 ^{ème} édition).....	62
Tableau 2. Composés inhibiteurs des PRMT et utilisation sur des modèles d’hémopathies malignes	71
Tableau 3. Essais cliniques impliquant des inhibiteurs de PRMT dans des hémopathies malignes	74
Tableau 4. Substrats connus de PRMT2.....	80
Tableau 5. Références et détails des anticorps ciblant PRMT2 testés dans le projet	97
Tableau 6. Liste des protéines méthylées interagissant avec PRMT2	143

Abréviations

53BP1 : *TP53-Binding Protein 1*

5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

5mC : 5-méthylcytosine

ADMA : *Asymmetric Dimethyl Arginine*

ATRA : *All-Trans Retinoic Acid*

BCL : *B-Cell Lymphoma*

BET : *Bromodomain and Extra-Terminal motifs*

BM : *Bone Marrow*

BMDM : *BM-Derived Macrophages*

BMP : *Bone Morphogenetic Protein*

BRD4 : *Bromodomain-containing protein 4*

BTB : *Broad-complex, Tramtrack, and Bric-à-brac*

CARM1 : *Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1*

CASP1 : *Caspase 1*

CCR : *Carcinome à Cellules Rénales*

CDK : *Cyclin-Dependent Kinase 4*

CGI : *CpG Island*

CHC : *Carcinome Hépatocellulaire*

CHIP : *Carboxy-terminus of Hsc70 Interacting Protein*

CHK1 : *Checkpoint Kinase 1*

CMH : *Complexe Majeur d'Histocompatibilité*

Cobl : *Cordon-bleu*

CSH : *Cellule Souche Hématopoïétique*

CSL : *Cellule Souche Leucémique*

DDR : *DNA damage response*

DNMT : *DNA Methyltransferase*

E2F : *E2 Promoter Binding Factor*

EGF : *Epidermal Growth Factor*

ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase*

Er α : *Estrogen Receptor alpha*

FLT3 : *Fms Like Tyrosine kinase 3*

GAPDH : *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*

GBM : *Glioblastome Multiforme*

GSEA : *Gene Set Enrichment Analysis*

GSK3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β*

HDAC : *Histone Deacetylase*

HEK293 : *Human Embryonic Kidney 293*

HIF-1 α : *Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha*

hnRNP : *Heterogeneous Ribonucleoprotein Particle*

HOXA9 : *Homeobox protein Hox-A9*

HP1 : *Heterochromatin Protein 1*

IFN : Interféron
IL : Interleukine
ING4 : *Inhibitor of Growth protein 4*
IRES : *Internal Ribosome Entry Site*
IRF3 : *Interferon Regulatory Factor 3*
IκBα : *NF-κB inhibitor alpha*

JAK2 : *Janus Kinase 2*

KAT : Lysine Acétyltransférase
KDM : Lysine Déméthylase
KMT : Lysine Méthyltransférase

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LAM : Leucémie Aiguë Myéloblastique ou Myéloïde
LAP : Leucémie Aiguë Promyélocytaire
LDGC-B : Lymphome Diffus à Grandes Cellules B
LILRB4 : *Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor subfamily B member 4*
LKB1 : *Liver Kinase B1*
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LNH : Lymphome Non Hodgkinien
LSK : Cellules Lin⁻cKit⁺Sca1⁺
LPS : Lipopolysaccharides
LT-HSC : *Long-Term Hematopoietic Stem Cell*

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MDS : *Myelodysplastic Neoplasm*
MEF : *Mouse Embryonic Fibroblast*
MEP50 : *Methylosome Protein 50*
METTL : *Methyltransferase-Like*
miARN : microARN
MLL : *Mixed-Lineage Leukemia*
MM : Myélome Multiple
MMA : *Monomethyl Arginine*
MP : *Myosine Phosphatase*
MPN : *Myeloproliferative Neoplasm*
MPT : Modification Post-Traductionnelle
MTA : Méthylthioadénosine
mTOR : *mammalian Target of Rapamycin*

NF-κB : *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NHEJ : *Non-Homologous End Joining*
NK : *Natural Killer*

PAD : Peptidyl Arginine Désaminases
PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
PICln : *Chloride nucleotide-sensitive channel 1*
PLZF : *Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger*
Pol β : ADN Polymérase bêta
POMC : Proopiomélanocortine
PRMT : Protéine Arginine Méthyltransférase

RH : Recombinaison Homologue
RISC : *RNA-Induced Silencing Complex*
RNF4 : *RING Finger protein 4*
ROK : *Rho-activated Kinase*
RPS2 : *40S Ribosomal Protein S2*
RUNX1 : *Runt-related transcription factor 1*

SAH : S-Adénosyl-L-Homocystéine
SAM : S-Adénosylméthionine
SAM68 : *Src-Associated substrate in Mitosis of 68 kDa*
SDMA : *Symmetric Dimethyl Arginine*
SF3B : *Splicing Factor 3B*
SH3 : *Src Homology 3*
SIRT1 : Sirtuine-1
SMN : *Survival Motor Neuron*
snRNP : *small nuclear Ribonucleoprotein Particle*
SRSF1 : *Serine/arginine-Rich Splicing Factor 1*
STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*
SUMO : *Small Ubiquitin-Related Modifier*

TAK1 : *Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1*
TCERG1 : *Transcription Elongation Regulator 1*
TET : *Ten-Eleven Translocation*
TGF : *Transforming Growth Factor*
TLR4 : *Toll-Like Receptor 4*
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
TP53 : *Tumor Protein P53*
TPO : *Thrombopoïétine*
TPR : *Tetratricopeptide Repeats*
TSS : *Transcription Start Site*

WAS : *Wiskott-Aldrich Syndrome protein*
WIPF1 : *WAS/WASL-interacting protein family member 1*
WT : *Wild-Type*

INTRODUCTION

I. Le contrôle épigénétique de l'expression de gènes

A. L'avènement du concept d'épigénétique

Le mot épigénétique a été formé à partir du mot *épigénèse*, lui-même dérivé du préfixe grec *epi-* (sur, au-dessus) et du suffixe *-genesis* (création, formation) ainsi que du mot *génétique*. Il a été utilisé pour la première fois en 1942 par le biologiste et généticien Conrad Waddington, qui le définissait comme « l'ensemble des processus impliqués dans le mécanisme par lequel les gènes du génotype produisent des effets phénotypiques [1]. »

En 1999, le groupe d'Emma Whitelaw a décrit la transmission héréditaire d'une modification épigénétique au locus *agouti* chez la souris. La transcription provenant d'un rétrotransposon IAP (*Intracisternal A Particle*) inséré en amont du gène *agouti* provoque une expression aberrante de la protéine associée, formant des souris à la fourrure jaune, sensibles à l'obésité et au diabète. Néanmoins, les souris avec ce génotype présentent des couleurs de poils variées et les auteurs révèlent que ces différences de pelage s'expliquent par une réduction au silence du rétrotransposon à travers sa méthylation, et que celle-ci se transmet de génération en génération [2].

En 2003, l'équipe de Randy Jirtle a montré qu'en nourrissant ces mêmes souris gestantes avec des aliments riches en donneurs de méthyles, il est possible de modifier le phénotype de leur progéniture par le biais d'une méthylation CpG accrue au locus *agouti*. De ce fait, le nombre d'individus jaunes obèses baisse parmi les petits, démontrant le caractère réversible des marques épigénétiques [3].

L'épigénétique a, par la suite, été redéfinie. Elle est à ce jour généralement acceptée comme étant « l'étude des changements dans la fonction des gènes qui sont mitotiquement et/ou méiotiquement héréditaires, qui n'impliquent pas de changement dans la séquence de l'ADN et qui sont réversibles [4]. » Les modifications épigénétiques décrites dans la littérature actuelle comprennent les modifications post-traductionnelles sur la séquence d'acides aminés des histones, les variants d'histones et les modifications covalentes des bases de l'ADN ainsi que des ARN.

B. Modifications épigénétiques

1. Le cas particulier des microARN

Les miARN (microARN) constituent une catégorie de petits ARN simples brins, non codants, ayant une longueur entre 21 et 24 nucléotides. Ces petits ARN ont pour fonction de contrôler négativement l'expression de certains gènes en s'appariant de manière spécifique à un ARN messager (ARNm) cible.

La biogenèse des miARN canoniques commence par la génération de longs transcrits primaires de miARN (pri-miARN). Ceux-ci sont transformés dans le noyau en ARN structurés en épingle à cheveux (pré-miARN) par la ribonucléase de type III appelée Drosha, associée à la protéine DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*). Après leur export vers le cytoplasme grâce à l'exportine-5, les pré-miARN sont clivés par la ribonucléase de type III Dicer. Cela libère un duplex de 21 à 24 nucléotides contenant un brin passager et un brin guide, correspondant au miARN mature. Ce dernier est ensuite pris en charge par les protéines composant le RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*). Les protéines argonautes (Ago) qui y sont présentes clivent le brin passager lors de l'appariement entre le miARN et sa cible (**Figure 1**) [5]. D'autre part, de multiples voies de biogenèse indépendantes des protéines Drosha ou Dicer ont également été caractérisées pour plusieurs classes de miARN non canoniques, qui ne seront pas détaillées ici.

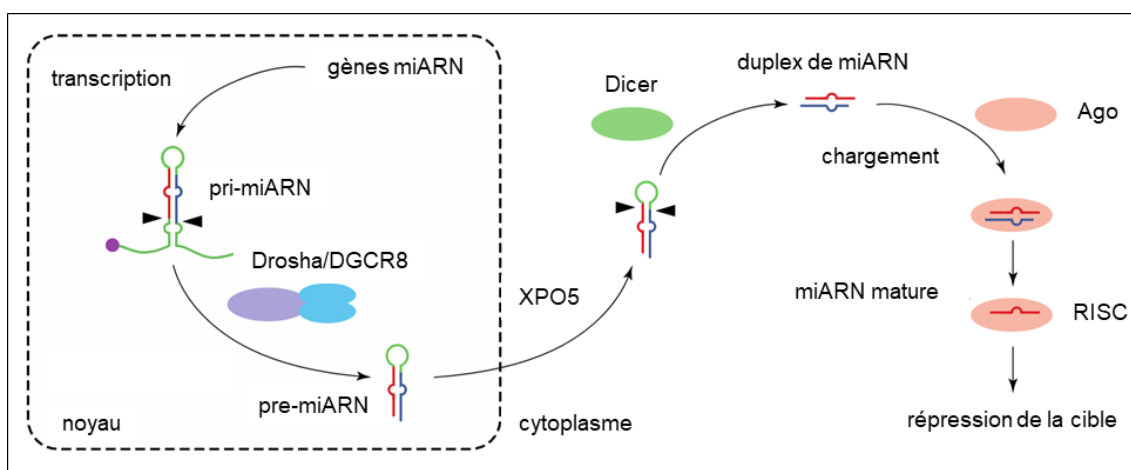


Figure 1. Représentation schématique simplifiée de la biogenèse des miARN canoniques. XPO5 : exportine-5. Schéma adapté de Matsuyama & Suzuki, 2019 [5].

Les mécanismes par lesquels la complémentarité du miARN avec sa cible entraîne la répression sont divers. Dans certains cas, le miARN est totalement complémentaire, ce qui provoque le clivage de l'ARNm suivi de sa dégradation. Cette dégradation spécifique de la séquence dépend de l'hydrolyse de l'ARN, ce qui entraîne un blocage quasi-total de l'expression du gène. Lorsque la complémentarité du miARN avec sa cible est moindre, un mécanisme de répression de la traduction se met en place. Néanmoins, il existe des cas où la cible est dégradée même en absence d'une complémentarité parfaite [6].

Les miARN font actuellement débat dans la communauté scientifique : Doit-on les considérer comme faisant partie des mécanismes de régulation épigénétique dans la cellule ? En effet, les miARN pourraient agir comme des modulateurs épigénétiques en ciblant les gènes codant des enzymes clés responsables des mécanismes épigénétiques telles que les ADN méthyltransférases ainsi que les histones désacétylases et les méthyltransférases. En outre, l'expression des miARN est également régulée par la machinerie épigénétique, créant ainsi une boucle de rétroaction [7].

Contrairement aux mécanismes épigénétiques classiques qui contrôlent l'expression des gènes au niveau transcriptionnel (modifications des histones, méthylation de l'ADN, variants d'histones), les miARN fonctionnent principalement au niveau post-transcriptionnel, ce qui les différencie de ces derniers. En effet, la littérature ne contient actuellement aucune preuve de l'implication directe des miARN endogènes dans le silençage transcriptionnel des gènes [8].

2. La méthylation des ARN : l'épitranscriptome

La modification interne de l'ARNm la plus répandue est la méthylation de l'adénosine (m6A). Elle est principalement catalysée par un complexe de méthyltransférases (appelées « *writers* », ou écrivains) composé de METTL3 (*Methyltransferase-Like 3*) et METTL14 ainsi que de sous-unités protéiques supplémentaires. Cette même adénosine peut être déméthylée par les protéines FTO ou ALKBH5 (dites « *erasers* », ou effaceurs). La marque m6A est reconnue par des protéines « *readers* », ou lectrices, qui remplissent de multiples fonctions dans le noyau ou le cytoplasme, dont certaines ont été identifiées : YTHDF1, -2, -3, YTHDC1, -2, HNRNPC, HNRNPG, HNRNPA2B1 et IGF2BP.

En tant que marque épitranscriptomique prépondérante, la m⁶A joue un rôle essentiel dans l'épissage, la polyadénylation, l'exportation, la traduction, la stabilité, la structure de l'ARNm, etc. [9]. Il existe également une marque m¹A, un isomère de m⁶A avec le groupe méthyle en position N¹ au lieu de N⁶.

L'existence de la méthylation des cytosines dans les ARNm a été difficile à prouver en raison de sa faible prévalence et de l'absence de détection efficace, mais il a été récemment démontré que la protéine humaine NSUN2 (*NOP2/Sun domain family, member 2*) est actuellement la seule méthylase responsable de la marque 5mC (5-méthylcytosine) des ARNm. Néanmoins, les rôles précis de cette marque restent à élucider [10].

3. La méthylation de l'ADN

Historiquement, la méthylation de l'ADN a été découverte chez les mammifères lorsque l'ADN a été déterminé comme matériel génétique. En 1948, Rollin Hotchkiss a découvert pour la première fois une cytosine modifiée correspondant à la 5mC, qu'il appela « épicytosine » dans une préparation de thymus de veau par chromatographie sur papier [11]. Robert Sinsheimer remarqua que la 5mC n'était pas distribuée au hasard dans l'ADN, mais qu'elle se trouvait spécifiquement dans le contexte des dinucléotides CpG [12]. Bien que de nombreux chercheurs aient proposé que la méthylation de l'ADN puisse contrôler l'expression des gènes, ce n'est que dans les années 1980 que plusieurs études ont démontré que la méthylation de l'ADN était impliquée dans la régulation des gènes et la différenciation cellulaire.

La méthylation de l'ADN est catalysée par les protéines de la famille des DNMT (*DNA Methyltransferases*) qui transfèrent un groupement méthyle de la SAM (S-Adénosylméthionine) au cinquième carbone d'un résidu de cytosine pour former la 5mC. Les protéines DNMT3a et DNMT3b peuvent établir un nouveau schéma de méthylation sur l'ADN non modifié et sont donc connues sous le nom de DNMT *de novo*. De plus, l'enzyme DNMT1 fonctionne pendant la réplication de l'ADN afin de recopier le schéma de méthylation de l'ADN du brin d'ADN parental sur le brin nouvellement synthétisé. Elle est considérée dans ce cas comme d'une DNMT de maintien (**Figure 2**) [13].

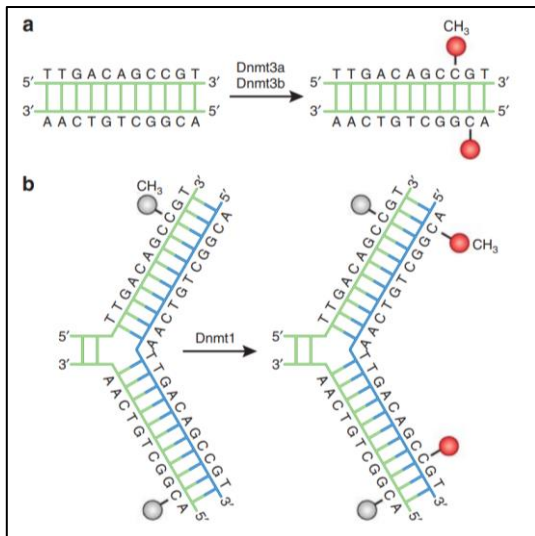


Figure 2. Voies de méthylation de l'ADN. a. Les DNMT3a et DNMT3b transfèrent des groupes méthyles (rouge) sur l'ADN nu. b. La DNMT1 est la DNMT de maintien : lorsque l'ADN subit une réplication, le support d'ADN parental conserve le schéma de méthylation original de l'ADN (gris). La DNMT1 réplique précisément le schéma de méthylation original de l'ADN en ajoutant des groupes méthyles sur le brin nouvellement formé (bleu). Schéma issu de Moore *et al.*, 2013 [13].

La cytosine ainsi méthylée peut également subir des modifications subséquentes telles que son hydroxylation par les protéines TET (*Ten-Eleven Translocation*), formant la 5hmC (5-hydroxyméthylcytosine) ainsi que les produits d'oxydation qui en découlent : la 5-formylcytosine et la 5-carboxylcytosine. La 5mC et la 5hmC sont relativement stables et abondantes dans le génome des mammifères, tandis que les deux produits d'oxydation sont, quant à eux, très rares. Ces derniers peuvent être transitoirement éliminés par la TDG (*Thymine DNA Glycosylase*) et sont plutôt considérés comme des intermédiaires actifs de la déméthylation de l'ADN [14,15].

Chez les vertébrés, les dinucléotides CpG sont généralement hyperméthylés, tandis que les CGI (*CpG Islands*, pour îlots CpG), régions d'ADN génomique d'environ 1 kb riches en CpG, sont associés aux promoteurs de gènes et sont hypométhylés. Les CGI situés sur les chromosomes X inactifs des cellules constituent une exception, ceux-ci étant hyperméthylés. Outre les CGI canoniques situés sur les TSS (*Transcription Start Sites*) annotés, des CGI orphelins, dont la fonction est inconnue, se trouvent à l'intérieur des corps de gènes (intragéniques) ou entre ceux-ci (intergéniques). Les CGI non méthylés à l'extrémité 5' de plusieurs gènes sont positivement corrélés avec l'activité transcriptionnelle, tandis qu'un petit nombre de gènes sont hyperméthylés au niveau de leurs CGI sur leurs promoteurs et sont réprimés (**Figure 3**). Les corps des gènes sont souvent méthylés, la méthylation de l'ADN étant plus élevée au niveau des exons que des introns, et la 5hmC est présente au niveau des corps des gènes exprimés [16].

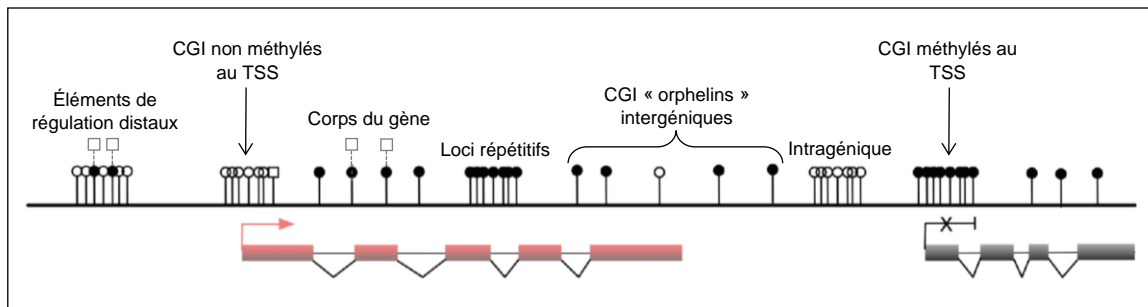


Figure 3. Distribution des îlots CpG dans les génomes de mammifères. Carrés blancs sur le corps de gène : enzymes TET ; cercles blancs : CpG non méthylés ; cercles noirs : CpG méthylés ; carrés blancs : CpG hydroxylés ; cases rouges : exons actifs et transcrits ; cases noires : exons inactifs et réduits au silence ; les états transcriptionnels de ces gènes sont représentés par la flèche rouge (actif) et la croix noire (inactif). Schéma adapté de Meng *et al.*, 2015 [16].

La méthylation de l'ADN réprime la transcription de gènes cibles en recrutant des protéines MBD (*Methyl-CpG Binding Domain*) et plusieurs protéines à doigt de zinc et à domaine BTB (*Broad-complex, Tramtrack, and Bric-à-brac*) : ZBTB33, -4 et -38, qui n'ont pas de lien structurel avec le CpG méthylé. Il est généralement admis que ces protéines s'associent à l'activité des histone désacétylases et participent à l'état fermé de la chromatine [17].

4. Les variants d'histones

Les nucléosomes sont formés d'un noyau octamérique composé de deux molécules d'histones H2A, H2B, H3 et H4, avec une superhélice de 145 à 147 paires de bases d'ADN organisée autour de cet octamère. L'histone H1, quant à elle, se lie au nucléosome au point d'entrée/sortie de l'ADN et protège l'ADN qui relie les nucléosomes adjacents. Elle participe également à la compaction de la chromatine sur elle-même pour former une fibre de 30 nm. Les histones sont codées par de multiples copies alléliques et non alléliques de gènes, donnant lieu à différents sous-types avec diverses séquences.

Les histones canoniques sont presque exclusivement exprimées pendant la phase S du cycle cellulaire et incorporées dans la chromatine en fonction de la réplication de l'ADN, tandis que les variants d'histones indépendants de la réplication (aussi appelées histones de remplacement) sont exprimés tout au long du cycle cellulaire [18].

Une autre différence notable entre les histones canoniques et les variants est que les gènes codant pour les histones canoniques sont dépourvus d'introns et leurs ARNm ne sont pas polyadénylés, contrairement aux pré-ARNm des variants d'histones qui contiennent des introns, pouvant subir un épissage alternatif et être polyadénylés [19].

Ces variants d'histones font l'objet d'un échange dynamique et leur dépôt ainsi que leur éviction sélective et/ou leur recyclage sont pris en charge par des chaperons spécifiques ou des complexes de remodelage de la chromatine qui reconnaissent les différences d'acides aminés entre ces variants et leurs homologues canoniques. L'incorporation de variants d'histones dans la chromatine contribue à la diversité de la structure et de la fonction des nucléosomes. De plus, la dérégulation de l'expression et du dépôt des variants d'histones s'avère impliquée dans des syndromes du développement et dans les cancers [20].

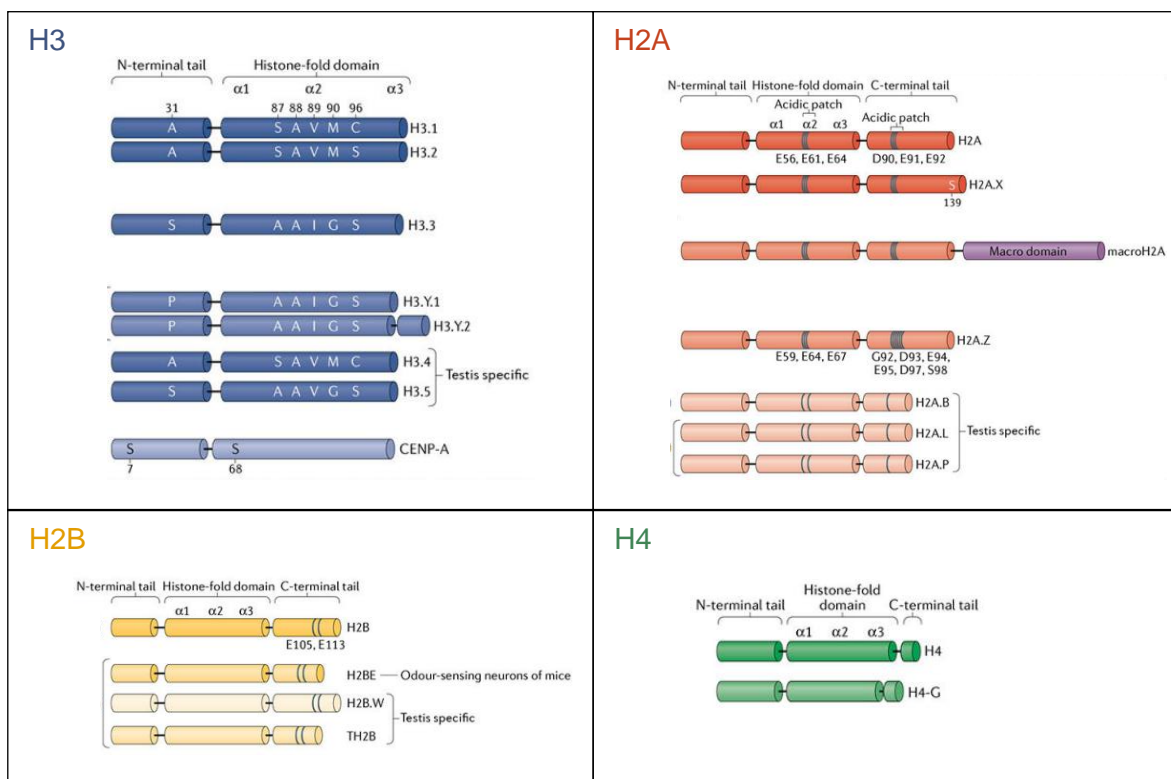


Figure 4. Les différentes histones et leurs variants. Les résidus d'acides aminés spécifiques sont illustrés soit au niveau des différences clés entre les membres d'une famille commune de protéines d'histones, soit au niveau de modifications post-traductionnelles spécifiques à un variant. Schéma adapté de Martire & Banaszynski, 2020 [21].

Des variants ont été mis au jour pour toutes les histones (**Figure 4**) et il existe au moins trois grandes catégories de rôles fonctionnels qui leur sont associés. Les variants confèrent tout d'abord aux nucléosomes des propriétés physiques différentes. Deuxièmement, grâce à l'interaction avec leurs domaines uniques et leurs systèmes de chaperons, les variants favorisent la formation de complexes associés à la chromatine dans des régions spécifiques du génome.

Enfin, sur la base de leur localisation génomique spécifique (c'est-à-dire la colocalisation avec des enzymes spécifiques de modification de la chromatine) et de leur séquence unique, les variants d'histones sont souvent enrichis en MPT (Modifications Post-Traductionnelles) spécifiques ou peuvent même porter des MPT uniques par rapport aux histones canoniques [21].

5. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les histones sont des protéines dont la structure est plutôt unique. Outre le « corps » de l'histone, l'extrémité N-terminale de la séquence en acides aminés est linéaire et exposée vers l'extérieur du nucléosome. Les histones H2A et H2B comportent également une queue située à l'extrémité C-terminale. Les MPT de certains résidus d'acides aminés du corps des histones sont possibles et peuvent moduler la structure des nucléosomes et l'accessibilité de l'ADN. Néanmoins dans ce chapitre d'introduction, ce sont les MPT des queues d'histones qui seront principalement discutées.

Les MPT des queues d'histones agissent sur le statut de la chromatine, influençant la transcription des gènes situés sur le brin d'ADN enroulé autour du nucléosome concerné. L'euchromatine (ou chromatine décondensée) favorise l'accès des facteurs et complexes de transcription à l'ADN tandis que l'hétérochromatine (ou chromatine condensée) l'empêche, réprimant *de facto* la transcription des gènes localisés sur l'ADN enroulé autour du ou des nucléosomes concernés (**Figure 5**).

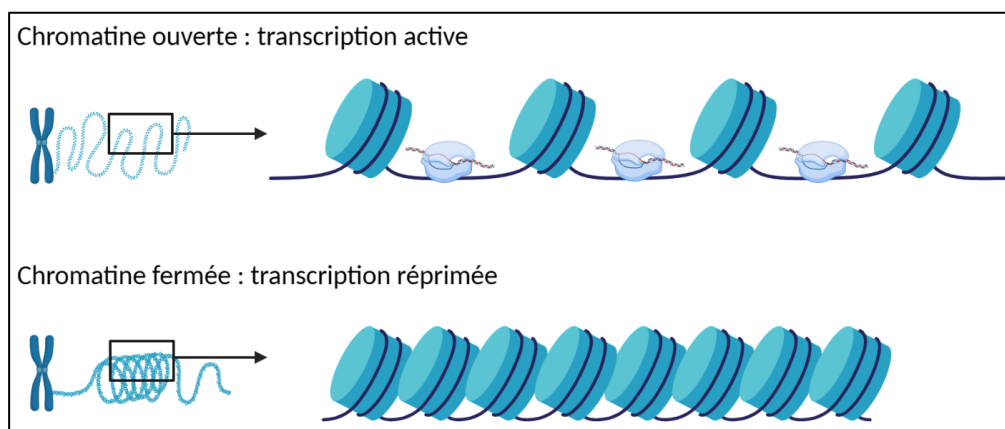


Figure 5. Statut de la chromatine et effet sur la transcription de gènes. Une chromatine ouverte favorise l'interaction de l'ADN avec des facteurs de transcription ainsi que l'ARN polymérase, entraînant une hausse de la transcription des gènes situés sur la partie de la chromatine qui est dite ouverte. À l'inverse, sa fermeture empêche la fixation de facteurs de transcription. Schéma réalisé avec BioRender.

a) *Acétylation et autres acylations*

L'acétylation est une modification post-traductionnelle très répandue et réversible des protéines, régulée par deux classes d'enzymes : les KAT (Lysines Acétyltransférases), qui catalysent le transfert d'un groupe acétyle sur un résidu lysine, et les KDAC (Lysines Désacétylases), qui catalysent l'élimination de ce groupe. Les protéines que les KAT acétylent avec la stœchiométrie la plus élevée sont les histones (**Figure 6**) [22].

L'acétylation des lysines par les HAT permet de neutraliser leur charge positive, ce qui a pour conséquence une perturbation des interactions entre nucléosomes. Il a été démontré que l'acétylation de H4K16 inhibe la formation d'hétérochromatine. L'accession des facteurs de transcription à l'ADN est ainsi facilitée.

Une majorité des résidus lysine acétylés est capable de recruter des co-activateurs transcriptionnels possédant un bromodomaine. L'acétylation des histones est fortement corrélée au taux de transcription des gènes, tandis que la désacétylation des résidus lysine par les HDAC (Histone Désacétylases) est associée à un état répressif de la transcription [23]. L'acétylation des histones est également importante dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, notamment dans le cadre des cassures double-brin [24].

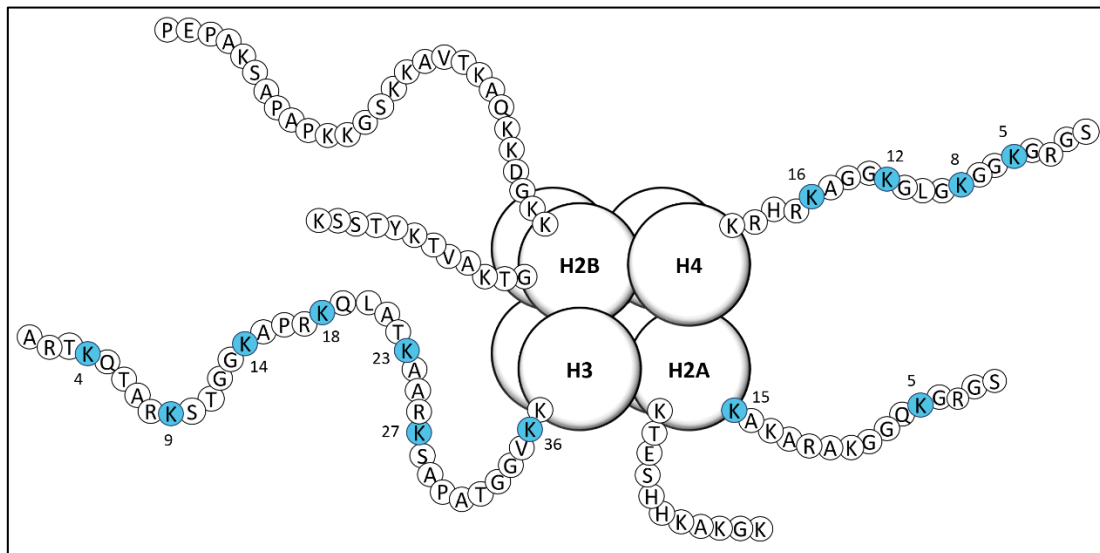


Figure 6. Les différentes acétylations des queues d'histones. Les résidus lysine acétylés apparaissent en bleu et leur position sur la séquence protéique est précisée.

Les activités des HAT et des HDAC sont généralement corrélées respectivement à l'activation des gènes et à leur répression. Les HAT sont classées en cinq sous-familles, selon l'homologie de séquence de leurs domaines HAT :

- HAT1, nommée histone acétyltransférase 1 en tant que membre fondateur de la superfamille (ou KAT1 selon la nouvelle nomenclature [25]) ;
- Gcn5/PCAF, nommée d'après son membre fondateur dans la levure, Gcn5, et son orthologue humain, PCAF (ou KAT2A/KAT2B) ;
- MYST, nommée d'après les membres fondateurs MOZ, Ybf2, Sas2, et TIP60 (ou KAT5) ;
- p300/CBP, nommée d'après les deux paralogues humains p300 et CBP (ou KAT3B/KAT3A) ;
- Rtt109, nommée d'après son identification initiale en tant que régulateur du produit 109 du gène de transposition Ty1 (ou KAT11) [26].

Les HDAC sont, quant à elles, divisées en catégories distinctes, appelées classes, sur la base de similarités de séquence. Les protéines de classe I (HDAC1 à HDAC3 et HDAC8) présentent une similarité de séquence avec la protéine Rpd3 de la levure, celles de classe II (HDAC4 à HDAC7, HDAC9 et HDAC10) avec la protéine Hda1 de levure et celles de classe III (SIRT1 à SIRT7) avec la protéine Sir2 de levure. L'unique protéine de classe IV, HDAC11, présente des similitudes de séquence avec les protéines de classe I et II [27].

Les propriétés chimiques des acylations plus récemment décrites correspondent à des variations de l'acétylation et peuvent être classées en trois groupes sur la base de leurs structures chimiques par rapport à la lysine acétylée. Tout d'abord, les groupes acyles hydrophobes qui comprennent les groupes propionyle, butyryle, crotonyle et benzoyle, ont des chaînes d'hydrocarbures étendues, qui augmentent l'hydrophobie et le volume du résidu. Ensuite, les groupes acyles polaires, qui comprennent les groupes β -hydroxybutyryle et 2-hydroxyisobutyryle, possèdent un groupe hydroxyle qui permet au résidu de former des liaisons hydrogène avec d'autres molécules. Enfin, les groupes acyles acides, chargés négativement, comprennent les groupes lactyle, malonyle, succinyle et glutaryle, qui modifient la charge du résidu de +1 à -1, ce qui les distingue des autres acylations (**Figure 7**) [28].

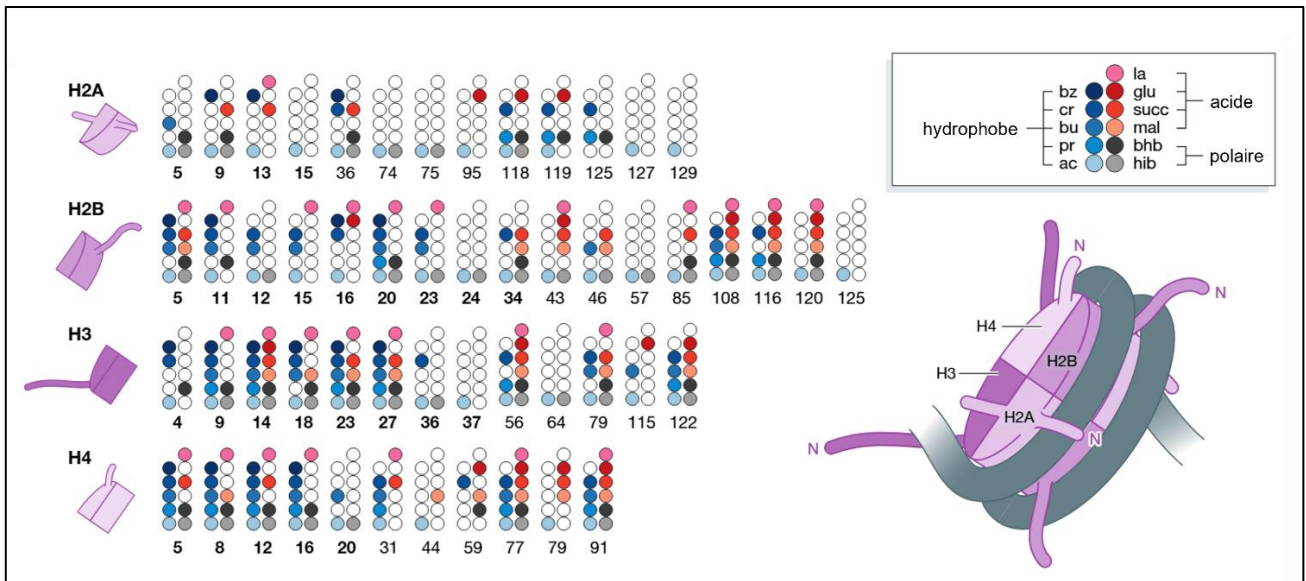


Figure 7. Les différentes classes d'acylations des queues d'histones et leurs cibles. Abréviations : ac : acétylation ; pr : propionylation ; bu : butyrylation ; cr : crotonylation ; bz : benzoxylation ; hib : 2-hydroxyisobutyrylation ; bhb : β -hydroxybutyrylation ; la : lactylation ; mal : malonylation ; succ : succinylation ; glu : glutarylation. Schéma adapté de Nitsch *et al.*, 2021 [29].

Les donneurs de groupes acyles sont des produits du métabolisme cellulaire. Ainsi, des acylations d'histones distinctes peuvent relier l'état métabolique d'une cellule à l'architecture de la chromatine et contribuer à l'adaptation cellulaire par le biais de changements dans l'expression des gènes. À ce jour, divers défis techniques limitent encore notre compréhension de l'impact réel de la plupart des acylations d'histones sur la dynamique de la chromatine et de leur pertinence biologique [29].

b) Méthylation

La méthylation des histones est un processus dynamique clé dans le développement et la différenciation cellulaire. Bien qu'il fût admis qu'elle était souvent associée à la répression de l'expression des gènes, il a été démontré que les résultats de la méthylation sur les histones dépendent fortement du contexte et peuvent être associés à différents statuts d'expression génique. La méthylation des histones se déroule sur les atomes d'azote de la chaîne latérale de certains résidus lysine et arginine situés sur les histones H3 et H4 (**Figure 8**).

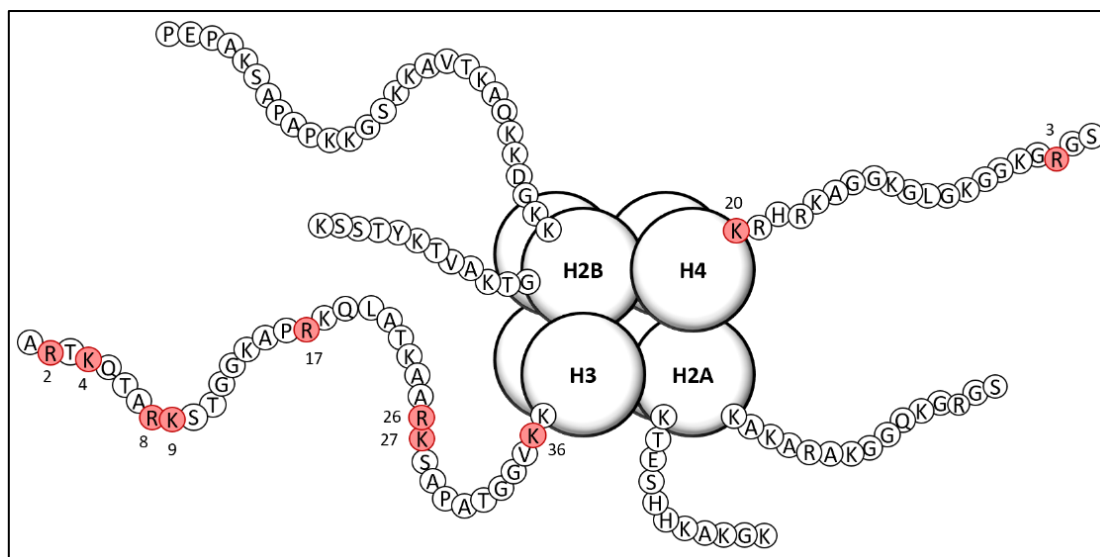


Figure 8. Les différentes méthylations des queues d'histones. Les résidus lysine et arginine méthylés apparaissent en rouge et leur position sur la séquence protéique est précisée.

Un résidu lysine peut être mono-, di- ou triméthylé par huit grandes classes de complexes de KMT (Lysine Méthyltransférases) : KMT1 à KMT8, possédant chacun un substrat et un rôle différent sur la transcription des gènes cibles [30,31]. En outre, il a été mis en évidence que la méthylation de résidus lysine est un processus réversible grâce à la découverte de LSD1 (*Lysine-Specific histone Demethylase 1A*, aussi appelée KDM1A) [32]. Néanmoins, il existe au moins six familles de KDM (Lysine Déméthylases) ayant chacune des fonctions à la fois uniques et communes. Par exemple, KDM1A et KDM1B peuvent déméthyliser les résidus lysine mono- et diméthylés mais pas ceux qui sont triméthylés, contrairement à tous les autres membres de la famille qui possèdent un domaine Jumonji (JmjC) [33].

Les différents rôles de la méthylation des résidus lysine sur les queues des histones sont connus et dépendent en grande partie de la pathologie qui est étudiée. Globalement, la méthylation des résidus lysine est impliquée dans le remodelage de la chromatine. Plus précisément, la méthylation de H4K20 est associée aux mécanismes de réparation de l'ADN et à la réplication. La marque H3K4me est impliquée dans le *crossstalk* avec les marques d'acétylation ainsi que le cycle cellulaire et l'apoptose. La méthylation de H3K9 affecte la méthylation de l'ADN et les processus de transcription. Enfin, H3K36me est associée aux mécanismes d'épissage des ARN ainsi que dans la réparation de l'ADN. Les rôles précis de la méthylation de H3K27 sont, quant à eux, peu connus [30].

Outre les états versatiles de méthylation des résidus lysine, les résidus arginine peuvent également être modifiés grâce à la monométhylation ainsi que la diméthylation symétrique ou asymétrique, catalysées principalement par l'ensemble des membres de la famille des PRMT (protéines arginine méthyltransférases), dont les structures et rôles sont détaillés dans la partie II de cette introduction.

La seule enzyme décrite à ce jour pour son activité de déméthylation des arginines est la protéine JMJD6 (*JuMonji Domain-containing protein 6*) qui est dite bifonctionnelle. En effet, elle a été découverte en tant que récepteur de phosphatidylsérine, mais il est désormais considéré qu'elle agit à la fois comme arginine déméthylase et lysine hydroxylase. Elle est notamment capable de déméthyliser ER α (*Estrogen Receptor α*) [34,35]. L'élimination de la méthylation d'un résidu arginine peut également se faire par le biais de sa citrullination par la famille des PAD (Peptidyl Arginine Désaminases), dont seul le membre PAD4 est connu pour catalyser la citrullination des résidus arginine situés sur les queues des histones [36].

c) *Phosphorylation*

La phosphorylation des queues d'histones leur ajoute une charge négative, modifiant ainsi la conformation de la structure de la chromatine et les interactions avec les facteurs de transcription. Plusieurs études ont mis en évidence la phosphorylation de différents résidus sérine et thréonine sur les queues des histones (**Figure 9**).

Dans le zygote de souris, il a été montré que le degré et la distribution de la méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9) et de l'ADN sont influencés par l'état de phosphorylation de la sérine 10 et la thréonine 11 situées sur H3. Cette MPT aide à la stabilisation de H3K9me2 pendant le premier cycle cellulaire, très probablement en protégeant la chromatine contre une activité de déméthylation spécifique de K9 [37]. Les sites cibles de la phosphorylation des résidus sérine H3S10 et H3S28 font partie d'un même motif « ARKS ». Dans les cellules de mammifère, la phosphorylation de ces sites dépend de l'activité de la kinase Aurora-B [38].

Les schémas de phosphorylation des résidus thréonine 3 et 11 diffèrent clairement de ceux de la phosphorylation de la sérine 10. Néanmoins, il est intéressant de noter que si les trois modifications sont présentes dans les régions chromosomiques attachées à l’enveloppe nucléaire au cours de la prophase, elles se concentrent ensuite rapidement sur des territoires différents. Cela suggère que des « vagues » de phosphorylation et de déphosphorylation balaient les chromosomes aux premières phases de la mitose et créent des zones contenant des formes différentes de H3 phosphorylée [39,40].

Le groupe de David Allis a rapporté que les résidus sérine en première position de la queue des histones H2A et H4 sont fortement phosphorylés dans la chromatine mitotique du ver, de la mouche et des mammifères. La phosphorylation mitotique de H2AS1 et H4S1 a une chronologie et une localisation similaires à celles de la phosphorylation de l’histone 3. Elle est également étroitement liée aux événements de condensation de la chromatine au cours de la mitose [41].

Une autre étude du même groupe montre une phosphorylation de H2BS14 par la kinase MST1 (*Mammalian Sterile Twenty*). Cette phosphorylation dépend du clivage de cette dernière par la caspase 3. Il s’agit de la première description d’un phénomène épigénétique étroitement lié à la mort cellulaire programmée [42]. Néanmoins, ces deux études sont relativement restreintes et anciennes, sans autre étude confirmant ces découvertes.

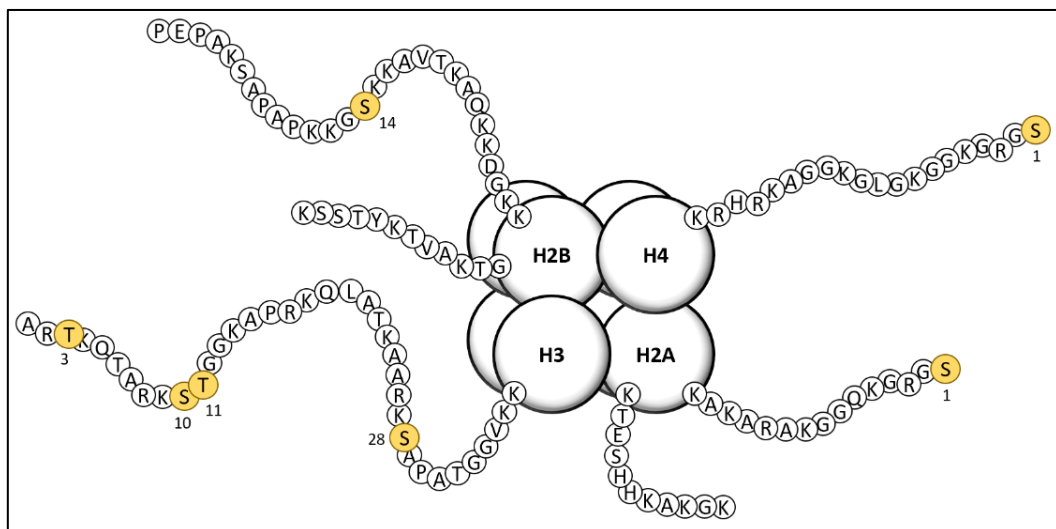


Figure 9. Les différentes phosphorylations des queues d’histones. Les résidus sérine et thréonine phosphorylés apparaissent en jaune et leur position sur la séquence protéique est précisée.

d) *Autres modifications*

D'autres MPT des histones, moins courantes ou moins étudiées, ont été mises au jour. L'une d'entre elles correspond à la citrullination des résidus arginine des histones, c'est-à-dire l'hydrolyse d'une arginine non modifiée (ou monométhylée par les PRMT, enzymes qui sont détaillées ci-après) en citrulline. Cette réaction est catalysée par la famille d'enzymes PAD, qui comporte cinq membres. Néanmoins, la fonction biologique exacte de la citrullination des histones n'est pas encore clairement établie et diverses hypothèses suggèrent son importance dans le *crossstalk* entre les différentes MPT, aussi appelé code histone, dans le cadre d'une analogie avec le code génétique (**Figure 10**) [36].

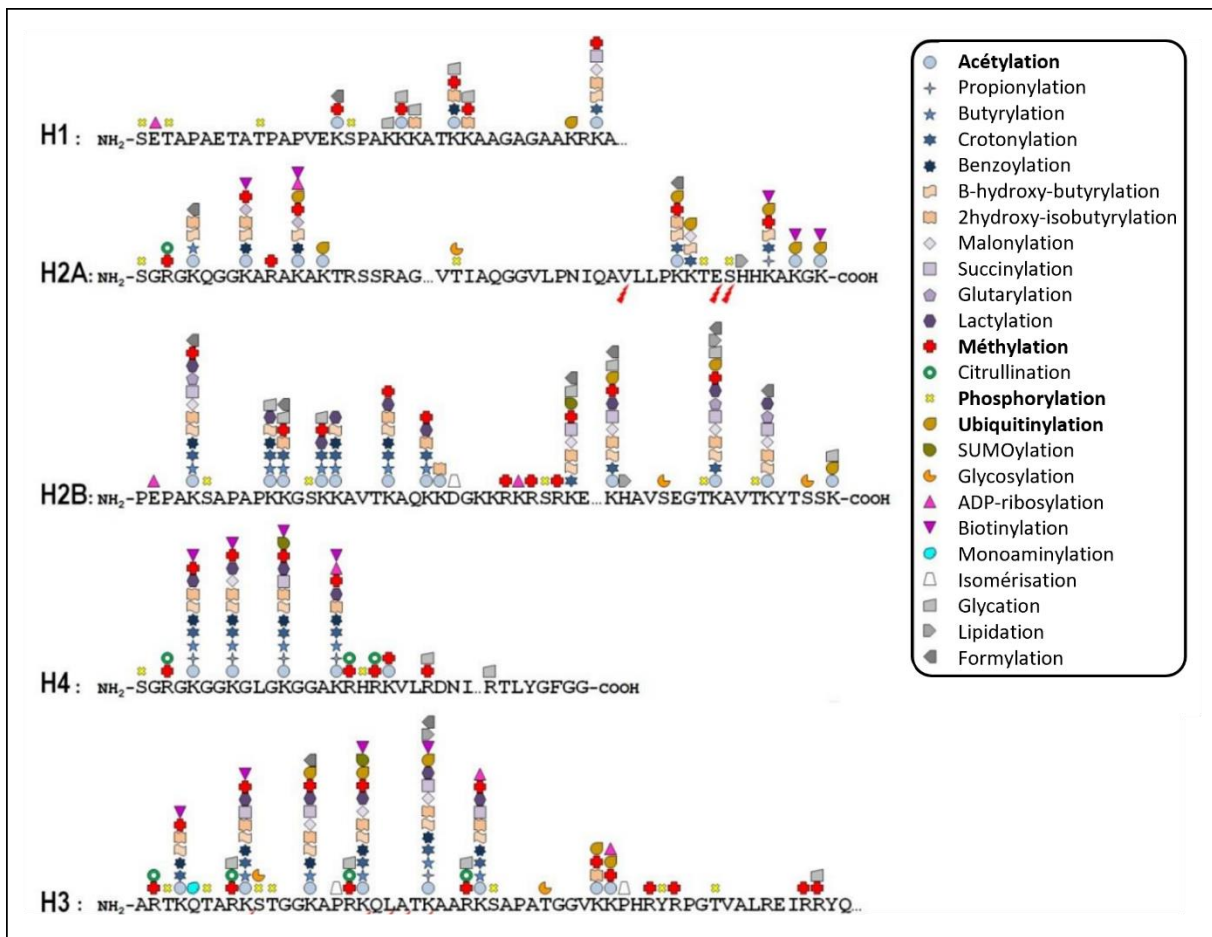


Figure 10. Liste non exhaustive des différentes modifications post-traductionnelles des queues d'histones. Les modifications les plus étudiées apparaissent en gras. Schéma adapté de Cavalieri, 2021 [43].

Les résidus lysine des histones peuvent aussi être ubiquitinylés. Ainsi, les histones font partie des protéines mono-ubiquitinylées les plus abondantes, notamment au niveau des marques H2AK118/119ub et H2BK120ub [44].

Des découvertes récentes suggèrent un contrôle de la réparation de l'ADN par le biais de l'ubiquitylation des histones et de l'interaction avec d'autres MPT. Il s'agit notamment de l'ubiquitylation spécifique de H2A, qui organise le recrutement des facteurs de réparation de l'ADN, ce qui contribue au choix de la voie de réparation de l'ADN [45]. Les histones peuvent également subir une SUMOylation, consistant à l'ajout d'un SUMO (*Small Ubiquitin-Related Modifier*), qui influe sur la transcription des gènes cibles. Les protéines SUMO matures sont attachées de manière covalente aux chaînes latérales de résidus lysine grâce à l'activité d'une cascade enzymatique similaire à celle de la voie d'ubiquitylation [46].

Il existe encore d'autres MPT des histones, plus rares. L'ADP-ribosylation des résidus lysine se déroule lors de cassures simple brin de l'ADN et cause la décondensation de la chromatine et le recrutement subséquent de la machinerie de réparation de l'ADN [47]. La N6-formylation de résidus lysine contribue à la physiopathologie du stress oxydatif et nitrosatif [48]. L'ajout de β -N-acétylglucosamine (appelé O-GlcNAc pour O-N-acétylglucosaminylation) est également possible sur des résidus thréonine ou sérine [49]. Enfin, la biotinylation des queues d'histones a été décrite, bien qu'elle représente moins de 0,001% des histones humaines H3 et H4, ce qui fait craindre que leur abondance ne soit trop faible pour provoquer des effets biologiques *in vivo* [50].

C. Épigénétique et structuration de la chromatine

L'hétérochromatine a un rôle important dans le silençage (*silencing*) transcriptionnel et le maintien du génome par la formation de structures chromatiniennes condensées. La triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3), marque épigénétique reconnue par HP1 (*Heterochromatine Protein 1*), est une caractéristique de la formation de l'hétérochromatine.

L'équipe d'Hitoshi Kurumizaka a démontré que les trois isoformes humaines de la protéine HP1 (α , β et γ) sont capables de former un pont entre deux nucléosomes voisins contenant la marque H3K9me3. Cela forme ainsi l'hétérochromatine, qui empêche la fixation de facteurs de transcription et donc l'expression de gènes au niveau de l'ADN entourant ces nucléosomes (**Figure 11**) [51].

Le fait que l'ADN *linker* soit exposé facilite également son accès à des complexes de remodelage des nucléosomes connus pour se lier à l'hétérochromatine [52]. Le rôle de HP1 a été par la suite souligné dans sa capacité à stabiliser les complexes méthyltransférases et déméthylases auprès de H3K9 [53].

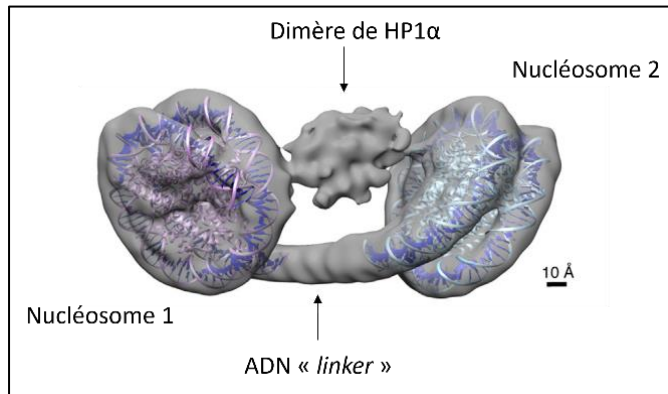


Figure 11. Représentation des densités de potentiels électriques en trois dimensions du complexe HP1α-dinucléosome. Figure adaptée de Machida *et al.*, 2018 [51].

L'acétylation de H4K16 module également les interactions entre les nucléosomes. Des travaux suggèrent que la chaîne latérale du résidu en position 16 dans l'histone H4 d'un nucléosome dépasse dans la cavité acide formée par les résidus Glu61 et Asp90, et par le résidu Glu92 de l'histone H2A sur le nucléosome adjacent. La queue de H4 influençant la force des interactions internucléosomiques, il est admis que l'acétylation de H4K16 perturbe l'interaction entre la queue H4 d'un nucléosome et la cavité acide H2A-H2B du nucléosome voisin. Cela favorise ainsi l'euchromatine et donc la transcription de l'ADN associé à ces nucléosomes [54].

II. Les protéines arginines méthyltransférases

Les premières études portant sur la méthylation des résidus d'acides aminés remontent à la fin des années 1960. Différentes protéines sont alors identifiées : une protéine arginine méthyltransférase qui permet de révéler des résidus arginine mono- et diméthylés symétriquement et asymétriquement, une protéine carboxyle méthyltransférase ainsi qu'une protéine lysine méthyltransférase, que Paik et Kim nomment respectivement protéine méthylases I, II et III [55]. La protéine identifiée comme « arginine méthylase » peut être purifiée à partir de cerveau de cochon d'Inde, de moelle épinière de souris ou encore de foie de rat, cette enzyme pouvant méthyler *in vitro* MBP (*Myelin Basic Protein*), une protéine du cerveau humain [56–58].

Quelques années plus tard, il fut mis au jour que les arginine méthyltransférases étaient également capables d'agir au niveau des fractions nucléaires, c'est-à-dire que les résidus arginine se trouvant sur les histones pouvaient être méthylés [58,59]. Néanmoins, il fallut attendre le début du nouveau millénaire pour commencer à identifier les cibles exactes et les enzymes responsables de cette méthylation [60–62].

A. La méthylation de l'arginine

Chez les mammifères, la méthylation de l'arginine est une modification aussi commune que la phosphorylation et l'ubiquitinylation [63]. Elle est réalisée par les neuf membres de la famille des PRMT, mais pas uniquement. En effet, la protéine NDUFAF7 (*NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 7*) est responsable de la diméthylation symétrique du résidu R85 hautement conservé dans la sous-unité centrale S2 de NDUFS2 (*NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit*), qui est une sous-unité du complexe mitochondrial humain [64]. Mettl23, une autre méthyltransférase récemment identifiée dans les ovocytes de souris, peut dimétyler asymétriquement H3R17. Il a été démontré que la marque H3R17me2a catalysée par Mettl23 est responsable de l'incorporation du variant d'histone H3.3 et de la déméthylation active de l'ADN [65].

1. Le donneur de groupe méthyle : la SAM

La méthylation de l'arginine par les PRMT nécessite la SAM comme cofacteur donneur de méthyle. La SAM est au centre de nombreuses réactions de méthylation biologique (**Figure 12**), que ce soient les métabolites de petites molécules ou les méthyltransférases de l'ARN, de l'ADN et des protéines. Le métabolisme de la SAM est donc étroitement lié aux fonctions des méthyltransférases [66]. La réaction de méthylation convertit la SAM en SAH (S-Adénosyl-L-Homocystéine), transformée par la suite en L-homocystéine [67].

La SAM est synthétisée à partir de la méthionine par la SAM synthétase dans une réaction qui utilise de l'ATP. Outre le fait de générer de la SAH en tant que sous-produit de la réaction de méthylation, la SAM peut produire de la MTA (Méthylthioadénosine). La SAH et la MTA peuvent toutes deux inhiber les PRMT dans des boucles de rétroaction. Ces molécules doivent donc être métabolisées. Le déficit en MTA phosphorylase, l'enzyme qui convertit la MTA en méthyladénosine, entraîne une accumulation de MTA et une inhibition globale de la méthylation des résidus arginine [68].

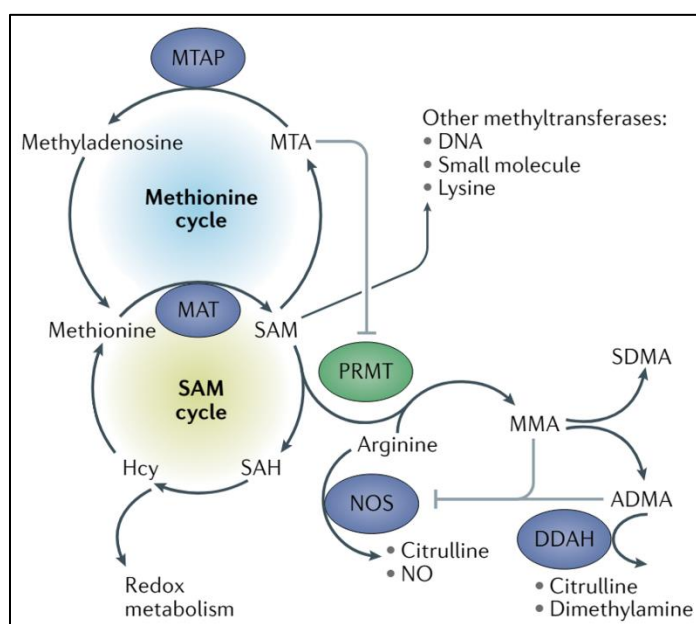


Figure 12. Schéma simplifié du contrôle métabolique de la méthylation de l'arginine. Le donneur de groupe méthyle pour la réalisation de la méthylation des résidus arginine est la SAM, elle-même dérivée de méthionine. MTAP : méthylthioadénosine phosphatase, SAM : S-adénosyl-L-méthionine, SAH : S-adénosyl-L-homocystéine, Hcy : L-homocystéine, NOS : oxyde nitrique synthase, DDAH : diméthylarginine diméthylaminohydrolase. Schéma adapté de Wu *et al.*, 2021 [69].

La MMA (*Monomethyl Arginine*) et l'ADMA (*Asymmetric Dimethyl Arginine*) circulantes peuvent inhiber la fonction de l'oxyde nitrique synthase, qui génère de l'oxyde nitrique, un puissant vasodilatateur qui module la pression artérielle et l'inflammation. La SDMA (*Symmetric Dimethyl Arginine*) circulante est quant à elle excrétée par les reins alors que la MMA et l'ADMA sont métabolisées en citrulline et en diméthylamine par la diméthylarginine diméthylaminohydrolase, l'enzyme clé de cette voie de clairance [70].

2. Les différents types d'arginine méthylées

Le groupe guanidinium de l'arginine est connu pour porter une charge positive et a le potentiel de former cinq liaisons hydrogène ainsi que des empilements π . Il n'est donc pas surprenant de trouver des résidus arginine à proximité des interfaces protéine-protéine, protéine-ARN ou protéine-ADN. La méthylation de ce groupe guanidinium présente l'avantage d'augmenter le niveau d'hydrophobie de l'arginine et de fournir un groupe latéral plus volumineux, sans en modifier la charge [71].

Le résidu arginine possède deux atomes d'azote équivalents dans son groupe guanidinium qui peuvent être méthylés de plusieurs façons possibles (**Figure 13**). Trois formes principales de méthylarginine ont été identifiées chez les eucaryotes : la ω -N^G-monométhylarginine, la ω -N^G,N^G-diméthylarginine asymétrique et la ω -N^G,N^G-diméthylarginine symétrique. Les PRMT se répartissent en trois catégories en fonction de leur activité catalytique. Les enzymes de type I, que sont PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4 (appelée également CARM1 pour *Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1*), PRMT6 et PRMT8 assurent la formation de MMA en tant qu'intermédiaire avant l'établissement de l'ADMA. Les enzymes de type II, que représentent PRMT5 et PRMT9, catalysent la formation de MMA puis de SDMA [72]. Enfin, PRMT7 est l'unique enzyme de type III qui est uniquement capable de catalyser la formation de MMA [73].

Les résidus arginine méthylés sont reconnus par les protéines qui contiennent des domaines Tudor, bien que certains domaines PHD et WD40 lient également la méthylarginine. Plus précisément, les résidus méthylés interagissent avec la cage aromatique du domaine Tudor, où se produisent des interactions d'empilement [74].

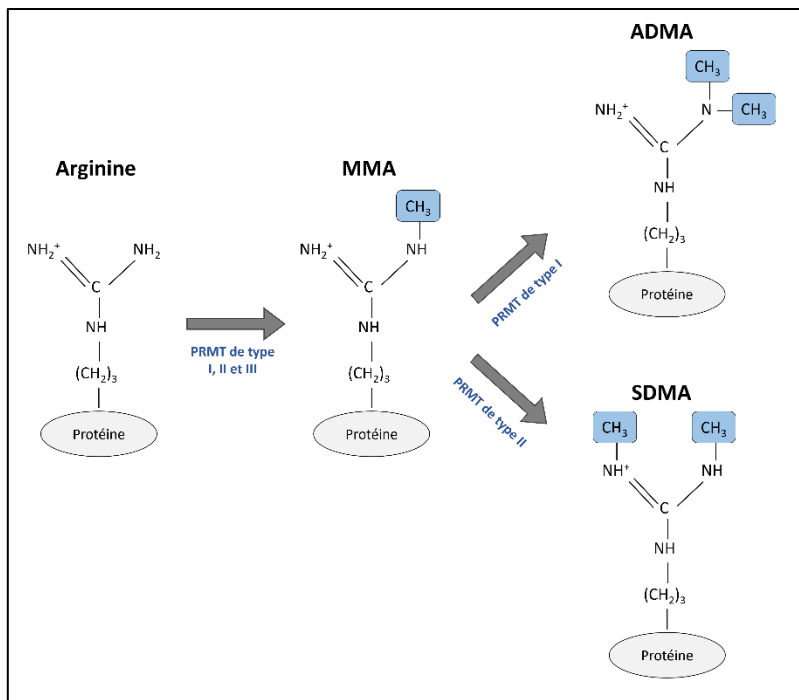


Figure 13. Types de méthylation possibles par les PRMT. Les PRMT de type I, II et III génèrent des marques de monométhylarginine (MMA). La production ultérieure de diméthylarginine asymétrique (ADMA) est catalysée par les enzymes de type I, et la diméthylarginine symétrique (SDMA) est produite par les enzymes de type II. La PRMT7, seule enzyme de type III, ne produit que de la MMA.

Alors que plus de 36 protéines contenant un domaine Tudor ont été répertoriées, seules certaines d'entre elles sont à ce jour validées comme interagissant avec des résidus arginine méthylés. Parmi elles, il faut citer les protéines SMN (*Survival of Motor Neuron*) et SPF30 (*Splicing Factor 30*), impliquées dans la régulation de l'épissage, SND1 (*Staphylococcal Nuclease Domain-containing protein 1*) participant au contrôle de l'expression génique, ainsi que les différentes protéines à domaine de Tudor TDRD1, -6, -9 et TDRKH, contribuant quant à elles à la voie de silençage des petits ARN spécifiques aux gonades [75].

B. Structures protéiques des PRMT humaines

La structure canonique des PRMT comprend des domaines fonctionnels qui sont conservés chez tous les membres de la famille, avec néanmoins des domaines uniques à certains des membres de la famille (**Figure 14**). Les domaines communs sont parfois répétés au cœur d'une même séquence (notamment pour les PRMT7 et 9). La morphologie centrale de la plupart des PRMT de type I et II correspond à un homodimère en forme de beignet de type *donut* disposé tête-bêche. Les deux monomères se lient à la SAM et au résidu arginine, ce qui suggère que les deux PRMT formant l'homodimère sont catalytiquement actifs [76].

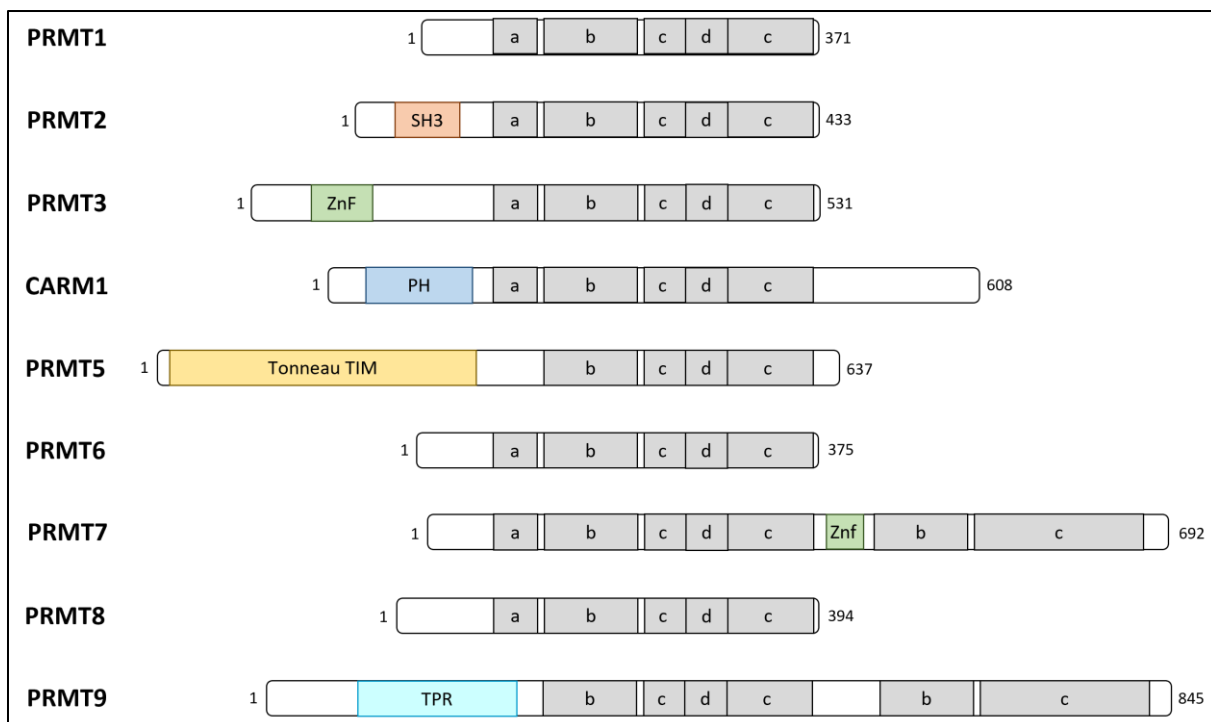


Figure 14. Schématisation des domaines des neuf PRMT humaines. Pour toutes les protéines, le nombre de résidus d'acides aminés sont basés sur les séquences protéiques humaines. Les domaines structuraux communs à toutes les PRMT sont indiqués par des lettres minuscules : a : hélices alpha ; b : pli de Rossmann ; c : tonneaux bêta ; d : bras de dimérisation. D'autres domaines sont quant à eux plus spécifiques de certains membres de la famille : SH3 : *Src Homology 3* ; ZnF : motif en doigt de zinc ; PH : *Pleckstrin Homology domain* ; TIM : triose-phosphate isomérase ; TPR : *Tetratricopeptide Repeats*. Schéma inspiré de Hwang *et al.*, 2021 et Dai *et al.*, 2022 [77,78].

La structure centrale canonique commune à toutes les PRMT comprend deux domaines principaux : le pli de Rossmann N-terminal (également appelé domaine de liaison à la SAM) et le domaine de tonneaux β C-terminal. Le bras de dimérisation en hélice, responsable de la dimérisation des PRMT, dépasse de l'extrémité N-terminale du domaine de tonneaux β et entre en contact avec l'extrémité N-terminale du pli de Rossmann de la deuxième PRMT de l'homodimère (**Figure 15**). Les hélices α dynamiques (αX , αY et αZ) situées à l'extrémité N-terminale du pli de Rossmann participent à la liaison de la SAM et sont présentes à la fois dans les PRMT de type I et de type III mais pas dans les types II (PRMT5 et 9) [76].

Le noyau catalytique des PRMT est remarquablement similaire dans toutes les enzymes et est doté de six motifs caractéristiques indispensables à la fonction de méthyltransférase. Le motif I (VLD/VGxGxG) forme le cœur de la poche de liaison à la SAM avec trois glycines hautement conservées parmi toutes les PRMT. Le « post-motif » I (V/IxG/AxD/E) forme les interactions de liaison hydrogène avec le groupement ribose hydroxyle de la SAM, *via* un résidu d'acide glutamique ou aspartique.

Le motif II (E/K/VDII) stabilise le motif I par la formation d'un feuillet β . Le motif double-E contient la séquence SExMGxxLxxExM dont les deux résidus d'acide glutamique positionnent correctement l'arginine du substrat. Le motif III (LK/xxGxxxP) forme un feuillet β parallèle avec le motif II et enfin la boucle critique THW, située près du site actif, est importante pour la liaison du substrat ainsi que pour la stabilisation de l'hélice α N-terminale [79].

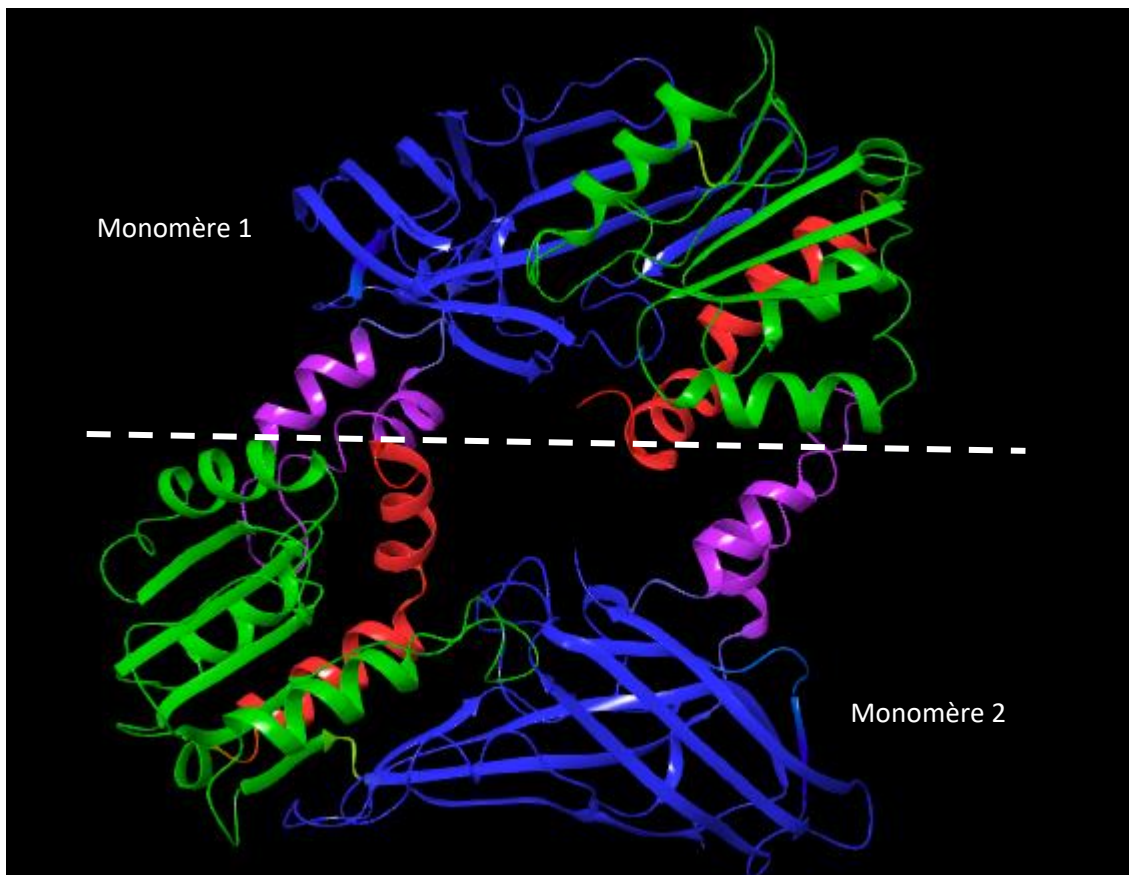


Figure 15. Structure en trois dimensions d'un dimère de PRMT8 humain. Les différents domaines structuraux apparaissent en couleurs : rouge : hélices alpha ; vert : pli de Rossmann ; bleu : tonneaux bêta ; violet : bras de dimérisation. Numéro d'accèsion de *Protein Data Bank* : 5DST.

Malgré les motifs et domaines communs à tous les membres de la famille, chaque PRMT se distingue des autres, même celles dont les structures sont très similaires, ce qui explique logiquement leurs différences de cibles et de fonctions. Elles sont discutées ci-après à l'exception de PRMT2, qui est décrite dans la partie IV de cette introduction.

1. PRMT1, PRMT3, PRMT6 et PRMT8

La PRMT1 humaine partage un haut degré d'homologie avec les différents membres de la famille des PRMT, conservée chez les eucaryotes [80].

Des études phylogénétiques basées sur le domaine de la méthyltransférase ont mis en évidence que PRMT1 est étroitement liée à PRMT8, tout comme PRMT6 se rapproche de PRMT2 [81]. La structure de PRMT8 est donc très similaire à celle bien étudiée de PRMT1, d'où l'utilisation de la même nomenclature pour les éléments de la structure secondaire, à l'exception du brin β 12 qui se sépare en deux brins courts (β 12 et β 12') et des hélices α E et α F qui sont manquantes [82].

La structure centrale de l'enzyme PRMT3 du rat a été déterminée en 2000 et a représenté la première structure centrale de PRMT à être déposée dans la banque de données des protéines [83]. Le domaine à doigt de zinc de PRMT3, qui lui est unique et situé près de l'extrémité N-terminale, serait possiblement impliqué dans la régulation de l'enzyme ou dans la reconnaissance du substrat, capable d'accepter le groupe méthyle [84]. Il a été rapporté que ce domaine à doigt de zinc est nécessaire et suffisant à l'interaction entre PRMT3 et un de ses substrats, RPS2 (*40S Ribosomal Protein S2*) [85].

La comparaison structurelle de PRMT6 avec d'autres structures de PRMT de type I révèle deux caractéristiques uniques. Tout d'abord, le motif aromatique conservé Y(F/Y)xxY dans la région N-terminale est positionné vers l'extérieur de la poche de liaison de la SAH, tandis qu'il couvre la fraction adénosine de la SAH comme un couvercle notamment pour PRMT3 et CARM1. De plus, le bras de dimérisation de PRMT6 présente une conformation différente et forme une structure de dimère en anneau plat avec une cavité centrale, contrairement à la forme de beignet de type *donut* plutôt concave formée par les autres dimères de PRMT de type I. Cette disposition sans égal pourrait influencer la sélectivité du substrat de PRMT6 [86].

2. CARM1

Les premières structures cristallographiques de CARM1 ont révélé la présence d'un domaine N-terminal PH (*Pleckstrin Homology*), impliqué dans les interactions protéine-protéine, d'un domaine C-terminal de transactivation et d'un domaine catalytique central contenant les quatre motifs PRMT conservés. Les domaines N- et C-terminaux de CARM1 ne sont pas nécessaires à son activité de méthyltransférase mais sont essentiels à la reconnaissance du substrat [87] et à son activation lors de la transcription [88].

Le bras de dimérisation de CARM1 comprend une insertion particulière de quelques résidus qui génère une cavité centrale plus grande et moins chargée négativement que le dimère de PRMT1, ce qui explique peut-être pourquoi CARM1 possède des caractéristiques distinctes [89].

3. PRMT5

La PRMT5 humaine s'associe généralement à MEP50 (*Methylsome Protein 50*) dans un complexe hétéro-octamérique de 435 kDa. MEP50 est une protéine contenant des répétitions de domaines WD (tryptophane/acide aspartique) qui stabilisent le complexe PRMT5 et augmente son activité de méthyltransférase. Ainsi, PRMT5 s'oligomérisse pour former un tétramère à noyau interne, avec quatre molécules MEP50 environnantes liées à l'extrémité N-terminale de PRMT5, ce complexe étant capable d'interagir avec les protéines cibles (**Figure 16**) [90]. La particularité de PRMT5 est son domaine TIM en tonneau localisé à l'extrémité N-terminale, qui facilite l'assemblage du complexe PRMT5:MEP50 [91].

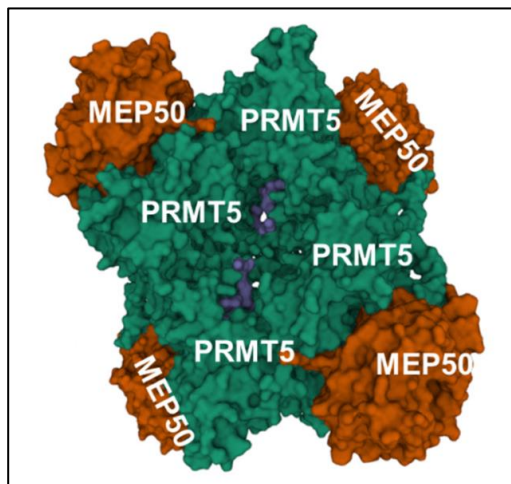


Figure 16. Structure par cristallographie de PRMT5 humaine dans un complexe hétéro-octamérique avec MEP50. Numéro d'accèsion de *Protein Data Bank* : 4GQB. Figure issue de Motolani *et al.*, 2021 [92].

4. PRMT7 et PRMT9

Deux des membres de la famille, PRMT7 et PRMT9, ont subi une duplication génétique chez les métazoaires et contiennent deux modules catalytiques en tandem reliés par 19 résidus d'acides aminés, qui se replient l'un sur l'autre, formant une structure de pseudo-dimère. Alors que le module N-terminal de PRMT7 est catalytiquement actif, le module C-terminal est considéré comme inactif.

PRMT7 comprend également un motif doigt de zinc supplémentaire à la jonction entre les deux modules PRMT, qui bloque le module C-terminal dans une conformation inactive par rapport au N-terminal chez la souris [93]. Contrairement aux dimères en forme de beignet de type *donut* des structures PRMT de type I, les deux modules forment un dimère en forme de bol [94].

En plus de son deuxième module en C-terminal comme PRMT7, PRMT9 contient aussi trois TPR (*Tetratricopeptide Repeats*) au niveau des résidus 25 à 134. En outre, il a été démontré que les protéines mutantes délétées des modules N- ou C-terminaux, ou délétées du motif TPR de PRMT9 sont inactives, ce qui renforce l'idée que le substrat doit établir des contacts corrects avec les deux domaines de l'enzyme pour être convenablement méthylé [95].

C. Régulation de l'activité des PRMT

La séquence d'acides aminés de la plupart des PRMT code principalement pour leur domaine méthyltransférase, laissant donc peu de place pour des séquences régulatrices à leurs flancs. Néanmoins, les PRMT possèdent des motifs qui peuvent être phosphorylés ou ubiquitinylés dans le cadre de leur stabilité et de leur fonction. Des PRMT peuvent également se méthyler entre elles afin de moduler leur activité.

1. Phosphorylation des PRMT

La phosphorylation de PRMT5 peut avoir plusieurs rôles sur l'activité méthyltransférase de celle-ci. Les tyrosine kinases mutées oncogéniques JAK2V617F et JAK2K539L sont capables de phosphoryler PRMT5, contrairement à JAK2 (*Janus Kinase 2*) sauvage. Cette phosphorylation altère fortement l'activité de méthyltransférase de PRMT5, notamment en abolissant son interaction avec MEP50, qui permet de renforcer considérablement son activité enzymatique. Les sites supposés de phosphorylation de PRMT5 se trouvent dans sa région N-terminale, notamment les résidus Y297, Y304, et Y307 (**Figure 17A**) [96].

De surcroît, une association a été démontrée entre PRMT5 et LKB1 (*Liver Kinase B1*) dans le cancer du sein, mais cette dernière n'est pas un substrat de la méthyltransférase. Au contraire, les résidus T139 et T144, situés dans le tonneau TIM de PRMT5 sont des cibles phosphorylées par LKB1 et ces modifications entraînent une baisse de l'activité méthyltransférase de PRMT5 du fait de l'abolition de l'interaction avec des partenaires tels que MEP50, RIOK1 (*RIO Kinase 1*) et PICLn (*Chloride nucleotide-sensitive channel 1*) (**Figure 17B**) [97].

PRMT5 est aussi un substrat de ROK (*Rho-activated Kinase*) ainsi que de la MP (*Myosine Phosphatase*), et son activité dépend de son état de phosphorylation/déphosphorylation dans des cellules d'hépatocarcinome. En effet, une hausse de la phosphorylation activatrice de PRMT5 au niveau du résidu T80 par ROK provoque une hausse globale de la diméthylation symétrique des histones, ayant un effet tumorigène. À l'inverse, il est suggéré que la MP agisse en tant que suppresseur de tumeur *via* la déphosphorylation de PRMT5, empêchant ainsi son activité (**Figure 17C**) [98].

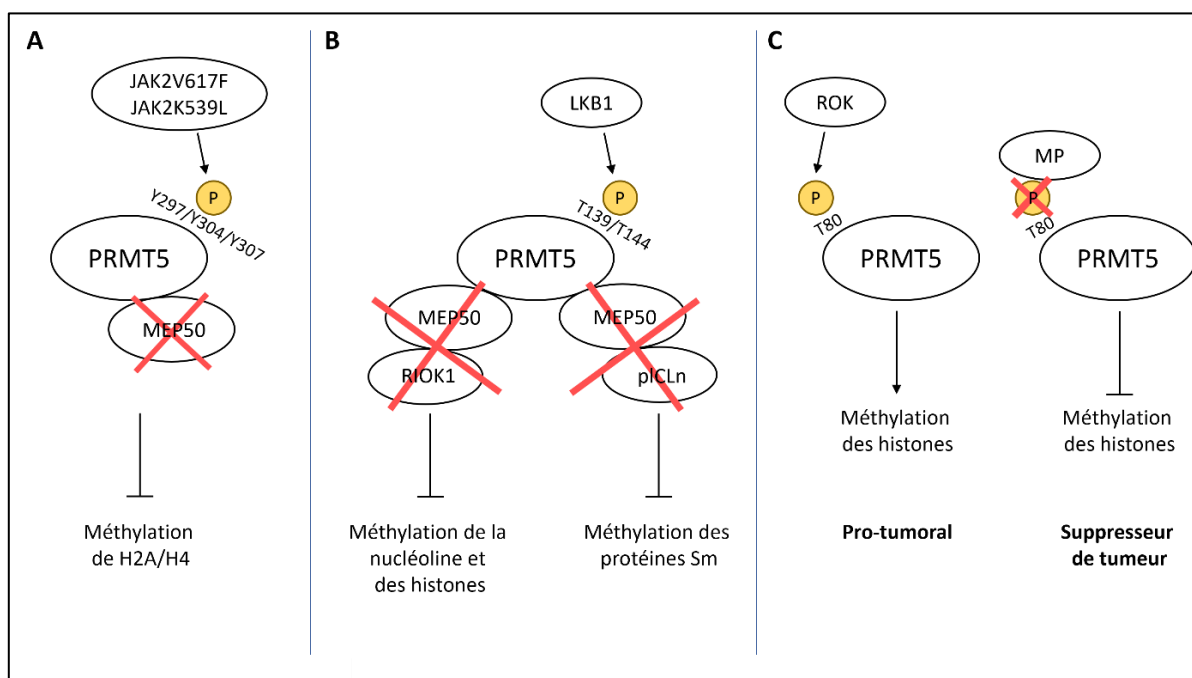


Figure 17. Dualité des fonctions de la phosphorylation de PRMT5. A. Les mutants JAK2V617F et JAK2K539L phosphorylent PRMT5 au niveau des résidus Y297, Y304 et Y307, ce qui empêche son interaction avec MEP50 et cause une baisse de la méthylation des histones H2A et H4. B. La protéine LKB1 phosphoryle PRMT5 au niveau des résidus T139 et T144, empêchant *de facto* son interaction avec les protéines MEP50 et RIOK1, menant à une baisse de méthylation de la nucléoline et des histones, et avec les protéines MEP50 et pICLn, menant à une baisse de méthylation des protéines Sm. C. À l'inverse, la phosphorylation de T80 par ROK favorise l'activité de méthylation de PRMT5 aux histones, ce phénomène étant pro-tumoral, tandis que la déphosphorylation de ce même résidu par la MP a un effet antagoniste, *via* une inhibition de l'activité méthyltransférase de PRMT5 et donc une baisse du niveau de méthylation des histones, ce qui donne à la MP un rôle suppresseur de tumeur.

Des phosphorylations d'autres PRMT ont également été mises au jour. Ainsi, dans les progéniteurs somatiques, la phosphorylation de PRMT1 par CSNK1a1 (*Casein Kinase 1 alpha1*) est nécessaire afin d'empêcher la différenciation due à GRHL3 (*Grainyhead-Like 3*) et de maintenir l'auto-renouvellement de ces cellules [99]. Dans les cellules souches musculaires, la MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) p38 γ phosphoryle la sérine 532 de CARM1 pour empêcher sa localisation nucléaire et *de facto* son interaction avec le facteur de transcription PAX7 (*Paired box protein 7*). Ce dernier, sans méthylation, ne peut donc pas activer Myf5 (*Myogenic Factor 5*) et induire la myogenèse [100].

Un stress oxydatif mène à la dégradation par le protéasome de CARM1 afin d'inhiber la migration des cellules épithéliales pulmonaires. Néanmoins, la phosphorylation de CARM1 au niveau du résidu T132 par GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) stabilise la protéine et empêche ce phénomène [101].

2. Dégradation par ubiquitinylation

Dans des cellules du cancer de la prostate, PRMT5 subit une poly-ubiquitinylation sur plusieurs résidus lysine différents. L'E3 ubiquitine ligase CHIP (*Carboxy-terminus of Hsc70 Interacting Protein*) *via* une interaction directe, favorise la dégradation de PRMT5 par ubiquitinylation au niveau du résidu K48 [102]. De façon contraire, dans les carcinomes hépatocellulaires, le long ARN non codant *LINC01138* agit comme un moteur oncogénique qui favorise l'envahissement tumoral en interagissant physiquement avec PRMT5, ce qui renforce la stabilité de la protéine en bloquant la dégradation dépendante de l'ubiquitine [103].

PRMT1, tout comme la kinase MAPK3 et la phosphatase PP2BA (*serine/threonine-Protein Phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform*), sont des substrats potentiellement ubiquitinylés par E4B et CHIP. L'ubiquitinylation de PRMT1 par CHIP produit des espèces mono-ubiquitinylées, la surexpression de cette dernière accélérant la dégradation de PRMT1 [104].

Lors d'un apport riche en nutriments dans la cellule, le résidu K471 de CARM1 est ubiquitinylé par l'E3 ubiquitine ligase SKP2 (*S-phase Kinase-associated Protein 2*), induisant ainsi sa dégradation par le protéasome. À l'opposé, une privation en nutriments sera à l'origine de la stabilisation de CARM1, qui va s'accumuler dans la cellule et accroître la méthylation des marques d'histones, induisant une hausse de l'autophagie des cellules en privation [105].

3. Contrôle de l'expression par les miARN

L'expression des PRMT, comme celle de tout autre gène codant, peut être soumise à un contrôle par des miARN. Le long ARN non-codant *SNHG16* pourrait agir comme une éponge endogène du miR-4518 qui cible PRMT5, contribuant à une hausse de son expression [106]. Le miR-181c endogène réprime spécifiquement l'expression de CARM1 [107]. Cette dernière amoindrit l'expression du miR-223 grâce à la méthylation de RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*) et l'expression de CARM1 est elle-même réprimée de manière post-transcriptionnelle par le miR-223 [108]. Le miR-503 inhibe les métastases des cellules de carcinome hépatocellulaire en ciblant PRMT1 [109]. Dans les cellules d'ostéosarcome, PRMT9 a été montrée comme étant la cible de miR-543, qui permet la stabilisation de la protéine HIF-1 α (*Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha*) et de ce fait favorise la prolifération et la glycolyse [110].

4. Régulation croisée entre PRMT

L'équipe d'Adam Frankel fut la première à identifier une interaction directe entre deux méthyltransférases différentes : PRMT1 et PRMT2. Ces deux enzymes sont capables de s'hétérodimériser et il a été découvert qu'à travers cette interaction, PRMT2 stimule l'activité de PRMT1, augmentant *de facto* la production de méthylarginine dans les cellules. Les responsables de ce travail de recherche ont également montré que le domaine spécifique SH3 (*Src Homology 3*) de PRMT2 est nécessaire à cette interaction [111]. Il a été découvert plus récemment que PRMT5 est diméthylée sur son arginine R505 et que cette méthylation est nécessaire à son activité de méthyltransférase. Plus précisément, cette méthylation est obligatoire afin que l'enzyme puisse s'homodimériser. Les chercheurs n'ayant pas pu déterminer si la diméthylation était symétrique ou asymétrique, ils ont décidé d'investiguer les trois PRMT les plus étudiées, PRMT1, CARM1 et PRMT5. Seule CARM1 est capable de méthyler PRMT5 [112].

D. Les diverses fonctions des PRMT

Du fait de l'importance des MPT des histones dans la régulation fine de la transcription des gènes, les premières études sur les PRMT se sont principalement concentrées sur leurs fonctions épigénétiques. Les PRMT méthylent les résidus arginine sur les nucléosomes après avoir été recrutées dans des complexes de remodelage de la chromatine, et ces méthylations servent non seulement de marques épigénétiques clés, mais coopèrent également avec d'autres marques épigénétiques.

Outre les histones, les PRMT contribuent aussi au processus de transcription *via* la méthylation directe de certains facteurs qui y sont impliqués. Un certain nombre de protéines de liaison à l'ARN présentent des motifs riches en RGG/RG reconnus par les PRMT. Ces méthylations sont essentielles dans l'épissage des ARN pré-messagers, la localisation de l'ARN et les processus de traduction. Outre les fonctions des PRMT dans le contrôle de l'expression génique, celles-ci s'étendent également à divers processus cellulaires, dont la signalisation cellulaire, la régulation du cycle cellulaire et la réponse aux dommages de l'ADN [77].

1. Modulation de la transcription

Comme indiqué ci-avant, les PRMT sont capables de méthyler les résidus arginine situés sur les queues des histones, ce qui permet de contrôler la transcription des gènes cibles, soit en compactant la chromatine pour la répression de la transcription, soit en la décompactant, ce qui entraîne l'activation de la transcription (**Figure 18**).

Certaines de ces méthylations contribuent à l'activation de la transcription des gènes cibles, notamment PRMT1 et PRMT3 avec la diméthylation asymétrique de l'arginine 3 de l'histone 4 (H4R3me2a) [113,114], CARM1 pour la marque H3R17me2a [115,116] et PRMT5 pour la diméthylation symétrique de H3R2 (H3R2me2s) [117]. La méthylation des résidus arginine des histones est parfois associée à un état répressif de la chromatine, comme le montrent les marques H4R3 et H2AR3 monométhylées par PRMT7 [118], H3R8 méthylée par PRMT5 et la marque H3R2me2a associée à PRMT6 [119,120].

Le code histone est un processus très actif, dynamique, avec des changements réguliers, ce qui explique qu'une même marque peut être associée à l'activation ou à la répression de la transcription, en fonction de nombreuses caractéristiques telles que les marques épigénétiques au niveau des résidus avoisinant le résidu arginine méthylé [121]. Il est à noter que les marques H4R3me2s par PRMT5 [122,123] et H3R8me2a par PRMT2 [124–127] sont des marques épigénétiques possédant ce double rôle. Enfin, le rôle de certaines marques épigénétiques sur la transcription reste inconnu comme les monométhylations de H4R17 et H4R19 par PRMT7 [128] et la marque H3R17me2a par PRMT6 [115].

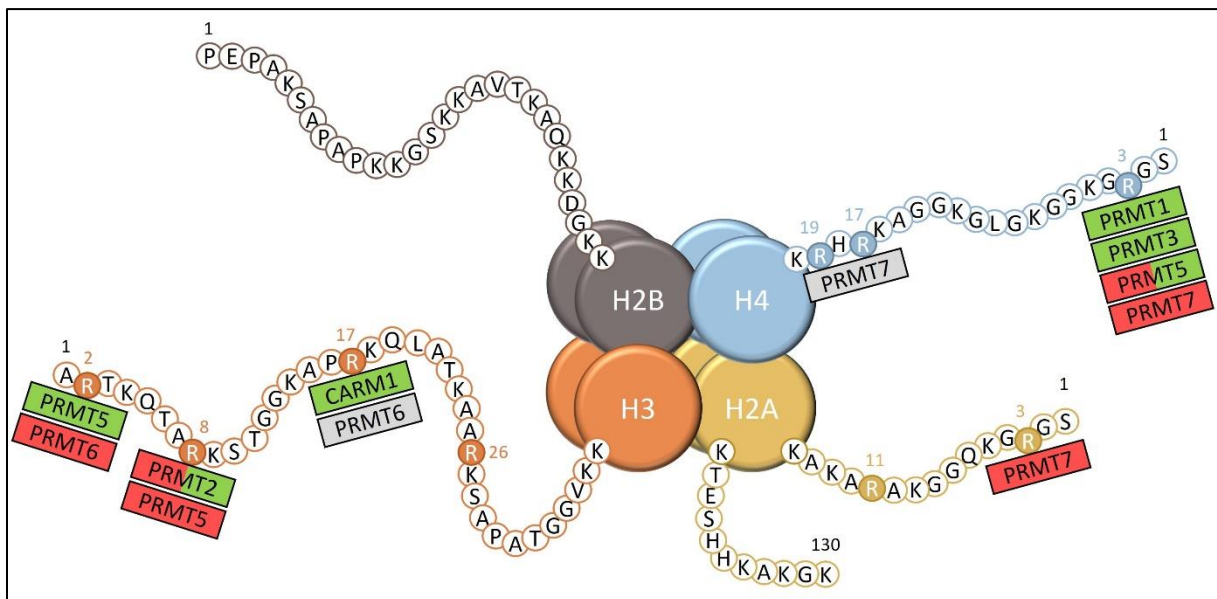


Figure 18. Sites connus de méthylation de l'arginine sur les queues d'histones par les PRMT. Vert : activation transcriptionnelle ; rouge : répression transcriptionnelle ; gris : rôle inconnu sur la transcription. Schéma issu de Sauter *et al.*, 2022 [129].

2. Épissage et traduction de l'ARN messager

De manière intéressante, il existe une forte redondance chez les substrats des différentes PRMT, et une part importante de ceux-ci est représentée par les protéines de liaison à l'ARN impliquées dans l'épissage et la traduction de l'ARNm. L'inhibition des PRMT modifie globalement l'épissage alternatif et réduit la traduction des ARNm. En particulier, les mutations des sites de méthylation des protéines ribosomiques peuvent inhiber l'assemblage des ribosomes et la croissance cellulaire [130].

La liaison et la méthylation de RPS2 par PRMT3 sont nécessaires à son assemblage dans la sous-unité ribosomique 40S. Les cellules qui n'expriment pas PRMT3 présentent un déséquilibre entre les sous-unités ribosomiques 40S et 60S, ce qui atténue la biogenèse des ribosomes et la traduction [131,132].

La majorité des gènes cibles de PRMT5, au niveau post-transcriptionnel, expriment un ARNm contenant un IRES (*Internal Ribosome Entry Site*). Il a été montré que PRMT5 facilite la traduction d'un sous-ensemble de gènes contenant un IRES. La ribonucléoprotéine hnRNPA1 (*Heterogeneous Ribonucleoprotein Particle*) est méthylée par PRMT5 sur deux résidus, R218 et R225, et cette méthylation facilite l'interaction de la hnRNPA1 avec l'ARN IRES pour promouvoir la traduction dépendante de l'IRES [133]. La hnRNPA1 est une cible majeure non-histone de PRMT1, qui la méthyle sur plusieurs résidus arginine clés dans sa région arginine-glycine-glycine (RGG). Contrairement à la diméthylation symétrique réalisée par PRMT5 qui augmente son activité, la diméthylation asymétrique des résidus arginine par PRMT1 supprime la fonction de la hnRNPA1 dans le cytoplasme et peut servir à moduler ses fonctions [134]. La hnRNPA2 est également méthylée par PRMT1, ce qui contribue à sa localisation nucléaire [135].

PRMT5 méthyle les protéines Sm/SnRNP (*small nuclear RNP*) de l'épissosome et la protéine de liaison à l'ARN hnRNPK. Cette méthylation de hnRNPK contribue aux changements d'épissage alternatif qui se produisent lors de l'activation des lymphocytes T. L'inclusion de l'exon *Trpm4b* (*Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4*) dans les lymphocytes T étant contrôlée par PRMT5, ce dernier favorise la signalisation calcique, la localisation nucléaire de NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cell*) et la sécrétion d'IL2 (Interleukine 2) [136].

PRMT1 promeut la localisation nucléaire de protéines de liaison à l'ARN. SAM68 (*Src-Associated substrate in Mitosis of 68 kDa*) est notamment méthylée de façon endogène sur au moins sept des 14 résidus arginine trouvés au sein d'un motif RG [137]. La protéine FUS (*Fused in Sarcoma*) ainsi que ses mutants retrouvés dans un contexte de sclérose latérale amyotrophique sont également méthylés par PRMT1. Dans ce cas, le *knockdown* de PRMT1 favorise la localisation cytoplasmique de ces protéines [138].

CARM1 méthyle les résidus arginine se trouvant sur plusieurs facteurs d'épissage : U1C (*U1 small nuclear ribonucleoprotein C*), SmB, SF3B4 (*Splicing Factor 3B subunit 4*) et TCERG1 (*Transcription Elongation Regulator 1*). Ce dernier est d'ailleurs un substrat de PRMT5. La modification de TCERG1 lui permet de se fixer au domaine Tudor des complexes SMN de façon dépendante à l'activité de CARM1 [139]. PRMT9 méthyle le facteur d'épissage SF3B2 au niveau du résidu R508, qui génère un site de liaison au domaine Tudor des complexes SMN [140]. Le complexe PRMT5:MEP50:PICln est quant à lui capable d'interagir directement avec les complexes SMN, facilitant ainsi la biogenèse des UsnRNP pour l'épissage (**Figure 19**) [141].

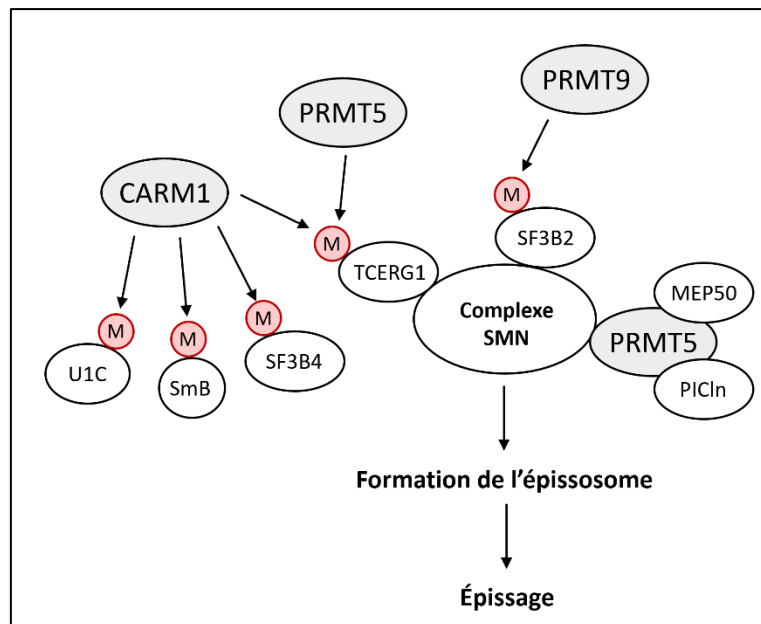


Figure 19. La méthylation des résidus arginine module l'épissage des pré-ARNm. CARM1 méthyle les résidus arginine se trouvant sur les facteurs d'épissage U1C, SmB, SF3B4 ainsi que TCERG1, que PRMT5 est également capable de méthyler. La modification de TCERG1 lui permet de se fixer au domaine Tudor des complexes SMN. PRMT9 méthyle le facteur d'épissage SF3B2, qui peut aussi reconnaître et se fixer sur les complexes SMN. Le complexe PRMT5:MEP50:PICln est, quant à lui, capable de méthyler directement des protéines du complexe SMN.

3. Implication dans les voies de signalisation

L'implication de PRMT1 dans les voies de signalisation liées aux membres de la famille du TGF (*Transforming Growth Factor*) a été démontrée. Cette méthyltransférase est capable de s'associer au récepteur II des BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*) tandis que la protéine inhibitrice Smad6 est associée au récepteur I. Dans le cas d'une liaison de BMP avec ses récepteurs, PRMT1 va interagir avec Smad6 afin de le méthyler sur ses résidus R74 et R81.

Cette méthylation va entraîner sa dissociation du récepteur aux BMP, avec pour conséquence une activation des Smad1/5, donc de la transcription qui leur est associée [142]. De même, PRMT1 est associée au récepteur II de TGFβ tandis que les protéines inhibitrices Smad6 et Smad7 sont associées au récepteur I. PRMT1 est capable d'interagir avec Smad6 et Smad7 afin de les méthyler. La méthylation de Smad7 sur ses résidus R57 et R67 va induire sa dissociation du récepteur au TGFβ suivie de sa dégradation, avec pour conséquence une activation des Smad2/3, donc de la transcription qui leur est associée [143]. La méthylation de Smad6 provoque quant à elle un recrutement suivi d'une dégradation de MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response 88*), inhibant la signalisation NF-κB (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) et la transcription des gènes cibles de cette voie (**Figure 20**) [144].

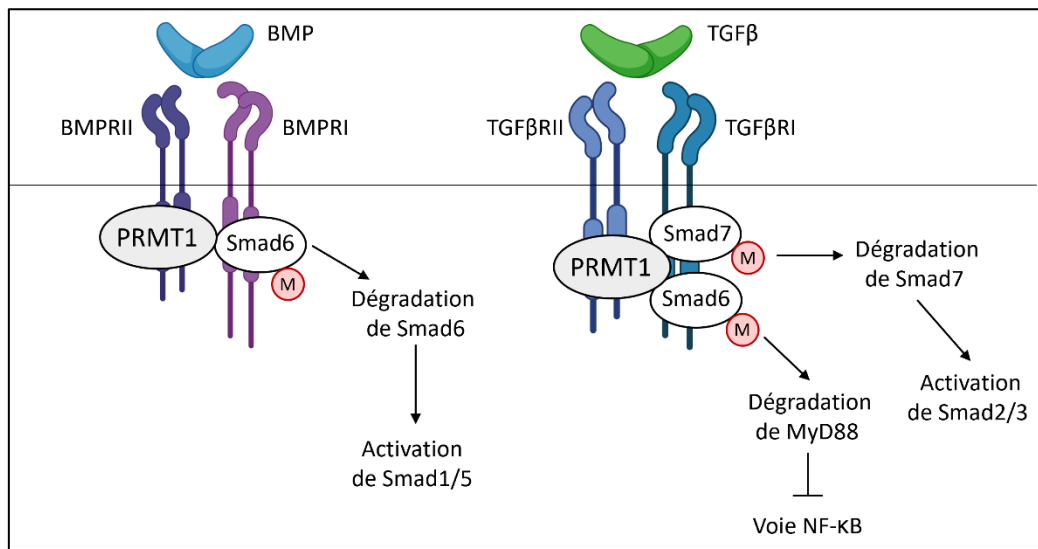


Figure 20. Fonctions de PRMT1 dans les voies de signalisation liées au TGF. PRMT1 est associée au récepteur II des BMP alors que le transducteur de signal Smad6 est associé au récepteur I. PRMT1 va interagir avec Smad6 afin de le méthyler. Cette méthylation entraîne sa dissociation du récepteur des BMP, d'où une activation des Smad1/5 et de la transcription qui leur est associée. PRMT1 se fixe au récepteur II du TGFβ tandis que Smad6 et Smad7 sont associées au récepteur I. PRMT1 est capable de méthyler Smad6 et Smad7. La méthylation de Smad7 induit sa dissociation du récepteur du TGFβ, provoquant une activation des Smad2/3, donc de la transcription qui leur est associée. La méthylation de Smad6 est à l'origine d'un recrutement suivi d'une dégradation de MyD88, inhibant la voie de signalisation NF-κB.

Les PRMT agissent aussi sur la voie de signalisation pro-inflammatoire NF-κB. En effet, PRMT1 se lie directement à la sous-unité p65 de NF-κB et coactive de manière synergique l'expression génique dépendante de NF-κB de concert avec les coactivateurs transcriptionnels p300/CBP, CARM1 et PARP1 (*Poly ADP-Ribose Polymerase 1*). PRMT5 est capable de méthyler p65 sur son résidu R30 afin de stimuler l'activité de la voie. Enfin, CARM1 peut également se lier à p65 pour coactiver de manière synergique la transactivation guidée par NF-κB [145–147].

D'autres voies de signalisation sont affectées par la méthylation catalysée par les PRMT. Ainsi, le résidu arginine 1175 de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) est méthylé par PRMT5, modulant positivement l'autophosphorylation de l'EGFR induite par l'EGF au niveau du résidu tyrosine 1173, qui empêche l'activation de la kinase ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). Cela entraîne une baisse de la prolifération cellulaire, de la migration et du développement métastatique des cellules exprimant l'EGFR [148].

PRMT5 affecte la biodisponibilité membranaire du récepteur α au PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) durant la différenciation des oligodendrocytes, en orchestrant sa dégradation de manière dépendante de l'ubiquitine ligase Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma*). En effet, la méthylation du résidu R554 du PDGFR α masque son site de liaison avec cette dernière, qui ne peut donc plus ubiquitinyler le résidu Y555 afin de mener le récepteur à la dégradation [149].

4. Contrôle du cycle cellulaire

CDK4 (*Cyclin-Dependent Kinase 4*) est un substrat de PRMT1 lorsque celle-ci est dans un complexe avec le co-régulateur BTG2 (*B-cell Translocation Gene 2*). Une analyse de la structure tridimensionnelle du complexe CDK4/Cycline D3 a révélé que quatre résidus arginine sont méthylés (R55, R73, R82, R163) et ceux-ci sont situés à proximité de la zone de liaison de la Cycline D3 avec CDK4. Cette modification compromet la stabilité du complexe CDK4/Cycline D3 et arrête la progression du cycle cellulaire dans des cellules pré-B (**Figure 21A**) [150].

PRMT5 module les protéines régulatrices de la phase G1. L'activité de PRMT5 est nécessaire à l'activité des protéines CDK2, CDK4, CDK6 ainsi que des cyclines D1, D2 et E1, et à la répression de la protéine du rétinoblastome, causant une accélération de la progression du cycle cellulaire (**Figure 21B**) [151,152].

PRMT6, *via* la marque de méthylation de l'histone H3R2me2a, réprime l'expression de p21 et de p27, ce qui entraîne une dérégulation du cycle cellulaire. En absence de PRMT6, une accumulation de cellules en phase G2 a été montrée [153]. De plus, cette MPT de l'histone 3 est reconnue par la sérine/thréonine kinase Aurora B, qui va phosphoryler le résidu S10 de la même queue d'histone, conduisant à la condensation des chromosomes (**Figure 21C**) [154].

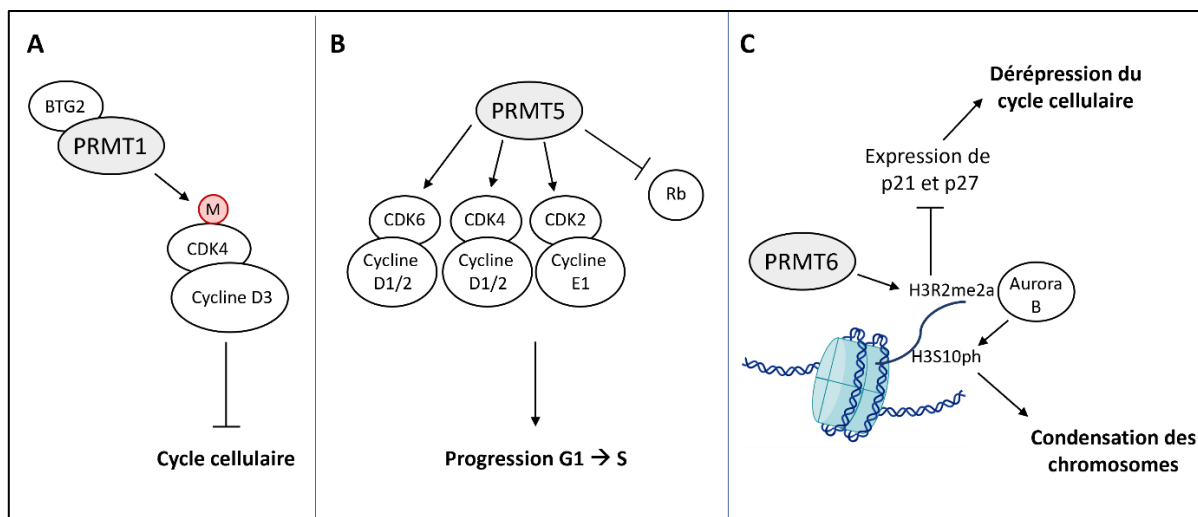


Figure 21. Les rôles des PRMT dans la régulation du cycle cellulaire. A. CDK4 est un substrat de PRMT1 lorsque celle-ci est dans un complexe avec le co-régulateur BTG2. La méthylation de CDK4 par PRMT1 entraîne un arrêt du cycle cellulaire. B. PRMT5 accélère la progression du cycle cellulaire de la phase G1 vers la phase S en augmentant l'expression des kinases CDK4, CDK6 et CDK2, des cyclines D1, D2 et E1, et en inactivant la protéine du rétinoblastome (Rb). C. PRMT6, via la marque de méthylation de l'histone H3R2me2a, réprime l'expression de p21 et de p27, entraînant une dérégulation du cycle cellulaire. Cette MPT de l'histone 3 est reconnue par Aurora B, qui va phosphoryler le résidu S10 de la même queue d'histone, puis la condensation des chromosomes.

Une analyse protéomique a permis d'identifier PRMT1 comme partenaire d'interaction directe d'UBAP2L (*UBiquitin-Associated Protein 2-Like*), nécessaire pour l'attachement correct du kinétochore aux microtubules. Les résidus arginine se trouvant dans le motif RGG/RG de celle-ci sont méthylés par PRMT1, modification nécessaire à l'alignement correct des chromosomes en métaphase et pour la distribution précise des chromosomes [155].

CARM1 agit comme coactivateur du gène de la Cycline E1 (*CCNE1*) avec NCOA3 (*Nuclear receptor Coactivator 3*) et par l'intermédiaire des sites de liaison de la famille des facteurs de transcription E2F (*E2 promoter binding Factor*). En effet, il a été montré que l'expression du gène *CCNE1* est altérée selon le niveau d'expression de CARM1. Il est suggéré un recrutement dépendant de E2F de CARM1 sur le gène *CCNE1* et sur un sous-ensemble d'autres gènes cibles des protéines E2F [156].

5. Rôles dans la réponse aux dommages de l'ADN

La méthylation de l'arginine est également un mécanisme important de la signalisation des dommages à l'ADN (DDR pour *DNA Damage Response*) et des processus de réparation de l'ADN. Plusieurs régulateurs de la DDR ont été identifiés comme substrats des PRMT, et leurs résidus arginine méthylés modulent leurs fonctions, leur stabilité, leur affinité de liaison à l'ADN et leur interaction avec d'autres protéines.

La protéine de réparation des cassures double-brin MRE11 fait partie du complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1), qui représente le principal complexe recruté sur les cassures double-brin de l'ADN. La méthyltransférase PRMT1 est capable de méthyler MRE11 sur son domaine GAR (*Glycine and Arginine-Rich regions*), permettant aux deux protéines de s'associer aux structures nucléaires. Cette méthylation est nécessaire à l'activité exonucléasique de MRE11 et à la réponse aux lésions de l'ADN en phase S [157,158]. Il est également suggéré que le motif GAR fonctionnel de MRE11 soit essentiel à l'activation de la voie ATR/CHK1 (*Checkpoint Kinase 1*) lors de cassures double-brin [159]. RAD9, qui est nécessaire à la RH, l'excision des bases, la réparation des mésappariements ainsi qu'à l'activation des points de contrôle G2/M et S/M, est méthylée sur trois résidus arginine (R172, R174 et R175) par PRMT5. La méthylation de RAD9 entraîne une résistance des cellules aux lésions de l'ADN, celle-ci étant nécessaire à l'activation de CHK1 induite par des génotoxines (**Figure 22A**) [160].

PRMT5 contrôle la réparation des cassures double-brin en utilisant le mécanisme de RH (Recombinaison Homologue). La protéine RUVBL1 (*RUVB-Like 1*) est méthylée par PRMT5, ce qui résulte en l'acétylation de l'histone 4 par KAT5. Cette acétylation empêche la liaison de 53BP1 à l'ADN, donc la voie de réparation NHEJ (*Non-Homologous End Joining*), améliorant ainsi la stabilité du génome (**Figure 22B**) [161]. La perte de PRMT5 induit un épissage aberrant de régulateurs clés de la réparation de l'ADN, dont KAT5, ce qui, à son tour, entraîne l'accumulation de 53BP1 sur les cassures génétiques et le blocage de la voie de réparation de l'ADN par RH. Ceci déclenche l'accumulation de dommages à l'ADN et une instabilité génomique accrue, conduisant finalement à l'activation de TP53 (*Tumor Protein P53*), à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose [162].

La protéine 53BP1 (*TP53-Binding Protein 1*) contribue à la détermination de l'équilibre entre les voies de réparation de l'ADN par NHEJ et par RH. En effet, 53BP1 limite la résection et favorise le NHEJ lors de sa liaison à l'ADN. Elle possède, tout comme MRE11, un domaine GAR. Celui-ci peut également être méthylé par PRMT1, cette diméthylation asymétrique étant nécessaire à l'activité de liaison à l'ADN de 53BP1. De même, une inhibition de la méthylation des résidus arginine empêche la localisation de 53BP1 sur les sites de dommages à l'ADN [163].

Une autre étude a renforcé l'hypothèse que 53BP1 soit méthylée de manière asymétrique sur plusieurs résidus arginine par PRMT1 à l'intérieur du motif GAR. La méthylation de 53BP1 se produit indépendamment de sa capacité d'oligomérisation [164].

Cette même protéine peut aussi être la cible d'une diméthylation symétrique par PRMT5, qui a les mêmes conséquences sur la réparation NHEJ, à savoir la stabilisation de 53BP1 à l'ADN. Néanmoins, cette méthylation est empêchée lorsque PRMT5 est phosphorylée par la tyrosine kinase Src (**Figure 22C**) [165].

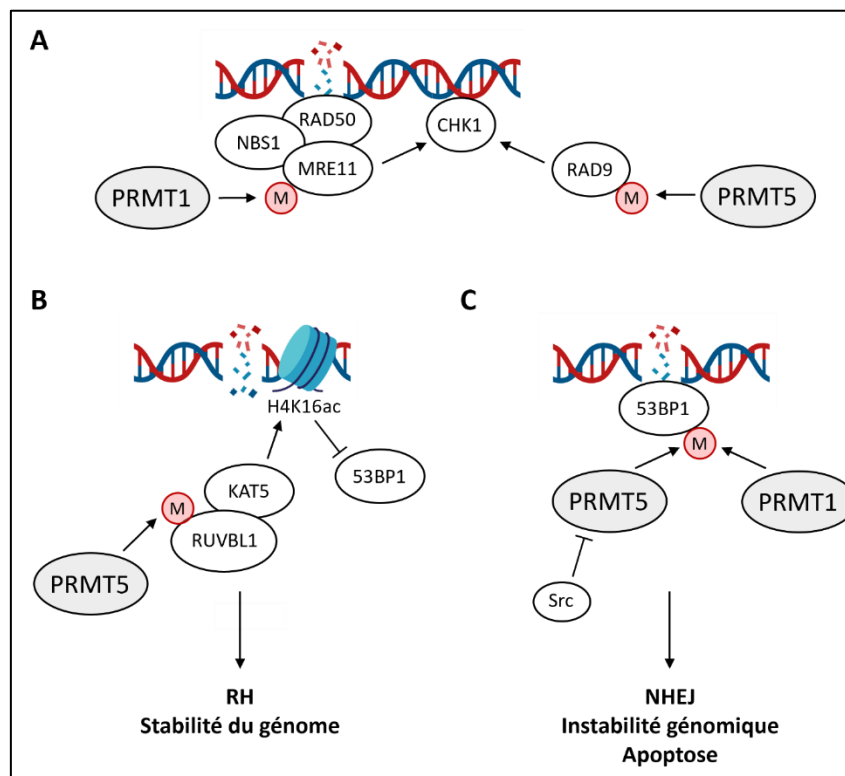


Figure 22. Rôles des PRMT dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. A. PRMT1 méthyle la protéine de réparation des cassures double-brin MRE11, qui fait partie d'un complexe de réparation des cassures double-brin avec RAD50 et NBS1. Cette méthylation est essentielle à l'activation de CHK1. Cette même protéine est également activée lorsque PRMT5 méthyle RAD9. B. PRMT5 méthyle RUVBL1, qui interagit et va activer l'acétyltransférase KAT5. L'acétylation de l'histone H4 par KAT5 empêche 53BP1 de se lier à l'ADN, entraînant des phénomènes de RH et une meilleure stabilité du génome. C. Dans le cadre des réparations NHEJ, PRMT1 et PRMT5 sont toutes deux capables de méthyle 53BP1, lui conférant une stabilité à l'ADN, ayant pour conséquence une instabilité génomique, d'où une apoptose favorisée. Néanmoins, cette méthylation peut être empêchée lorsque PRMT5 est phosphorylée par la tyrosine kinase Src.

L'ADN polymérase bêta (pol β), un acteur clé de la réparation par excision des bases de l'ADN, peut former un complexe avec PRMT1 et celle-ci méthyle spécifiquement pol β sur son résidu arginine 137. La méthylation de pol β par PRMT1 n'affecte ni son activité d'ADN polymérase ni de désoxyribose phosphate lyase.

Cependant, cette modification abolit son interaction avec PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), empêchant l'implication de pol β dans les événements métaboliques de l'ADN dépendants de PCNA [166]. À l'inverse, la méthylation de FEN1 (*Flap EndoNuclease 1*) sur le résidu R192 par PRMT5 prévient sa phosphorylation et facilite donc sa liaison avec PCNA. Le dialogue entre la méthylation et la phosphorylation de FEN1 exerce un rôle important dans la régulation de ses fonctions, notamment dans les processus de réplication et de réparation de l'ADN [167].

La protéine STRAP (*Serine/Threonine kinase Receptor Associated Protein*) recrute PRMT5 auprès de TP53 lorsque l'ADN est endommagé, ce qui permet sa méthylation. Une expression ectopique de PRMT5 augmente l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de TP53, tandis que des niveaux réduits de PRMT5 provoquent l'apoptose, ce qui suggère que PRMT5 influence le résultat de la réponse aux dommages à l'ADN [168]. D'autres travaux suggèrent que PRMT5 est nécessaire à l'expression de TP53 et à l'induction de l'expression de ses cibles MDM2 (*Mouse Double Minute 2 homolog*) et p21 en cas de dommages à l'ADN. De plus, il a été découvert que PRMT5 agit sur la prolifération cellulaire en modulant l'expression du facteur d'initiation de la traduction eIF4E (*eukaryotic translation Initiation Factor 4E*) [169].

Le facteur de transcription E2F1 est crucial dans le contrôle de la transcription des gènes codant pour des protéines du cycle cellulaire et de la réparation des dommages à l'ADN. E2F1, qui possède des similitudes de séquence avec TP53 au niveau du motif central de la protéine, est également méthylable par PRMT5. Cette modification affecte la liaison d'E2F1 à l'ADN, par conséquent son activité transcriptionnelle. Une baisse d'expression de PRMT5 est corrélée à une diminution de la croissance cellulaire et rend les cellules sensibles à l'apoptose dépendante de E2F1, ce qui coïncide avec les études réalisées sur TP53 [170].

E. Les PRMT dans l'hématopoïèse

1. Définition de l'hématopoïèse

Le mot « hématopoïèse » provient du grec « αίματος », le sang et « ποιεῖν », faire/fabriquer. C'est le processus physiologique hautement régulé au cours duquel tous les types de cellules sanguines sont formés. Dans l'espèce humaine, ce processus est mis en place dès les premiers stades du développement extra-embryonnaire. Il se déroule ensuite dans le foie, le placenta et enfin se prolonge tout au long de la vie, dans la BM (*Bone Marrow*, pour moelle osseuse) des os plats en majorité.

Les CSH (Cellules Souches Hématopoïétiques) sont des cellules capables de se maintenir en quiescence, de se renouveler et de se différencier afin de produire la totalité des lignages hématopoïétiques. Cette population de cellules n'est pas homogène puisqu'il a été démontré que les CSH ne contribuent pas toutes de la même façon à l'hématopoïèse [171]. Dans le cadre de la hiérarchie hématopoïétique, plusieurs modèles ont été proposés dans lesquels quatre compartiments majeurs sont décrits : les CSH multipotentes, les progéniteurs hématopoïétiques, les précurseurs et les cellules matures.

Dans le modèle présenté en **Figure 23**, dit « classique », les CSH sont d'abord capables d'engendrer des MPP (*Multipotent Progenitors*), qui se différencient en CMP (*Common Myeloid Progenitors*) ou en CLP (*Common Lymphoid Progenitors*). Les CMP produisent ensuite d'autres progéniteurs plus différenciés : les MEP (*Megakaryocyte/Erythroid Progenitors*), les GMP (*Granulocyte/Monocyte Progenitors*) et les progéniteurs des monocytes/cellules dendritiques. Les GMP vont ensuite générer les progéniteurs monocytaires et granulocytaires donnant respectivement les précurseurs des monocytes/macrophages et des granulocytes. Les MEP forment les progéniteurs mégacaryocytaires et érythroïdes produisant respectivement les précurseurs des plaquettes et des érythrocytes. Les CLP se différencient en précurseurs puis en lymphocytes B, T ou NK (*Natural Killer*). Les CLP, tout comme les progéniteurs des monocytes/cellules dendritiques, sont capables de former des cellules dendritiques [172].

Néanmoins, la caractérisation des hiérarchies aboutissant à la production des nouvelles cellules hématopoïétiques, notamment grâce aux nouvelles méthodes de séquençage d'une cellule unique « *single-cell sequencing* », est un sujet faisant encore actuellement débat. Le modèle « révisé » résulte de l'identification d'un nouveau type de progéniteurs multipotents nommé LMPP (*Lymphoid primed Multipotent Progenitors*) et de la mise en évidence de la capacité des CSH à se différencier en MEP. Il suggère que les MPP peuvent se différencier en MEP ou en LMPP, ces derniers étant capables de donner les GMP et les CLP mais pas les MEP [173].

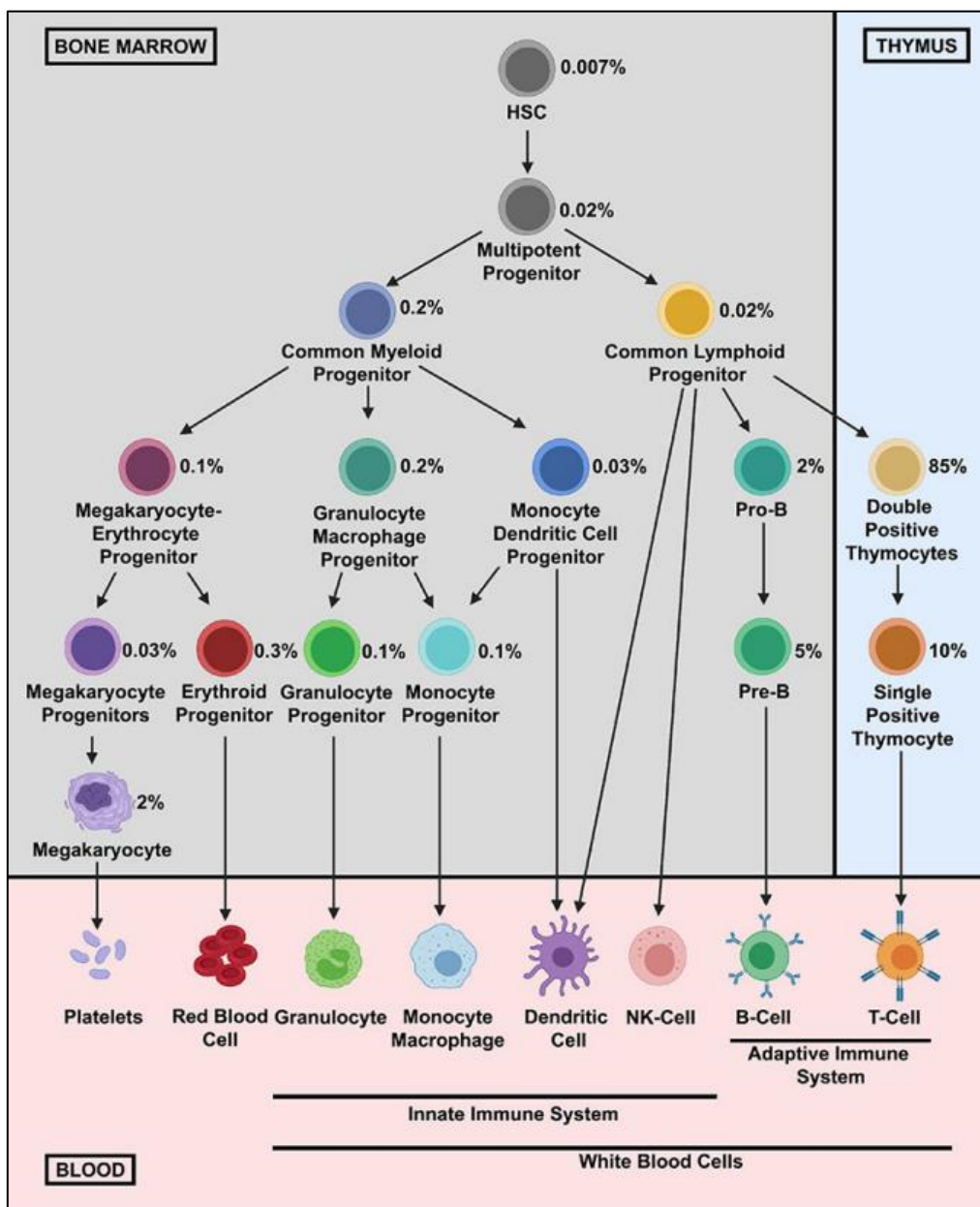


Figure 23. Représentation schématique de l'hématopoïèse adulte. Les CSH donnent naissance à des progéniteurs multipotents et à des progéniteurs hématopoïétiques restreints qui se différencient en plusieurs types de cellules sanguines. Les fréquences approximatives de chaque population cellulaire dans la moelle osseuse et le thymus sont indiquées. Schéma issu de Comazzetto, Shen & Morrison, 2021 [172].

Un autre modèle aujourd'hui reconnu et admis a fait son apparition ces dernières années, il s'agit du modèle continu. Dans celui-ci, les CSH ne passent pas par des états intermédiaires stables, mais acquièrent progressivement et de manière continue des états transcriptionnels liés à la lignée. Dans un tel modèle, les stades de développement en aval des CSH, tels que les MPP ou les CMP, ne représentent pas des types de cellules distincts, mais doivent plutôt être considérés comme des états transitoires au sein du « continuum » des CSH, remettant en question l'existence de populations cloisonnées [174,175].

2. Fonctions des PRMT dans l'hématopoïèse

Dans l'hématopoïèse, différents rôles des PRMT ont été démontrés, notamment les fonctions diverses de PRMT1, enzyme la plus étudiée dans ce contexte. Au cours de la différenciation des cellules hématopoïétiques, PRMT1 méthyle RUNX1, qui est impliquée dans l'hématopoïèse et la différenciation myéloïde. Cette méthylation se produit sur les résidus R206 et R210 et induit les fonctions de transactivation de RUNX1 [176].

La méthylation des résidus arginine de RUNX1 par PRMT1 n'est pas nécessaire au développement des lymphocytes T dans le thymus de souris portant une version mutée de *Runx1*, bien que cette MPT semble nécessaire au maintien de la population des lymphocytes T CD4⁺ périphériques [177]. Dans les cellules primaires humaines CD34⁺, la méthylation de RUNX1 contrôlée par PRMT1 agit sur la transcription du gène *CD41 (Integrin alpha-IIb)*, un marqueur précoce de l'hématopoïèse définitive également exprimé dans les mégacaryocytes et les MPP [176].

La surexpression de PRMT1 dans les CSH CD34⁺ humaines induit une diminution de l'expression de CD41 au cours de la mégacaryopoïèse induite par la TPO (Thrombopoïétine). Par conséquent, PRMT1 pourrait contribuer à l'inhibition de la mégacaryopoïèse induite par la TPO [178]. L'expression de PRMT1 est relativement faible dans les LT-HSC (*Long-Term Hematopoietic Stem Cells*), alors qu'elle est élevée dans les cellules progénitrices myéloïdes, l'expression la plus forte se trouvant dans les progéniteurs mégacaryocyto-érythrocytaires. L'inhibition de PRMT1 dans les CSH CD34⁺ humaines entraîne une augmentation de la proportion des mégacaryocytes matures [179].

PRMT5 freine la prolifération des CSH et des cellules progénitrices, sa surexpression entraînant une baisse de la capacité des cellules à former des colonies. Des altérations des différenciations érythroïde et granulo-monocytaire sont également rapportées lorsque PRMT5 est désactivée. La phosphorylation de PRMT5 par le mutant actif JAK2V617F entrave son activité de méthylation comme précédemment décrit, diminuant les populations de cellules hématopoïétiques [96].

Il a également été mis en évidence que la délétion de *Prmt5* chez la souris provoque une pancytopenie sévère et une perte de cellules progénitrices hématopoïétiques au profit des LT-HSC et des cellules LSK (Lin⁻cKit⁺Sca-1⁺). La perte de *Prmt5* affecte profondément la différenciation érythroïde dans la BM et le développement précoce des thymocytes dans le thymus. Dans les cellules de la BM, PRMT5 agit sur la signalisation des cytokines [180]. Elle peut coopérer avec la lysine déméthylase KDM3B pour contrôler la déméthylation symétrique de H4R3 au niveau des promoteurs des gènes hématopoïétiques. Cela provoque une régulation de la transcription de gènes clés pour la survie, la prolifération et la différenciation des CSH [181].

Dans les types cellulaires plus matures tels que les monocytes et les macrophages, diverses fonctions de PRMT1 ont été mises en exergue. PRMT1 contrôle le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I à travers l'existence d'une boucle de régulation HIF-1 α -PRMT1 et la modulation de l'expression de HLA-B (*Human Leukocyte Antigen-B*) [182]. Elle agit aussi sur la méthylation de CIITA (*Class II, major histocompatibility complex, Transactivator*), favorisant ainsi sa dégradation [183]. Dans les macrophages, PRMT1 méthyle la GAPDH (*Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*), supprimant sa S-nitrosylation induite par l'oxyde nitrique libéré en réponse au LPS (Lipopolysaccharides) et à l'IFN γ (Interféron γ), ce qui conduit à l'inhibition de la mort cellulaire des macrophages [184].

Bien que PRMT1 ne semble pas essentielle pour le nombre, le phénotype ou la distribution des lymphocytes B matures dans la rate de souris, cette enzyme est impliquée dans leur activation et leur différenciation. En outre, PRMT1 est nécessaire dans les lymphocytes B pour plusieurs processus impliqués dans l'immunité humorale [185] et pour leur fonctionnalité. En effet, les souris *Prmt1*^{-/-} arborent des défauts dans la réponse aux anticorps à partir d'une stimulation antigénique indépendante des lymphocytes T [186].

Néanmoins, un rôle pour PRMT1 a été mis en évidence dans ces lymphocytes T, plus précisément dans leur polyfonctionnalité. En effet, les lymphocytes T CD8⁺ exprimant PRMT1 produisent des niveaux plus élevés d'IL2 et sont associées à une polyfonctionnalité accrue. Cet effet résulte d'une régulation épigénétique de l'expression des gènes effecteurs par la méthylation de H4R3 par PRMT1 [187].

Il a également été établi que PRMT1 pouvait affecter la différenciation des lymphocytes Th17 en contrôlant le recrutement mutuel de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) et STAT5 *via* la méthylation H4R3, ce qui entraîne l'activation de l'expression du gène de l'IL17 [188]. Dans les lymphocytes T CD4⁺, PRMT1 méthyle FOXP3 (*Forkhead box P3*) au niveau des résidus R48 et R51 et l'inhibition de leur interaction entraîne une baisse de leur activité, ce qui montre que la méthylation de ces résidus accentue les fonctions suppressives des lymphocytes T [189].

PRMT5 participe également à la lymphopoïèse T, plus précisément dans le développement des lymphocytes T CD8⁺. La déplétion spécifique de PRMT5 dans ces cellules renforce la différenciation en lymphocytes T effecteurs KLRG1⁺ (*Killer cell Lectin-like Receptor subfamily G member 1*) par la perte des marques épigénétiques H4R3me2s et H3R8me2s, améliorant la transcription de *Blimp-1* (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) [190].

CARM1 est une enzyme essentielle pour le développement des progéniteurs des lymphocytes T précoces. La thymopoïèse des souris *Carm1*^{KO} est bloquée entre les stades DN1 et DN2 [191] du fait que TARPP (*Thymocyte cyclic AMP -Regulated Phosphoprotein*) soit méthylée par CARM1 au niveau du résidu R650 dans les lymphocytes T immatures. Cette méthylation stimule la différenciation des progéniteurs thymocytaires précoces [192].

III. Les PRMT dans les cancers

A. Les PRMT dans les hémopathies malignes

1. Nouvelle classification des hémopathies malignes

Les différentes classes de pathologies sont présentées telles qu'elles le sont dans la 5^{ème} édition de la classification des hémopathies malignes de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) publiée en juin 2022. Celles-ci sont séparées en deux catégories : les hémopathies lymphoïdes [193] et les hémopathies myéloïdes et histiocytiques/dendritiques, dont font partie les LAM (Leucémies Aiguës Myéloïdes ou Myéloblastiques), objets de la présente étude [194].

a) *Néoplasies lymphoïdes*

Les hémopathies lymphoïdes sont subdivisées en trois classes, qui ne seront pas extensivement détaillées : Les proliférations lymphoïdes et lymphomes à cellules B, les proliférations lymphoïdes et lymphomes à cellules T et NK, et les néoplasies des tissus lymphoïdes dérivés du stroma.

Le consortium des hématologues s'accorde à dire que l'augmentation spectaculaire des informations concernant les tumeurs lymphoïdes et leur complexité moléculaire suggère que les célèbres mots de Fiodor Dostoïevski, « La réalité est infiniment diverse [...et] la réalité résiste à la classification », s'appliquent à la classification des lymphomes.

b) *Néoplasies myéloïdes et histiocytaires/dendritiques*

- Néoplasies myéloprolifératives : Les MPN (*Myeloproliferative Neoplasm*) incluent entre autres la leucémie myéloïde chronique définie par la fusion *BCR::ABL1* résultant de la translocation $t(9;22)(q34;q11)$.
- Mastocytoses : Les mastocytoses sont un groupe hétérogène d'affections rares caractérisées par l'accumulation ou la prolifération anormale de mastocytes dans un ou plusieurs organes. La classification reconnaît trois types de pathologies : la mastocytose systémique, la mastocytose cutanée et le sarcome à mastocytes.

- Néoplasies myélodysplasiques : La nouvelle classification introduit le terme de MDS (*Myelodysplastic Neoplasm*) pour remplacer les syndromes myélodysplasiques, soulignant leur nature néoplasique et harmonisant la terminologie avec celle des MPN.
- Néoplasies myélodysplasiques/myéloprolifératives : La LMMC (Leucémie Myélomonocytaire Chronique) fait partie de cette catégorie qui se définit par le chevauchement des caractéristiques pathologiques et moléculaires des MDS et des MPN, se manifestant souvent cliniquement par diverses combinaisons de cytopénies.
- Néoplasies myéloïdes secondaires : Les néoplasies myéloïdes secondaires surviennent à la suite d'une exposition à un traitement cytotoxique ou d'une prédisposition germinale.
- Autres : D'autres classes de néoplasies myéloïdes et histiocytaires/dendritiques ont été décrites. Parmi elles, sont distingués les néoplasies myéloïdes/lymphoïdes avec éosinophilie et fusions de gènes de tyrosine kinase (MLN-TK), la leucémie aiguë de lignée ambiguë, la leucémie aiguë de phénotype mixte, les néoplasies des cellules histiocytaires/dendritiques, et les syndromes tumoraux génétiques avec prédisposition à la néoplasie myéloïde (catégorie à laquelle appartient notamment l'anémie de Fanconi).

c) Les leucémies aiguës myéloblastiques

La nouvelle classification a pour but de distinguer les LAM présentant des anomalies génétiques déterminantes des LAM, définies selon leur stade de différenciation (**Tableau 1**). Basée sur des analyses rétrospectives, l'ELN (*European LeukemiaNet*) proposa également dès 2010 une classification du pronostic des patients atteints de LAM en 3 groupes de risques : favorable, intermédiaire et défavorable, en fonction du statut génétique et mutationnel des blastes. Cette classification fut révisée en fonction de l'évolution des connaissances et de l'identification de nouvelles anomalies en 2017 [195] puis en 2022 [196].

Tableau 1. Classification des leucémies aiguës myéloïdes selon l’OMS (5^{ème} édition). Adapté de Khoury *et al.*, 2022 [194].

Les leucémies aiguës myéloïdes avec des anomalies génétiques déterminantes
Leucémie aiguë promyélocytaire avec fusion <i>PML::RARA</i>
Leucémie aiguë myéloïde avec fusion <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
Leucémie aiguë myéloïde avec fusion <i>CBFB::MYH11</i>
Leucémie aiguë myéloïde avec fusion <i>DEK::NUP214</i>
Leucémie aiguë myéloïde avec fusion <i>RBM15::MRTFA</i>
Leucémie aiguë myéloïde avec fusion <i>BCR::ABL1</i>
Leucémie aiguë myéloïde avec réarrangement <i>KMT2A</i>
Leucémie aiguë myéloïde avec réarrangement <i>MECOM</i>
Leucémie aiguë myéloïde avec réarrangement <i>NUP98</i>
Leucémie aiguë myéloïde avec mutation <i>NPM1</i>
Leucémie aiguë myéloïde avec mutation <i>CEBPA</i>
Leucémie aiguë myéloïde liée à une myélodysplasie
Leucémie aiguë myéloïde avec d’autres altérations génétiques
Leucémies aiguës myéloïdes, définies par le stade de différenciation
Leucémie aiguë myéloïde à différenciation minimale
Leucémie aiguë myéloïde sans maturation
Leucémie aiguë myéloïde avec maturation
Leucémie aiguë à basophiles
Leucémie aiguë myélomonocytaire
Leucémie aiguë monocytaire
Leucémie érythroïde aiguë
Leucémie aiguë mégacaryocytaire

La découverte de l’efficacité de la cytarabine et des anthracyclines sur les myéloblastes, et leur combinaison dans les années 1970 dans ce qui est connu sous le nom de « schéma 3 + 7 » (3 jours de daunorubicine + 7 jours de cytarabine) a permis d’obtenir la guérison chez 30 à 40% des patients atteints de LAM éligibles à une induction lourde, et représente encore aujourd’hui le standard de traitement dans cette population. Cette stratégie de chimiothérapie intensive ne permet toutefois pas de s’affranchir de l’allogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez les sujets jeunes atteints de LAM de pronostic intermédiaire ou défavorable selon la classification ELN 2022. La mortalité liée à ce type de transplantation a été significativement améliorée au cours des dernières décennies notamment *via* le développement du Letermovir dans la prophylaxie des réactivations du cytomégalovirus (CMV) post-allogreffe. Ainsi, la survie des patients allogreffés est étroitement liée à la rechute post-greffe, situation présentant un pronostic particulièrement défavorable [197].

Chez le sujet âgé, le traitement de référence repose sur la combinaison d'un agent hypométhylant de l'ADN et d'un inhibiteur de BCL2. Les progrès dans la compréhension de la physiopathologie des LAM et le développement des thérapies ciblées permettent aujourd'hui l'essor d'une médecine personnalisée s'adaptant aux caractéristiques génétiques et moléculaires des blastes (inhibiteurs de FLT3, IDH1/2, anticorps monoclonal ciblant CD33).

Il est à noter que la LAM3 selon la classification de FAB, désormais appelée LAP (Leucémie Aiguë Promyélocytaire) et associée à une translocation *PML::RARA*, est une entité clinico-pathologique unique qui représente 5 à 10% des patients atteints de LAM. La LAP est traitée chez le sujet jeune par induction lourde « 3+7 » en association avec l'acide rétinoïque tout trans (ATRA pour *All-Trans Retinoic Acid*), suivi par 4 cycles de consolidation par ATRA et arsenic, et présente un excellent pronostic par rapport aux autres sous-types de LAM non-LAP [198].

2. Fonctions des PRMT dans les hémopathies malignes

L'importance de la méthylation de l'arginine pour la régulation de la différenciation, de la prolifération et de l'auto-renouvellement des cellules hématopoïétiques a été précédemment décrite. Dans diverses classes d'hémopathies malignes, les PRMT permettent la progression de la maladie par la méthylation des queues d'histones qui contrôlent l'activation ou la répression de la transcription des gènes cibles.

Celles-ci sont également capables de méthyler directement des facteurs de transcription ou des protéines impliquées dans divers processus cellulaires : épissage et traitement des ARN, processus de réparation des lésions de l'ADN, prolifération, cycle cellulaire et transduction du signal dans diverses voies de signalisation (**Figure 24**).

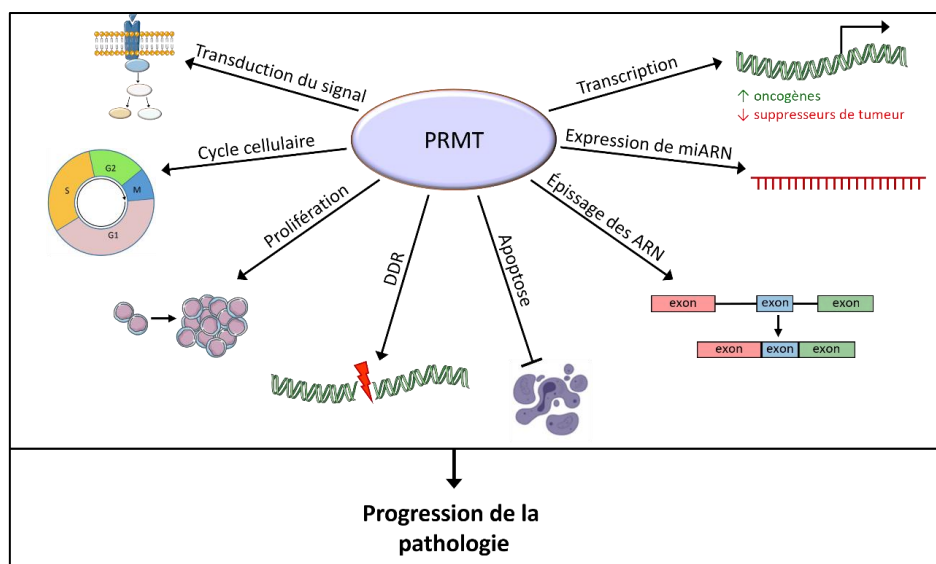


Figure 24. Les différentes fonctions cellulaires des PRMT dans les hémopathies malignes. Schéma adapté de Sauter *et al.*, 2022 [129].

a) *PRMT1*

PRMT1 a un rôle central dans la leucémogénèse, ses fonctions ayant été caractérisées dans les LAM et les LAL (Leucémies Aiguës Lymphoïdes). Dans les leucémies à réarrangements MLL (*Mixed-Lineage Leukemia*), la méthylation de la tyrosine kinase FLT3 (*Fms Like Tyrosine kinase 3*) sur les arginines R972 et R973 par *PRMT1* permet le maintien des cellules leucémiques *in vitro*. Une baisse d'expression provoquée (*knockdown* de *PRMT1*) favorise l'éradication des cellules de LAL à réarrangements MLL [199].

Dans un contexte de LAM, *PRMT1* catalyse également la méthylation de la protéine de fusion FLT3-ITD⁺ au niveau des résidus R972 et R973. La désactivation de *PRMT1* bloque la survie et la croissance des cellules leucémiques, avec un effet inhibiteur plus puissant dans les cellules FLT3-ITD⁺ que dans les cellules de LAM FLT3 WT (*wild-type*) [200].

Dans les cellules souches cancéreuses à réarrangements MLL dérivées de LSK, la fonction de *PRMT1* est coréglée par la β -caténine et HOXA9 (*Homeobox protein Hox-A9*) et, en contrôlant des voies de signalisation similaires à celles de la β -caténine et de HOXA9, *PRMT1* est directement impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules leucémiques [201]. La protéine de fusion MLL-ELN coopère avec *PRMT1* dans les LAM pour promouvoir la méthylation de H4R3 en tant que complexe de régulation transcriptionnelle oncogénique. La fusion directe de MLL avec *PRMT1* augmente l'auto-renouvellement des cellules hématopoïétiques [202].

Les modèles murins de LAM KMT2A-GAS7 (MLL-GAS7) ou KAT6A-NCOA2 (MOZ-TIF2) révèlent que le recrutement conjoint de PRMT1 et de l'histone déméthylase KDM4C est nécessaire pour l'induction de la leucémie. Le complexe KMT2A/PRMT1/KDM4C contrôle la marque H3K9me3 au niveau des promoteurs de gènes cibles, notamment les gènes *HOX* [203].

La protéine de fusion RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) identifiée dans les LAM résulte de la translocation t(8;21)(q22;q22). La protéine AE9a, une isoforme d'épissage de RUNX1-RUNX1T1, est méthylée par PRMT1 au niveau du résidu R142, activant ainsi la transcription des gènes cibles d'AE9a. La déplétion de *PRMT1* supprime la prolifération et freine l'auto-renouvellement des cellules progénitrices [204].

Comme décrit précédemment, PRMT1 méthyle la protéine de liaison à l'ARN RBM15 (*putative RNA-Binding protein 15*) au niveau du résidu R578 dans les leucémies mégacaryocytaires aiguës. PRMT1 interagit physiquement avec la ligase E3 responsable de l'ubiquitinylation de celle-ci, ce qui conduit à sa dégradation, inhibant ainsi la mégacaryopoïèse [179]. Dans les LAL, PRMT1 est impliquée dans l'épissage et des niveaux élevés d'ARNm de *PRMT1* et de *SRSF1* (*Serine/arginine-Rich Splicing Factor 1*) sont détectés dans les échantillons de LAL pédiatriques. Il est intéressant de noter que les deux protéines interagissent *in vitro* dans les modèles de LAL. SRSF1 a un rôle anti-apoptotique et pourrait contribuer à la leucémogénèse en coopérant avec PRMT1 [205].

b) *CARM1*

CARM1 contribue aussi de façon importante à l'érythropoïèse grâce à son interaction directe avec la protéine de remodelage de la chromatine Mi2. CARM1 et Mi2 forment un complexe avec le facteur de transcription c-Myb et modulent la transcription des gènes cibles de c-Myb dans plusieurs lignées cellulaires leucémiques [206].

L'initiation des LAM est dépendante de CARM1. En effet, des souris déficientes en *Carm1* ne développent pas de leucémie même un an après transplantation de cellules leucémiques. De même, cette enzyme est nécessaire au maintien de la leucémie induite par l'oncogène AE9a puisque les souris dépourvues de *Carm1* présentent une amélioration significative de la survie [207]. L'inhibition de *CARM1* induit une différenciation myéloïde des lignées cellulaires de LAM, confirmant que celle-ci réduit la charge leucémique [108].

c) PRMT5

Diverses fonctions de PRMT5 ont été récemment caractérisées dans les LAM. En premier lieu, son activité méthyltransférase est importante pour le développement des LAM arborant le réarrangement MLL-AF9. Dans des lignées cellulaires de LAM, la méthylation de SRSF1 par PRMT5 affecte notamment sa liaison aux ARNm et aux protéines [208]. Dans les LAM KMT2A-MLLT3 (MLL-AF9), l'expression de PRMT5 dépend de CDC73 (*Cell Division Cycle 73*), qui fait partie du complexe transcriptionnel PAF (*Platelet-Activating Factor*), afin de promouvoir l'expression d'autres facteurs oncogéniques tels que STAT5 et HOXA9 [209].

La surexpression de PRMT5 entraîne une augmentation de la croissance des cellules leucémiques, en particulier dans les blastes primaires FLT3-ITD⁺ par rapport aux patients FLT3 WT. À l'inverse, la déplétion de PRMT5 réduit significativement la croissance des cellules de la LAM, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* [123]. Les patients atteints de LAM présentent une expression accrue de PRMT5 et une corrélation positive avec l'expression de LILRB4 (*Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor subfamily B member 4*). L'expression de LILRB4 est déclenchée par l'activation de la voie mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) par PRMT5, ce qui favorise l'envahissement des cellules de LAM [210].

PRMT5 est également fortement exprimée dans les LAP (Leucémies Aiguës Promyélocytaires), un sous-type de LAM très généralement piloté par l'oncoprotéine PML-RAR α . PRMT5 supprime à la fois l'ubiquitinylation et la dégradation de PML-RAR α et inhibe son interaction avec l'E3 ubiquitine ligase RNF4 (*RING Finger protein 4*) par sa méthylation, contribuant ainsi à la prolifération des cellules leucémiques [211].

Dans les lignées cellulaires de LLC (Leucémie Lymphoïde Chronique) à lymphocytes B, la surexpression de PRMT5 est due à l'augmentation de sa traduction, causée par une altération de l'expression des miR-19a, -25, -32, -92b et -96, qui la ciblent. Cette surexpression conduit à l'inhibition des gènes cibles de PRMT5 du fait de son rôle épigénétique au niveau de H4R3 et H3R8, en particulier la famille de gènes suppresseurs de tumeurs du rétinoblastome [212].

Des observations similaires rapportées dans les MCL (*Mantle Cell Lymphoma*) montrent que les lignées cellulaires issues de MCL avec une expression accrue de PRMT5 présentent des expressions aberrantes de miR-92b et miR-96. Chez les patients affectés par cette hémopathie maligne, l'expression accrue de PRMT5 inhibe l'expression de *ST7* (*Suppressor of Tumorigenicity protein 7*) par le biais d'un profil de méthylation H4R3 et H3R8 altéré. D'autre part, le *knockdown* de PRMT5 entrave la prolifération et la croissance des lymphocytes B transformés [213], et augmente *via* sa fonction épigénétique l'expression des miR-33b, miR-96 et miR-503, comme décrit précédemment. Il est prévu que ces miARN se lient à la fois à la cycline D1 et à c-MYC pour réduire leurs expressions, diminuant ainsi la survie des cellules de lymphome à lymphocytes B [214].

Il a été démontré que PRMT5 est un oncogène pilote (ou *driver*) lorsqu'il coopère avec la cycline D1^{T286A}. Cette dernière active PRMT5 par la phosphorylation de MEP50, ce qui entraîne une méthylation suivie d'une inhibition de l'apoptose dépendante de TP53 dans des lignées de leucémie et de lymphome [215].

Dans les LNH (Lymphomes Non Hodgkiniens), PRMT5 module la voie TP53/NF- κ B p52/BCL3, qui renforce la signalisation proliférative de la cycline D1. En outre, la surexpression de PRMT5 réduit l'activité des protéines du rétinoblastome RB1 et RBL2 et augmente l'expression de PRC2 (*Polycomb Repressor Complex 2*) dans les échantillons de patients atteints de LNH [216].

L'augmentation des expressions de la cycline D1, c-MYC et de la survivine résulte d'un rôle de répression épigénétique de PRMT5 au niveau des promoteurs d'*AXIN2* (*Axis Inhibition protein 2*) et de *WIF1* (*Wnt Inhibitory Factor 1*), antagonistes de la voie pro-tumorale WNT/ β -Caténine. Cette répression génère une activation constitutive des voies de signalisation AKT/GSK3 et WNT/ β -caténine [217].

Au cours de la lymphomagenèse, la protéine MYC accroît directement l'expression de PRMT5, protégeant ainsi l'activité des protéines Sm et entraînant la transcription de gènes impliqués dans l'épissage de l'ARNm, la survie cellulaire et la prolifération.

Des effets anti-prolifératifs et anti-apoptotiques sont observés dans les lymphomes à lymphocytes B dépourvus de PRMT5 à l'aide d'oligonucléotides antisens, conséquences de l'altération de l'épissage des gènes impliqués dans la lymphomagenèse [218]. Après l'activation du BCR (*B-Cell Receptor*) et le déclenchement subséquent de la voie de signalisation PI3K/AKT, la transcription de PRMT5 dépendante de MYC induit la progression du cycle cellulaire, ce qui augmente la survie et la prolifération des cellules dans les LDGC-B (Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B), ABC (*Activated B-Cell-like* ou à lymphocytes B actifs) et GC (*Germinal Center* ou à centres germinatifs). Dans les LDGC-B ABC, la transcription de PRMT5 est également stimulée par l'activation de la voie NF- κ B par BTK (*Bruton's Tyrosine Kinase*) [219]. Dans les centres germinatifs, BCL6 (*B-Cell Lymphoma 6*) est méthylée au niveau du résidu R305 par PRMT5, ce qui entraîne la formation de GC, la maturation, ainsi que la survie et la prolifération des cellules de lymphomes B [220].

Chez les patients atteints de MM (Myélome Multiple), PRMT5 est souvent surexprimée et est associée à une baisse de la survie sans progression et de la survie globale [221]. Dans les lignées cellulaires de MM, PRMT5 contrôle la pyroptose, une forme hautement inflammatoire de mort cellulaire programmée lytique, par l'inhibition de CASP1 (caspase 1). Le *knockdown* de PRMT5 induit l'expression de CASP1 et son clivage, et la pyroptose peut être restaurée dans ce modèle en désactivant CASP1 [222]. La **Figure 25** résume les protéines cibles de PRMT5 dans les hémopathies malignes et les processus cellulaires dans lesquels elles sont impliquées.

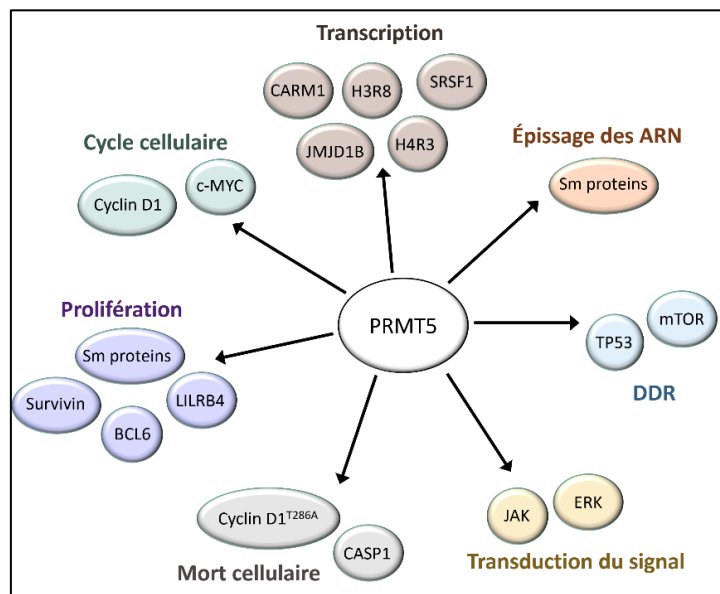


Figure 25. PRMT5 interagit avec un large éventail de protéines impliquées dans un grand nombre de fonctions cellulaires. Adapté de Sauter *et al.*, 2022 [129].

d) *PRMT6*

Dans les LAM, la marque H3R2me2a est considérée *in vivo* comme le principal site de méthylation de PRMT6 [223]. Cette marque empêche la méthylation de H3K4 ainsi que la liaison à la queue de l'histone H3 par le complexe de méthyltransférases ASH2/WDR5/KMT2A, inhibant de ce fait la transcription de gènes connus pour être régulés par H3K4me3, tels que les gènes dépendants de HOX et de MYC [224].

L'inactivation de *PRMT6* dans des cellules d'érythroleucémie entraîne une diminution significative de la prolifération et une augmentation du nombre de cellules en phase G1 du cycle cellulaire en raison d'une baisse d'expression de la cycline D1. Dans les cellules leucémiques, LEF1 (*Lymphoid Enhancer-binding Factor-1*) interagit avec PRMT6, provoquant son recrutement au niveau du promoteur de la cycline D1 [225].

PRMT6 est capable d'interagir avec RUNX1, affectant négativement l'expression des gènes mégacaryocytaires, inhibant ainsi la différenciation des cellules progénitrices CD34⁺ humaines. Lors de la différenciation mégacaryocytaire induite par la thrombopoïétine (TPO), la marque de méthylation H3R2 est perdue au profit de celle sur H3K4, ce qui augmente notamment l'expression du gène *IL6ST* (*IL6 Signal Transduction*) par l'action de PAD4 lors de l'activation de l'expression du gène cible *SCL* (*TAL1*) (*Stem Cell Leukemia, T-ALL-1*) [226,227].

e) *PRMT7*

Des niveaux élevés de transcrits de *PRMT7* sont observés dans les LAL-T, en particulier dans les sous-types de LAL-T matures. Une déplétion génétique de *PRMT7* réduit la formation de colonies et la viabilité des cellules de LAL-T et, plus important encore, ces cellules présentent un statut de monométhylation de RUNX1 altéré, ce qui perturbe l'expression de ses gènes cibles. Parmi eux, *BCL11A* (*B-Cell Lymphomalleukemia 11A*) et *DNTT* (*DNA Nucleotidylexotransferase*), qui sont des régulateurs du développement des lymphocytes T, ont été identifiés, ce qui indique que PRMT7 a un effet indirect sur la pathogenèse de la LAL-T, par le biais de la monométhylation de RUNX1 [228]. Le ciblage de PRMT7 par délétion ou inhibition génétique retarde le développement de la LMC (Leucémie Myéloïde Chronique) et empêche l'auto-renouvellement des CSL (Cellules Souches Leucémiques) dans des modèles de LMC murins et humains.

B. Rôle des PRMT dans les cancers solides

Les arginine méthyltransférases participent aussi au développement de cancers solides. Des travaux ont été réalisés sur de nombreuses formes de cancers et ne seront pas présentés dans ce manuscrit. Nous retrouvons notamment des analyses fonctionnelles des PRMT dans les cancers du sein [229–231], colorectaux [232–234], de la prostate [235], des poumons [101,236,237] et du pancréas [238], les tumeurs au cerveau [239], les carcinomes hépatocellulaires [240,241] et de l'appareil digestif [242], les mélanomes [243], les cancers de la tête et du cou [244], les cancers des ovaires [245] et de la vessie [246].

Les arginine méthyltransférases sont, dans la plupart des cas, associées à un mauvais pronostic en accentuant la tumorigenèse *via* le contrôle d'un large panel de processus cellulaires. Dans les cancers solides tout comme dans les hémopathies malignes, les PRMT affectent le cycle cellulaire, la réponse inflammatoire, les fonctions immunitaires, la transduction du signal et la réponse aux dommages de l'ADN. De plus, elles favorisent la TEM (Transition Épithélio-Mésenchymateuse), propageant ainsi plus facilement les métastases. C'est pourquoi les PRMT représentent des cibles thérapeutiques idoines dans ces pathologies.

C. Les PRMT comme cibles dans les hémopathies malignes

1. Utilisation d'inhibiteurs de PRMT

Le **Tableau 2** présente les molécules chimiques qui ont été développées afin d'inhiber l'activité d'une ou d'un type de PRMT dans les hémopathies malignes. Elles ont été testées sur plusieurs modèles, notamment des lignées cellulaires humaines, des échantillons primaires de patients, des modèles murins d'hémopathies malignes ainsi que des xénogreffes d'échantillons primaires dans des souris immunodéficientes.

Plusieurs inhibiteurs de PRMT1 et de PRMT de type I montrent les mêmes effets sur les lignées cellulaires de LAM, avec une inhibition de la croissance cellulaire et une diminution de la viabilité des cellules [200,203,204,247–249]. Dans un modèle de xénogreffes, une augmentation de la survie globale des souris a été rapportée [203]. L'inhibiteur de PRMT1 a un effet synergique lorsqu'il est utilisé avec un inhibiteur de tyrosine kinase dans des modèles de PDX (xénogreffes dérivées de patients) de LAM et de LAL [200,250].

Tableau 2. Composés inhibiteurs des PRMT et utilisation sur des modèles d'hémopathies malignes.

PRMT inhibée(s)	Composé (alias)	IC ₅₀	Pathologie	Modèles expérimentaux	Références
PRMT de type I	MS023 [251]	30 nM (PRMT1)	LAL	Lignées cellulaires, échantillons primaires, PDX	[250]
		119 nM (PRMT3)			
	Compound 28d [248]	83 nM (CARM1)	LAM	Lignées cellulaires, échantillons primaires, PDX	[200,247]
4 nM (PRMT6) 5 nM (PRMT8)		LAM	Lignées cellulaires	[248]	
PRMT1	AMI-408 (compound 4) [252]	ND	LAM	Lignées cellulaires, xénogreffes murines	[203]
	TC-E 5003 (compound 2e) [253]	1 µM	LAL	Lignées cellulaires	[250]
			LAM	Lignées cellulaires	[200]
	RM-65 [254]	55 µM	LAM	Lignées cellulaires	[204]
DB75 (Furamidine) [249]	9,4 µM	LAMK	Lignées cellulaires	[179]	
CARM1	EPZ025654 (GSK35336023) [255]	3 nM	LAM	Lignées cellulaires, échantillons primaires, PDX	[207]
	TP-064 [256]	<10 nM	LNH	Lignées cellulaires	[257]
			MM	Lignées cellulaires	[256]
	EZM2302 (GSK3359088) [255]	6 nM	MM	Lignées cellulaires, gavage chez des souris xénogreffées	[255]
			LAM	Gavage chez des souris transplantées	[207]
PRMT5	EPZ015666 (GSK3235025) [258]	22 nM	LNH	Gavage chez des souris transplantées	[257]
			LAM	Lignées cellulaires, échantillons primaires, gavage chez des souris transplantées	[208,209,247,259]
			LLC	Lignées cellulaires	[260]
	EPZ015866 (GSK3203591) [261]	4 nM	LNH	Lignées cellulaires, PDX	[219]
			MM	Lignées cellulaires, échantillons primaires, gavage chez des souris xénogreffées	[221]
	EPZ015938 (GSK3326595) [262]	6,2 nM	LNH	Lignées cellulaires, échantillons primaires	[220,262]
			MM	Lignées cellulaires	[222]
	GSK3186000A (compound 14) [261]	11 nM	LAM	Lignées cellulaires	[247,263]
	PJ-68 [265]	517 nM	LMC	Lignées cellulaires, échantillons primaires, IP dans des souris transplantées	[265]
	HLCL-61 [123]	7,21-21,46 µM	LAM	Lignées cellulaires, échantillons primaires	[123]
LLY-283 [266]	22 nM	LAM	Lignées cellulaires	[263]	
CMP-5 [267]	ND	LNH	Lignées cellulaires, échantillons primaires	[217]	
C220 [268]	ND	MPN	Lignées cellulaires, gavage chez des souris transplantées	[268]	
PRMT7	JS1310 [269]	5 µM	LMC	Souris leucémiques, échantillons primaires, PDX	[269]

ND : non déterminé ; LAL : leucémie aiguë lymphoïde ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; LNH : lymphome non Hodgkinien ; LAMK : leucémie aiguë mégacaryocytaire ; LMC : leucémie myéloïde chronique ; MM : myélome multiple ; MPN : *myeloproliferative neoplasm* ; PDX : xénogreffe dérivée de patient ; IP : injection intrapéritonéale.

Plusieurs inhibiteurs spécifiques de CARM1 ont également été développés. Ils réduisent la croissance du LNH, du MM et la viabilité des lignées cellulaires de la LAM. Le gavage de souris avec l'inhibiteur de CARM1 biodisponible par voie orale EZM2302 améliore la survie dans un modèle de LAM et diminue la croissance dans les modèles de souris de LNH et de MM. L'implication de CARM1 dans le contrôle du cycle cellulaire est également mise en évidence à travers le fait que les lignées cellulaires de MM et de LNH inhibées ont un arrêt du cycle cellulaire plus précoce [207,255–257].

De nombreuses études ont mis au jour une diminution de la viabilité et de la prolifération cellulaire ainsi qu'une hausse de l'apoptose dans des lignées cellulaires de LAM et de LNH traitées avec des inhibiteurs de PRMT5 [123,208,209,217,220,259,262–264]. L'inhibition de PRMT5 dans des lignées cellulaires de LAM et de LLC entraîne un plus grand nombre de dommages à l'ADN dans les cellules, expliquant ainsi l'augmentation de la mort cellulaire leucémique. En effet, l'inhibition de PRMT5 peut sensibiliser les cellules leucémiques aux inhibiteurs de PARP [162,260].

L'inhibition de PRMT5 a également été étudiée dans les MPN, en particulier dans les MPN mutés pour JAK2, avec une diminution de la prolifération à la fois *in vitro* et dans les échantillons de patients. La méthylation du facteur de transcription E2F1 est altérée, ce qui a un impact sur les gènes cibles du cycle cellulaire et de la réparation des lésions de l'ADN. Combinée aux inhibiteurs de JAK1/2, l'inhibition de PRMT5 augmente *in vivo* de manière significative la mort des cellules de MPN [268].

Dans des lignées cellulaires de MM, le traitement par un inhibiteur de PRMT5 abaisse les niveaux de H4R3me2s au niveau du promoteur de CASP1, stimulant ainsi la pyroptose des cellules du myélome [222]. Une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose sont également démontrées dans le MM avec un inhibiteur de PRMT5. De plus, le traitement oral des souris réduit *in vivo* la croissance du MM [221].

L'inhibition de PRMT5 a également été rapportée dans des modèles murins. Une survie globale prolongée des souris traitées associée à une diminution des CSL a été observée dans la LMC, cet effet étant renforcé en cas de combinaison avec un inhibiteur de tyrosine kinases [265]. L'inhibition de PRMT5 dans des modèles murins de LNH et de LAM prolonge la survie des souris et favorise l'apoptose [209,219,262].

À ce jour, un seul inhibiteur de PRMT7 a été testé dans différents modèles de LMC. Le traitement avec la molécule JS1310 augmente significativement la survie des souris et réduit la splénomégalie, la charge tumorale ainsi que le nombre de cellules souches et progénitrices leucémiques dans la BM et la rate. Lorsqu'elles sont xénotransplantées chez la souris, les cellules primaires de LMC traitées par le JS1310 inhibent la formation de cellules myéloïdes [269].

2. Essais cliniques

Les outils chimiques développés afin d'inhiber les PRMT montrent des résultats encourageants dans le ralentissement du développement de nombreuses hémopathies malignes. Parmi eux, les molécules ciblant les PRMT de type I ainsi que les molécules ciblant PRMT5 représentent des thérapies potentielles les plus prometteuses, PRMT5 étant la PRMT la mieux exprimée dans un grand nombre de types cellulaires humains. De surcroît, les fonctions de PRMT5 dans l'hématopoïèse normale ou dans l'initiation et le développement d'hémopathies malignes ont été largement étudiées. Au vu de leurs résultats sur les modèles cellulaires et animaux d'hémopathies malignes, ces inhibiteurs ont fait l'objet de six essais cliniques de phase I et II (**Tableau 3**).

Parmi ces études cliniques, cinq essais sont toujours en cours, une étude est terminée (NCT03666988) et une étude est rapportée avec des résultats préliminaires (NCT02783300) [270]. Même si l'utilisation des inhibiteurs de PRMT chez les patients montre des résultats prometteurs pour le traitement des hémopathies malignes, la plupart des patients ont malheureusement subi au moins un effet indésirable lié au traitement.

Les plus fréquents étaient de grade 1 à 2 (fatigue, anémie, nausées, alopecie) ou de grade 3 à 4 (anémie, thrombocytopenie, neutropenie, fatigue). Il n'y a pas eu d'effet indésirable de grade 5 (décès) dans cette étude. Dans l'ensemble, les investigateurs soulignent que les effets indésirables étaient fréquents mais facile à gérer. L'inhibition pharmacologique des PRMT représente donc une nouvelle approche thérapeutique d'intérêt chez certains patients ayant été affectés par une hémopathie maligne.

Tableau 3. Essais cliniques impliquant des inhibiteurs de PRMT dans des hémopathies malignes.

Numéro d'essai	Titre officiel de l'étude	Nombre de patients	Composé (alias)	PRMT inhibée(s)	Pathologie(s) incluse(s)
NCT03666988	A Phase I, open-label, dose-escalation study to investigate the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical activity of GSK3368715 in patients with solid tumors and DLBCL	31	GSK3368715 (EPZ019997)	PRMT de type I	LDGC-B
NCT03614728	A Phase I/II Study to investigate the safety and clinical activity of GSK3326595 and other agents in patients with MDS and AML	30	GSK3326595 (Pemrametostat)	PRMT5	MDS; LMMC; LAM
NCT02783300	A Phase I, open-label, dose escalation study to investigate the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity of GSK3326595 in patients with solid tumors and NHL	288	GSK3326595 (Pemrametostat)	PRMT5	LNH
NCT03573310	A Phase I, first-in-human, open-label study of the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of JNJ-64619178, an inhibitor of PRMT5 in patients with advanced cancers	114	JNJ-64619178 (Onametostat)	PRMT5	LNH B; MDS bas risque
NCT03886831	A Phase I, open-label, multicenter, dose escalation, dose expansion study of PRT543 in patients with advanced solid tumors and hematologic malignancies	232	PRT543	PRMT5	LDGC-B; myélodysplasie; myélofibrose; LNH; LAM; LMC
NCT04089449	A Phase I, open-label, multicenter, dose escalation and expansion study of PRT811 in subjects with advanced solid tumors, CNS lymphoma, and recurrent high-grade gliomas	86	PRT811	PRMT5	Lymphome du SNC

LDGC-B : lymphome diffus à grandes cellules B ; MDS : *myelodysplastic neoplasm* ; LMMC : leucémie myéomonocytaire chronique ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; LNH : lymphome non Hodgkinien ; LMC : leucémie myéloïde chronique ; SNC : système nerveux central.

IV. PRMT2

A. Structure protéique et isoformes

PRMT2 est l'une des PRMT les moins caractérisées sur le plan fonctionnel à ce jour. La difficulté à étayer son importance dans les processus cellulaires est due à sa faible activité enzymatique de type méthyltransférase sur les queues d'histones par rapport aux autres PRMT (notamment PRMT1 et PRMT5). Cette enzyme a été identifiée sous le nom HRMT1L1 (*Human Arginine MethylTransferase 1*) en 1998 par l'équipe de Michael Henry grâce à son homologie de séquence avec PRMT1 [271].

PRMT2 partage environ 35% d'homologie avec l'ensemble des PRMT de type I dont elle fait partie, mais une étude phylogénétique a mis en exergue sa proximité particulière avec PRMT6 [81]. Elle est retrouvée chez tous les vertébrés, à l'exception des reptiles et des oiseaux, et a également été trouvée chez les cnidaires, les échinodermes et les céphalochordés [272].

La structure du module catalytique de PRMT2 est très similaire à celle de toutes les autres structures de PRMT. Elle consiste en un domaine de liaison à la SAM formant un pli de Rossmann et des tonneaux β , avec un bras de dimérisation retrouvé au sein du pli de Rossmann. PRMT2 contient dans son extrémité N-terminale un domaine SH3 qui lui est unique parmi les membres de la famille des PRMT.

Dans l'espèce humaine, la structure de ce domaine a été déterminée par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) en 2005 (numéro d'accèsion *Protein Data Bank* : 1X2P) et consiste en 50 résidus d'acides aminés formant cinq brins β antiparallèles repliés en une structure en forme d'arceau. Ce domaine est connu pour se lier à des protéines cibles par l'intermédiaire de séquences contenant des résidus d'acides aminés proline et hydrophobes et est généralement impliqué dans les interactions protéine-protéine [273].

Néanmoins, il n'a pas été possible jusqu'à présent d'obtenir la structure cristallographique du domaine SH3 au sein de PRMT2, malgré de nombreux essais par l'équipe de Jean Cavarelli, qui concluent que ce manque d'informations structurales pourrait s'expliquer par une grande flexibilité de la région N-terminale dans les cristaux. Ils pensent que la liaison de PRMT2 à ses substrats permettrait de stabiliser ce domaine dans sa position fonctionnelle [274].

Sept isoformes différentes ont été révélées pour PRMT2, selon la base de données UniProt (P55345 : ANM2_HUMAN), correspondant à des épissages alternatifs du même ARNm. La forme dite canonique de PRMT2 correspondant à la protéine fonctionnelle est codée à partir d'un ARNm comportant 11 exons. Cette protéine comporte 433 acides aminés pour une masse moléculaire de 49 kDa. Les isoformes PRMT2 α , β , γ et PRMT2L2 sont les mieux caractérisées et ont été identifiées grâce à des études portant sur le cancer du sein (**Figure 26**) [275,276]. Dans ces variants, les tonneaux β et le bras de dimérisation sont absents, et une partie du pli de Rossmann est manquant ou modifié, conduisant donc à des protéines catalytiquement inactives.

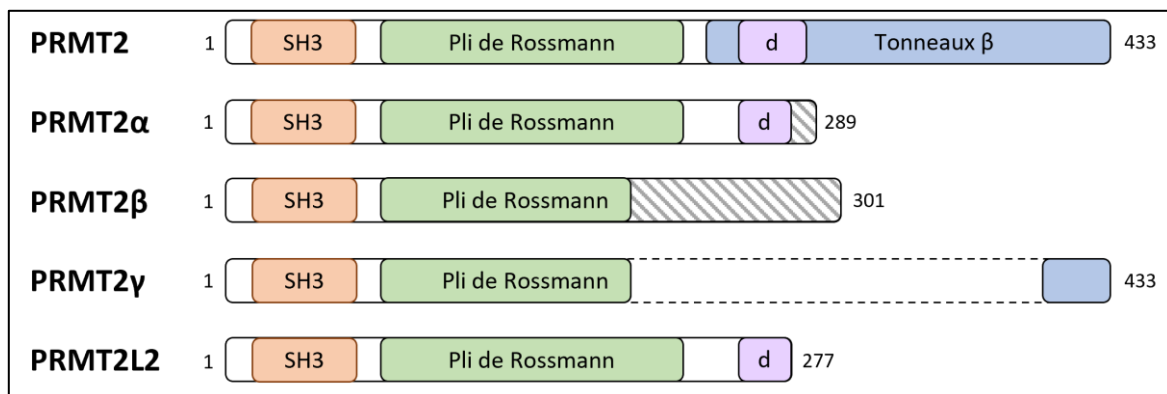


Figure 26. Les isoformes humaines de PRMT2. PRMT2 α est obtenue après délétion des exons 8 à 10, incluant une modification des 12 derniers résidus due à un décalage du cadre de lecture (en gris rayé). PRMT2 β est dépourvu des exons 7 à 9, ce qui conduit à une séquence de 301 acides aminés avec une séquence C-terminale aspécifique résultant d'un décalage du cadre de lecture (en gris rayé). L'isoforme PRMT2 γ est produite par la délétion des exons 7 à 10 (indiquée par des lignes pointillées). d : bras de dimérisation. Schéma adapté de Cura & Cavarelli, 2021 [277].

L'épissage alternatif de l'extrémité C-terminale de PRMT2 détermine sa localisation subcellulaire. En effet, les variants PRMT2 α , β et γ présentent une localisation bien distincte de celle de la protéine fonctionnelle. Ces variants ainsi que PRMT2L2, bien que catalytiquement inactifs, sont capables de se lier à ER α et d'améliorer son activité de transactivation [275,276].

Une surexpression de l'isoforme PRMT2 β induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose de cellules de cancer du sein, en supprimant l'activité de transcription au niveau du promoteur de la cycline D1. Ce variant d'épissage de PRMT2 montre donc un effet antitumoral potentiel [278]. Une autre étude suggère que ce même variant est capable d'inhiber l'autophagie, toujours dans un modèle de cancer du sein [279].

B. Fonctions connues de PRMT2

1. Co-activation et co-répression de protéines

Le premier travail élucidant un rôle de PRMT2 a été rapporté par l'équipe de Yi-Jun Zhu en 2002. Elle a réussi à co-isoler PRMT2 en même temps que le récepteur aux œstrogènes ER α , PRMT2 améliorant l'activité transcriptionnelle du récepteur, comme cela a été montré avec les isoformes inactives de PRMT2. Cette méthyltransférase est capable de renforcer également l'activation d'autres récepteurs nucléaires tels que PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*) ou RAR α (*Retinoic Acid Receptor alpha*) [280]. Une autre étude a révélé que l'interaction de PRMT2 avec ER α -36, un variant alternatif du récepteur aux œstrogènes, inhibe celui-ci. Les voies de signalisation situées en aval, MAPK/ERK et PI3K/Akt, sont donc également inhibées, permettant d'inverser la résistance des cellules de cancer du sein au tamoxifène [281].

De façon surprenante et contrairement aux résultats obtenus pour les autres PRMT, la délétion de PRMT2 dans les modèles cellulaires de cancer du sein favorise la prolifération ainsi que la formation de colonies. En effet, lorsqu'il est présent, PRMT2 inhibe la liaison de ER α au site AP-1 du promoteur de la cycline D1, bloquant ainsi le cycle cellulaire. De la même façon, l'inhibition de PRMT2 augmente la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe de cancer du sein murin [282].

Outre le récepteur aux œstrogènes, une interaction de PRMT2 avec le récepteur aux androgènes (AR: *Androgen Receptor*) a été mise au jour. Une forte abondance de cette méthyltransférase est retrouvée dans certains organes cibles des androgènes, notamment le cœur, la prostate et les muscles squelettiques. Une baisse d'expression de PRMT2 est corrélée avec une réduction de l'expression des gènes cibles du récepteur aux androgènes [283].

L'implication de PRMT2 dans la régulation du cycle cellulaire a été confirmée *via* la détection de son interaction avec la protéine du rétinoblastome. Cette interaction réprime l'activité des membres de la famille de protéines E2F en formant un complexe avec celle-ci. Ainsi, en absence de PRMT2 chez la souris, l'expression des gènes cibles de E2F est altérée, ce qui suggère que PRMT2 contrôle directement l'activité endogène de E2F et la progression du cycle cellulaire [284].

PRMT2 est également impliquée dans les mécanismes d'efflux du cholestérol. En effet, il a été montré qu'une surexpression de PRMT2 inhibe la formation de cellules spumeuses induite par des LDL (*Low Density Lipoproteins*) oxydées dans les macrophages. Il a aussi été mis en évidence que ce mécanisme pouvait être lié à l'augmentation de l'expression de ABCA1 (*ATP Binding Cassette transporter A1*) et à l'efflux de cholestérol dépendant de ce transporteur [285]. À l'opposé, la baisse d'expression de PRMT2 liée à une hyperglycémie dans des macrophages mène à un défaut d'expression d'ABCA1 et donc à un moindre efflux de cholestérol [286].

2. Régulation de la transcription

PRMT2 et CARM1 possèdent un substrat commun, BRD4 (*Bromodomain-containing protein 4*), une protéine lectrice de marques épigénétiques. Sa méthylation par PRMT2/CARM1 favorise sa liaison aux queues d'histones acétylées pour contrôler la transcription de gènes cibles. La méthylation de BRD4 est nécessaire afin de promouvoir son activité oncogénique dans un modèle de cancer du sein et détermine la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de BET (*Bromodomain and Extra-Terminal motifs*) ainsi qu'aux agents endommageant l'ADN [287].

Une seule marque épigénétique a été établie comme substrat de PRMT2. Il s'agit de la diméthylation asymétrique de l'arginine 8 de l'histone 3 (H3R8me2a). Dans un modèle de carcinome des cellules rénales, PRMT2 favorise la prolifération et la motilité des cellules cancéreuses. La marque H3R8me2a active la transcription des gènes cibles dont *WNT5A*, déclenchant la voie de signalisation oncogénique Wnt [288].

Dans les glioblastomes, cette marque catalysée par PRMT2 est également associée à la hausse d'expression des gènes cibles. De même, une déplétion de PRMT2 affecte les programmes transcriptionnels oncogénique, confirmant l'effet pro-tumorigénique de cette enzyme dans le glioblastome [124].

Enfin, une expression aberrante de PRMT2 a été observée dans les tissus de CHC (Carcinome Hépatocellulaire). La perte d'expression de PRMT2 inhibe la croissance et induit l'apoptose dans ces cellules. D'un point de vue moléculaire, PRMT2 est recrutée au niveau du promoteur de *BCL2*, induisant ainsi l'accessibilité de STAT3 à l'ADN, d'où le maintien de l'expression du gène [125].

3. Substrats connus de PRMT2

Comme d'autres membres de la famille des PRMT, PRMT2 est non seulement nucléaire, mais elle est aussi retrouvée dans le cytoplasme afin d'y méthyler d'autres protéines. Exceptée la marque d'histone H3R8 et BRD4, assez peu de substrats de cette méthyltransférase sont connus à ce jour (**Tableau 4**). PRMT2 peut se lier au domaine cytoplasmique du récepteur au LPS, le TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) afin de le méthyler sur les résidus R731 et R812. Celui-ci va interagir avec le facteur de transcription IRF3 (*Interferon Regulatory Factor 3*), qui lui aussi est méthylé par PRMT2 au niveau du résidu R285. La méthylation d'IRF3 va renforcer sa translocation du cytoplasme vers le noyau, favorisant la transcription de ses gènes cibles, dont la production d'IFN β [289].

Des souris *Prmt2*^{-/-} ont été créées par l'équipe d'Elizabeth Nabel en 2006 [284]. Les cellules et tissus de ces souris présentent un taux de méthylation réduit de STAT3 au niveau du résidu R31, ce qui permet sa phosphorylation accrue. Une stimulation par de la leptine, induit une augmentation de l'expression de la POMC (Proopiomélanocortine) hypothalamique. PRMT2 est donc essentielle à la modulation de la signalisation de la leptine chez la souris [290].

Dans les neurones, la protéine Cordon-Bleu (Cobl) a été identifiée comme nouveau substrat de PRMT2 et sa méthylation est indispensable à la dendritogenèse. En effet, lors d'une inhibition de PRMT2 dans les neurones, la formation d'arbres dendritiques résultant de l'activité de Cobl est empêchée. Néanmoins, les résidus arginine méthylés de Cobl ne sont pas connus, bien que situés dans la partie C-terminale de la protéine [291].

Tableau 4. Substrats connus de PRMT2.

Protéine	Résidu(s) arginine méthylée(s)	Référence(s)
Histone 3	R8	[124–127,288]
BRD4	R179, R181, R183	[287]
TLR4	R731, R812	[289]
IRF3	R285	[289]
STAT3	R31	[290]
Cobl	ND	[291]

ND : non déterminé

V. Objectifs de la thèse

Ce projet de thèse avait pour objectif principal de caractériser pour la première fois les rôles de PRMT2 dans l'hématopoïèse normale ainsi que dans le développement des leucémies aiguës myéloblastiques. Mon objectif était également de caractériser l'effet de PRMT2 dans la réponse inflammatoire dans le contexte des LAM. J'avais également pour but de décrypter le(s) mécanisme(s) d'action par le(s)quel(s) PRMT2 contrôle les processus inflammatoires ainsi que les voies de signalisation précises qui sont affectées en son absence. Du fait de son implication dans les voies produisant les cytokines inflammatoires, j'ai émis l'hypothèse que PRMT2 pourrait contrôler le microenvironnement tumoral, notamment dans les tumeurs hautement infiltrées en cellules immunitaires. Enfin, cette étude pourrait permettre la mise en évidence de nouveaux partenaires, voire de nouveaux substrats de cette méthyltransférase.

La section « Résultats » qui suit est divisée en trois parties. Tout d'abord, les modèles expérimentaux développés dans ce projet sont présentés. De plus, la problématique liée au manque de spécificité des anticorps dirigés contre PRMT2 est abordée. Ensuite, le manuscrit soumis de l'article lié à ce projet est présenté. Enfin, des résultats supplémentaires non publiés, ainsi que des résultats issus de différentes collaborations sont détaillés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Plasmides utilisés, transfection et production de rétrovirus

Le vecteur Myc-MOZ a été fourni par Edward Chan (*Indiana University Cancer Center, Indianapolis, IN, USA*). Le plasmide pMA-citrine-PRMT2 a été conçu et acheté auprès de Thermofisher Scientific et a été sous-cloné dans un vecteur pMSCV-pgk-puro. Pour l'expérience de co-expression de Myc-MOZ et de citrine-PRMT2, des cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) à 80% de confluence ont été transfectées avec le vecteur Myc-MOZ (3,5 µg) et le plasmide pMA-citrine-PRMT2 (3,5 µg), en utilisant 20 µL d'un réactif non liposomal, selon le protocole du fabricant (*JetPRIME, Polypus transfection*). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 24h à 37°C. Pour la production de rétrovirus citrine-PRMT2, les cellules HEK293 ont été transfectées comme décrit précédemment avec 1 µg de Gag-pol, 1 µg de VSV-G, et 8 µg de plasmides pMSCV-citrine-PRMT2-pgk-puro. Le milieu a été retiré après 4h, lavé avec du PBS 1X (Dutscher) et remplacé. Après 24h, le premier milieu contenant le virus a été jeté et remplacé par du milieu neuf. Les surnageants suivants ont été récoltés pendant 4 jours consécutifs et conservés à -80°C.

Infection de cellules par des rétrovirus

La veille de l'infection, les puits ont été recouverts avec 10 µg de RetroNectin (Takara bio) par cm² et incubés pendant une nuit à 4°C. La RetroNectin a été retirée, lavée deux fois avec du PBS 1X et les virus ont été ajoutés. La plaque a ensuite été centrifugée à vitesse maximale (environ 3 000 g) pendant 1 heure à température ambiante avec le couvercle. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé, rincé avec du PBS 1X et les cellules HL-60 ont été ajoutées à une concentration de 1 million/mL. Elles ont été incubées pendant 48h à 37°C, centrifugées et lavées deux fois avec du PBS 1X afin d'éliminer les virus restants. L'efficacité de l'infection a été évaluée en détectant la protéine citrine-PRMT2 par cytométrie en flux.

Nucéofection de cellules avec un système CRISPR-Cas9

Deux « ARN CRISPR » (ou crARN) ciblant PRMT2 ont été conçus et achetés auprès d'Integrated DNA Technologies : les ARN nommés AA (5'-CCUGACGGAAUAAAGU-3') et AB (5'-CGUGGAUGAGUACGA-3'). Des complexes ribonucléoprotéiques ont été formés conformément au protocole du fabricant (*Alt-R CRISPR-Cas9 System, Integrated DNA Technologies*).

Ils ont ensuite été électroporés dans des cellules HL-60 ou KG-1a à l'aide du système *Amaya Nucleofector* (Amaya Cell Line Nucleofector Kit, Lonza) en suivant le protocole du fabricant. Après 48h, les cellules ont été lavées et remises en suspension dans du *Pre-Sort Buffer* (BD Biosciences) et un tri unicellulaire a été effectué dans une plaque de 96 puits contenant un milieu de culture complété par 50% de milieu conditionné HL-60 ou KG-1a à l'aide d'un BD FACSMelody (BD Biosciences). L'état de mutation de *PRMT2* a ensuite été évalué pour chaque sous-clone par séquençage d'ADN (Sanger), RT-qPCR et Western Blot.

Immunoprécipitation

Pour l'immunoprécipitation, le protocole fourni par le fabricant a été suivi (*GFP-Trap Magnetic Particles M-270* et *Myc-Trap Magnetic Agarose*, Chromotek) en l'adaptant à nos besoins. Brièvement, 5 millions de cellules ont été lysées sur glace pendant 30 minutes dans 200 μ L de tampon de lyse froid (10mM Tris/HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,5mM EDTA, 0,5% NP40) complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*cOmplete*, Sigma-Aldrich) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (*PhosSTOP*, Sigma-Aldrich) avec une homogénéisation fréquente. Les lysats ont été centrifugés à 17 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Une partie des surnageants recueillis a été utilisée comme *input* (lysats total). Les surnageants restants ont été incubés avec 25 μ L de billes et mélangés sur une roue pendant 1h à 4°C. Les billes ont été séparées à l'aide d'un aimant jusqu'à ce que le surnageant soit bien transparent. Les surnageants ont été jetés et 50 μ L ont été conservés comme *unbound* (fraction non liée). Les protéines liées aux billes ont été lavées quatre fois avec 500 μ L de tampon de lavage (10mM Tris/HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,05% NP40, 0,5mM EDTA). Les billes ont été éluées avec 80 μ L de Laemmli 2X et bouillies à 95 °C pendant 5 minutes, puis les billes ont été séparées des protéines à l'aide d'un aimant.

Western Blot

Les lysats cellulaires totaux ont été obtenus en remettant les cellules en suspension dans un tampon de lyse cellulaire 1X (solution mère 10X : 9803, Cell Signaling) complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéases et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases comme décrit précédemment. Elles ont ensuite été incubées 30 min sur glace avec une homogénéisation fréquente puis centrifugées à 17 000 g pendant 15 min.

Le kit d'extraction nucléaire et cytoplasmique *NE-PER*[™] (78833, Thermo Scientific) a été utilisé pour le fractionnement cellulaire en suivant le protocole du fabricant. Pour préparer les échantillons pour une analyse par Western Blot, 50 µg du surnageant protéique ont été prélevés et mélangés à du tampon Laemmli 1X (solution mère 4X : Tris-HCl pH 6,8 200 mM, DTT 400 mM, SDS 277 mM, bleu de bromophénol, glycérol 30%). Les échantillons ont ensuite été chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Ensuite, les échantillons ont été séparés par SDS-PAGE (gel de concentration à 4%, gel de séparation à 10%) et transférés sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Les membranes ont été bloquées pendant 1 heure dans de la BSA (solution à 5% dans du TBS-T (0,1%)) et marquées séquentiellement avec un anticorps primaire puis secondaire. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : Anti-souris Myc-tag (60003-2-Ig, Proteintech), PRMT4 (12495), GAPDH (97166) et anti-lapin GFP (2555), PRMT1 (ab190892, Abcam), PRMT2 (LS-C482512, LS-Bio), PRMT3 (ab191562, Abcam), PRMT5 (79998), p-STAT3 (9145), STAT3 (12640), p-IκBα (2859), IκBα (4812), p-SAPK/JNK (9251), SAPK/JNK (9252), p-ERK1/2 (9101), ERK1/2 (9102), p-p38 (4511), p38 (9212), SP1 (9389), p65 (8242), TAK1 (5206) et p-TAK1 (ThermoFisher, MA5-15073). Un anticorps anti-bêta-actine directement couplé à la peroxydase de raifort (A3854, Sigma) a également été utilisé. Tous les anticorps ont été achetés auprès de Cell Signaling, sauf indication contraire, et ont été dilués dans le même tampon que lors du blocage de la membrane et utilisés à 4 °C sur la nuit. Les membranes sont ensuite lavées trois fois dans du TBS-T 1X (0,1%) pendant 10 minutes. L'anticorps secondaire anti-lapin (7074) ou anti-souris (7076) conjugué à la peroxydase de raifort a été ajouté et les membranes ont été incubées à température ambiante pendant 1h. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois comme précédemment. Pour obtenir le signal de chimioluminescence, les membranes ont été incubées 5 minutes avec le substrat *Clarity* ou *Clarity Max Western ECL* (Bio-Rad) et lues sur un système d'imagerie *ChemiDoc MP* (Bio-Rad).

Spectrométrie de masse

Pour chaque condition, cinq répliques de trois millions de cellules sont récoltés et la protéine citrine (condition contrôle, avec ou sans traitement par du LPS 100 ng/mL pendant 2h) ou citrine-PRMT2 (avec ou sans traitement par du LPS 100 ng/mL pendant 2h) est immunoprécipitée comme décrit précédemment.

Les billes *GFP-Trap* contenant les protéines immunoprécipitées sont lavées 5 fois comme conseillé par le protocole du fournisseur, puis stockées à -80°C. Les billes « sèches » sont envoyées en carboglace pour analyse à la plateforme Protéomique Strasbourg Grand Est (ProFI Strasbourg) dirigée par le Dr Sarah Cianferani (Institut pluridisciplinaire Hubert Curien, CNRS/Université de Strasbourg). Les billes et leur contenu ont été digérés à la trypsine/Lys C puis analysés par nanoLC-MS/MS sur un système *nanoAcquity* (Waters) couplée au *Q Exactive H-FX* (ThermoFisher). Les données brutes ont ensuite été traitées avec Mascot et la suite logicielle Proline pour l'identification des protéines, l'extraction du signal et la quantification. Une normalisation peptidique a été réalisée dans Proline sur les données quantifiées. Seules les protéines ayant été identifiées dans 4 répliques d'une condition ont été conservées pour l'étude quantitative. Les données ont été transformées avec la fonction \log_2 puis normalisées par condition avec la méthode *quantile centering*. Une imputation des valeurs manquantes a ensuite été réalisée avec l'algorithme *Det quantile*. Finalement le test statistique *t-test* a permis de calculer les p-values, et la méthode Benjamini-Hochberg a été utilisée pour ajuster les p-values entre les différentes comparaisons.

Données de patients atteints de LAM

Une partie de cette étude est associée au projet *Leucegene*, une initiative approuvée par les comités d'éthique de la recherche de l'Université de Montréal et de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont (Montréal, Québec, Canada). Tous les échantillons de LAM ont été prélevés avec un consentement éclairé entre 2001 et 2015, conformément aux procédures de la Banque de cellules leucémiques du Québec. Les échantillons de moelles osseuses normales ont été obtenus auprès de la Banque de cellules leucémiques du Québec et de Lonza. Un sous-ensemble de la cohorte de LAM a été précédemment déposé dans la base de données *Gene Expression Omnibus* (GSE49642 et GSE52656).

Souris

Les expériences utilisant des souris ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Université de Bourgogne (numéro APAFiS 16253). Les souris ont été hébergées dans un environnement à température contrôlée, selon un cycle lumière/obscurité de 12 heures, avec un accès libre à l'eau et à un régime alimentaire pour rongeurs standard irradié.

Toutes les souris utilisées ont été maintenues dans des conditions spécifiques d'absence de pathogènes conformément aux protocoles d'études animales examinés et approuvés selon les directives institutionnelles de l'Université de Bourgogne pour le soin des animaux et selon les protocoles approuvés par le Comité institutionnel de soin et d'utilisation des animaux de l'Université de Bourgogne. Les souris *Prmt2*^{-/-} ont été générées par Elizabeth Nabel (*Cardiovascular Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA*) et fournies par Yann Hérault. Celles-ci ont subi dix générations de rétrocroisement avec des souris C57BL/6JRj (Janvier Lab) pour assurer un fond génétique pur. Pour le génotypage, l'ADN génomique a été préparé à partir de biopsies de queue en utilisant le kit *PCR REDExtract-N-Amp™ Tissue* (Sigma-Aldrich). Les allèles *Prmt2* modifiés (280 pb) et sauvage (190 pb) ont été identifiés par PCR à l'aide de trois amorces spécifiques : A (5'-CTGAGGTATTACCAGCAGACA-3'), B (5'-CTCTGATGCAGGTCTAC-3') et C (5'-CCGGTATGTGGAATGTGT-3').

Injection in vivo de LPS

Afin d'étudier la réponse inflammatoire, du LPS (souche *Salmonella enterica* sérotype *Typhimurium*) dilué dans du NaCl à 0,9% est injecté en injection intra-péritonéale aux souris, à une dose de 1 mg/kg ou 2mg/kg. Du sang est ensuite prélevé avant et régulièrement après l'injection dans la veine caudale. Le contrôle négatif correspond au prélèvement sanguin juste avant l'injection. Le sang récolté est immédiatement centrifugé pendant 15 min à 1 300 g à température ambiante et le surnageant, c'est-à-dire le plasma, est récupéré. Les échantillons sont ensuite dilués pour l'analyse des cytokines contenues dans le plasma. Les IL6, -10 et -12, l'IFN γ , MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) ainsi que le TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) sont ensuite dosés pour chaque échantillon grâce au *CBA Mouse Inflammation Kit* (BD Biosciences, 552364) en suivant le protocole du fournisseur. Les volumes de billes et de réactifs utilisés sont divisés par deux. Les résultats sont ensuite analysés grâce au logiciel *FCAP Array software* (BD Biosciences).

Préparation de suspensions de BM de souris

Les cellules de BM ont été isolées en écrasant les fémurs et les tibias des souris à l'aide de PBS 1X complété par 2% de FBS et filtrées à travers un filtre de 70 µm. Le sang des souris témoins et des souris *Prmt2^{-/-}* a été prélevé dans la veine latérale de la queue et collecté dans des tubes recouverts d'EDTA (*BD Microtainer*, BD Biosciences). Des numérations sanguines complètes ont été réalisées à l'aide d'un analyseur hématologique automatisé (*Scil Vet abc Plus+*, Scil animal care company).

Différenciation de monocytes dérivés de BM de souris et traitements

Les macrophages primaires murins dérivés de BM (BMDM pour *Bone Marrow-Derived Macrophages*) ont été obtenus à partir de souris mâles/femelles âgées de 6 à 8 semaines et les monocytes ont été isolés par magnétisme à partir de la moelle totale filtrée à 45 µm (*Monocyte Isolation Kit (BM), mouse*, Miltenyi). Ils ont été cultivés avec 100 ng/mL de CSF-1 murin (130-101-706, Miltenyi) pendant cinq jours. Un phénotype inflammatoire a été induit après cinq jours de différenciation en ajoutant 100 ng/mL de LPS après une dissociation par sonication (*E. coli O127:B8*, Sigma-Aldrich) au milieu de culture. Des images des macrophages ont été prises toutes les 12 heures pendant la différenciation à l'aide d'un imageur en direct (*Incucyte® S3 Live-Cell Analysis System*, Sartorius).

Reconstitution hématopoïétique en compétition

Les souris WT, *Prmt2^{-/-}*, et Ly5.1⁺ (CD45.1⁺) ont été euthanasiées et les BM ont été récoltées comme décrit précédemment. Cinq préparations de cellules de BM ont été réalisées à une concentration de 4×10⁶/mL : uniquement des cellules Ly5.1⁺ ; uniquement des cellules *Prmt2^{-/-}* ; uniquement des cellules *Prmt2^{+/+}* ; moitié Ly5.1⁺, moitié *Prmt2^{-/-}* ; moitié Ly5.1⁺, moitié *Prmt2^{+/+}*. Pour chaque préparation, cinq souris Ly5.1⁺ irradiées de façon sublétales (9 Gy) ont été transplantées avec 0,8 million de cellules. Toutes les deux semaines après la transplantation, quelques gouttes de sang ont été prélevées dans la veine de la queue et collectées dans un tube recouvert d'EDTA. Les globules rouges ont été lysés (tampon de lyse RBC 10X : 155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃, 0,1 mM EDTA) pendant 10 minutes à 4°C et les cellules ont été centrifugées à 300 g pendant 5 minutes.

Transplantation de cellules MAF9^{het} dans des souris Prmt2^{-/-}

La moelle osseuse de souris MAF9^{het} est récupérée comme décrit précédemment. Deux millions de cellules sont reprises dans du sérum physiologique (NaCl à 0,9%) et sont transplantées dans chaque souris préalablement irradiée (BIOMEF, Bretenières) à une dose de 9 Gy. La reprise de greffe est ensuite mesurée mensuellement par prélèvement sanguin caudal. Les hématies sont lysées (solution 10X composée de NH₄Cl à 1 550 mM/L, KHCO₃ à 100 mM/L, EDTA à 1 mM/L), puis les cellules restantes sont récupérées par centrifugation (215 g, 8 min, 20°C). Les cellules sont lavées avec du PBS 1X complété avec 2% de SVF puis à nouveau récupérées. Le mélange des anticorps CD45.1-eFluor450 et CD45.2-APC est ajouté au surnageant et est incubé durant 20 min à 4°C puis du PBS complété à 2% avec du SVF est additionné. Une dernière centrifugation (215 g, 5 min, 4°C) permet d'éliminer les anticorps en excès. Les souris sont euthanasiées lorsqu'elles atteignent le point limite de souffrance animale tolérée.

Mesures de la croissance tumorale dans des souris Prmt2^{-/-}

Des souris WT ou Prmt2^{-/-} ont été transplantées de façon sous-cutanée sur le côté de l'abdomen avec deux millions de cellules LLC1 ou MC-38 diluées dans 200 µl de PBS. Deux semaines après la transplantation, la largeur (petit axe) et la longueur (grand axe) des tumeurs ont été mesurées tous les deux jours. Le volume tumoral a été déterminé par la formule suivante : grand axe × petit axe × petit axe / 2. Les souris ont été euthanasiées lorsqu'elles atteignaient le point limite, fixé à un volume tumoral de 2 000 mm³.

Lignées cellulaires utilisées et traitements

La lignée cellulaire humaine HL-60 obtenue à partir de l'American Type Culture Collection (ATCC) et ses sous-clones ainsi que les BMDM murins ont été cultivées dans du RPMI 1640 avec de la L-Glutamine (Dutscher) complété par 10% de FBS (Dutscher) et 1% d'antibiotiques (10 000 U/mL de pénicilline, 10 mg/mL de streptomycine, 25µg/mL d'amphotéricine B, PAN-Biotech).

La lignée cellulaire humaine KG-1a obtenue à partir de l'American Type Culture Collection (ATCC) et ses sous-clones a été cultivée dans du RPMI 1640 avec de la L-Glutamine complété par 20% de FBS et 1% d'antibiotiques. La lignée cellulaire humaine HEK293 obtenue auprès de l'ATCC et les sous-clones ont été cultivés dans du DMEM (Dutscher) supplémenté avec 10% de FBS et 1% d'antibiotiques. Toutes les cellules ont été incubées dans une atmosphère humifiée avec 5% de CO₂ à 37°C. Pour les expériences portant sur le phénotype inflammatoire, les cellules HL-60 ont été traitées avec 100 ng/mL de LPS après une dissociation par sonication (*E. coli* O127:B8, Sigma-Aldrich) ou 40 ng/mL d'IL6 humaine (SRP3096, Merck). Pour les tests de prolifération, les cellules ont été diluées au 1/5^{ème} avec du bleu Trypan (Gibco) et comptées sur une chambre de Malassez.

Cytométrie en flux

Les cellules sont centrifugées à 300 g pendant 5 minutes et lavées deux fois avec du PBS 1X. Les anticorps sont ensuite ajoutés et dilués dans du PBS 1X additionné de 2% de FBS et incubés pendant 20 minutes à 4°C. Après incubation, les anticorps en excès sont dilués dans du PBS 1X additionné de 2% de FBS, les échantillons sont centrifugés à 300 g pendant 5 minutes et lavés deux fois. L'acquisition des échantillons a été réalisée à l'aide d'un cytomètre de flux *LSR Fortessa* ou *LSR II* (BD Biosciences) et les données ont été analysées avec *FlowJo* (v10.5.3).

Les anticorps anti-humain CD126-PE (BD Biosciences, 561696) et TLR4-PE (BD Biosciences, 564215), et les anticorps anti-souris Lineage-APC (BD Biosciences, 558074), c-Kit-BV510 (BioLegend, 135119), Sca-1-PE-Cy7 (eBioscience, 25-5981-82), CD11b-PE-Cy7 (BD Biosciences, 552850), Gr-1-FITC (BD Biosciences, 553127), Ter119-V500 (BD Biosciences, 562120), B220-AF700 (BioLegend, 103232), CD71-APC (BioLegend, 113820), CD80-APC-Vio770 (Miltenyi, 130-116-463), CD14-PE-Cy7 (BioLegend, 123316), CD16-FITC (BD Biosciences, 553144), CD64-PE (Miltenyi, 130-103-808), CD206-APC (BioLegend, 141708), F4/80-BV421 (BD Biosciences, 565411), Ly5. 1-eFluor450 (Invitrogen, 48-0453-82) et Ly5.2-APC (BioLegend, 109814) ont été utilisés.

L'analyse du phénotype des cellules HL-60 a été réalisée par la plateforme de cytométrie en flux du service de biologie hématologique (CHU Dijon Bourgogne François-Mitterrand). Les échantillons cellulaires ont été traités selon un protocole « *lysis-no wash* ». L'acquisition des échantillons a été réalisée à l'aide d'un cytomètre en flux *Navios*® (Beckman-Coulter). Deux panels différents ont été analysés : AML10A : CD15-FITC, CD14-PE, CD13-PECF594, CD33-PC5.5, CD34-PC7, CD117-APC, CD7-AA700, CD11b-AA750, CD16 BV421, CD45-KO et AML10B : CD64-FITC, CD10-PE, CD4-PECF594, CD33-PC5.5, CD34-PC7, CD123-APC, CD56-AA700, CD19-AA750, CD38-BV421, CD45-KO.

Purification d'ARN et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit *RNeasy Mini* (Qiagen) avec une étape préalable d'homogénéisation des échantillons (*QIAshredder*, Qiagen). L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de 1 µg d'ARN à l'aide du kit de synthèse d'ADNc *sensiFAST* (Bioline) en suivant les instructions du fabricant. L'ADNc a été amplifié avec le *GoTaq Probe qPCR Master Mix* (Promega) à l'aide du système *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Des sondes Taqman de souris ciblant l'Il6 (Mm00446190_m1), le Tnf (Mm00443250_m1) et Prmt2 (Mm00459995_m1), et des sondes Taqman humaines ciblant l'IL6 (Hs00174131_m1), ING4 (Hs01088021_m1) et PRMT2 (Hs00895391_m1) ont été utilisées. La β-Actine de la souris (Mm02619580_g1) et la PPIA (Hs04194521_s1) ainsi que l'HPRT1 humaines (Hs02800695_m1) ont été utilisés comme contrôles de normalisation. Toutes les sondes ont été achetées auprès de ThermoFisher Scientific.

ELISA

Tous les kits ELISA ont été achetés auprès de BD Biosciences et réalisés selon le protocole du fabricant. Pour les échantillons humains, le kit *ELISA II* pour l'IL6 humaine (550799) a été utilisé et pour les échantillons murins, les kits *BD OptEIA™ Mouse IL6 ELISA* (550950) et *BD OptEIA™ Mouse TNF ELISA* (560478) ont été utilisés.

Séquençage d'ARN (RNA-seq)

Pour le RNA-seq à haut débit, 1 million de cellules ont été récoltées à partir de HL-60 sauvage, *PRMT2*^{KO} ou de ces mêmes lignées traitées avec 100 ng/mL de LPS pendant 24h. L'ARN a été extrait (réactif *TRIzol*TM, Invitrogen) et élué dans 15 µl d'eau sans RNase. L'analyse séquentielle de l'ARN a été réalisée par GENEWIZ (Azenta Life Sciences). Les lectures par paires ont été alignées sur la référence du génome humain GRCh38 (numéro d'accèsion GCA_000001405.28) avec l'aligneur STAR (v2.7.6a) en utilisant le mode *2-pass*. Le comptage des lectures a également été effectué avec STAR. Le *package* DESeq2 (v1.39.8) de R (v4.1.1) a été utilisé pour normaliser les nombres de lectures et effectuer l'analyse d'expression génique différentielle basée sur la distribution binomiale négative.

Analyses statistiques

La survie globale a été déterminée à partir du moment du diagnostic jusqu'au décès ou au dernier suivi. Les courbes de survie ont été calculées à l'aide de la méthode Kaplan-Meier et comparées à l'aide du test *Log-rank*. La normalité des données a été évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Pour les données normalement distribuées, un test t non apparié a été réalisé, sinon le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé. Afin de comparer plus de deux groupes entre eux, une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism (v9.5.1).

RÉSULTATS

I. Mise au point des modèles expérimentaux

A. Modèles de souris *Prmt2*^{-/-} et *Prmt2*^{-/-}*MAF9*^{het}

Les souris *Prmt2*^{-/-} ont été créées en 2006 par l'équipe d'Elizabeth Nabel aux États-Unis d'Amérique [284]. Le vecteur ciblant PRMT2 a été électroporé dans des cellules souches embryonnaires (ES) au stade D3. Les clones doublement résistants (génélicine/Gancyclovir) ont été testés pour la recombinaison homologue par analyse de Southern blot. Deux clones de cellules ES ont été utilisés pour produire des chimères avec plus de 90% des individus de couleur agouti. Les chimères mâles des deux clones ont produit des animaux agoutis F1, dont 50% étaient hétérozygotes. Ces hétérozygotes F1 mâles et femelles ont été ensuite croisés entre eux pour produire une descendance F2 [284]. Nous avons eu accès à ces souris grâce à une collaboration avec Yann Héroult, de l'Institut Clinique de la Souris et de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (ICS/IGBMC, Illkirch-Graffenstaden). Le fond génétique de ces souris étant mixte, nous avons réalisé 10 générations de rétrocroisement avec des souris C57BL6J/Rj afin de purifier celui-ci avant de réaliser nos expérimentations. Afin d'étudier le rôle de PRMT2 dans le développement leucémique, nous avons créé un modèle murin en croisant les souris *Prmt2*^{-/-} avec des souris portant le *knock-in* MLL-AF9 sur un seul allèle (souris *Kmt2a*^{tm2(MLLT3)^{Thr}/Ksy), appelées ici *MAF9*^{het}, obtenues auprès de Jackson Laboratory. Les souris *MAF9*^{het} sont capables de développer une LAM constitutivement dans les premiers mois de leur vie et elles atteignent généralement le point limite vers 6 mois. Après croisement F1 (*Prmt2*^{-/-} x *MAF9*^{het}), nous obtenons entre autres des petits portant le génotype *Prmt2*^{+/-}*MAF9*^{het}. Nous croisons ensuite les mâles de ce génotype avec des femelles *Prmt2*^{+/-}. C'est ainsi que sont obtenues les souris *Prmt2*^{+/+}*MAF9*^{het} ainsi que *Prmt2*^{-/-}*MAF9*^{het}. Les femelles *MAF9*^{het} sont considérées comme de « mauvaises mères » puisqu'il est rare d'obtenir des portées et lorsque c'est le cas, les petits se font tuer à la naissance.}

Une partie des exons 4 et 6 du gène *Prmt2* ainsi que la totalité de l'exon 5 ont été délétées et ont été remplacées par un gène de résistance à la néomycine grâce à une recombinaison homologue. Un codon stop a également été ajouté au niveau du résidu G119 (**Figure 27A**). Nous avons réalisé le génotypage des souris lors du sevrage afin de déterminer les allèles de chaque individu : sauvage (+/+), hétérozygote (+/-) ou *knock-out* (-/-) (**Figure 27B**).

De plus, l'absence d'expression de *Prmt2* a été vérifiée par une RT-qPCR ciblant la jonction entre les exons 5 et 6 de l'ARN messager dans des échantillons de moelle osseuse totale (**Figure 27C**). Les cellules de moelle osseuse totale de souris *Prmt2*^{+/+}*MAF9*^{het} et *Prmt2*^{-/-}*MAF9*^{het} ont été prélevées puis transplantées dans des souris receveuses. Les souris dont sont issues les cellules présentent le génotype CD45.2⁺ tandis que les souris receveuses présentent le marqueur CD45.1⁺. Les cellules provenant de la souris *Prmt2*^{-/-}*MAF9*^{het} ont une meilleure prise de greffe et le développement de la maladie semble plus agressif 8 semaines après transplantation (**Figure 27D**). Malheureusement, ces résultats encourageants n'ont pas pu être répétés et la lignée *Prmt2*^{-/-}*MAF9*^{het} a été stoppée car il était très difficile d'obtenir des souris ayant les génotypes désirés, le même âge et le même sexe afin de les utiliser dans des expérimentations comme celle-ci.

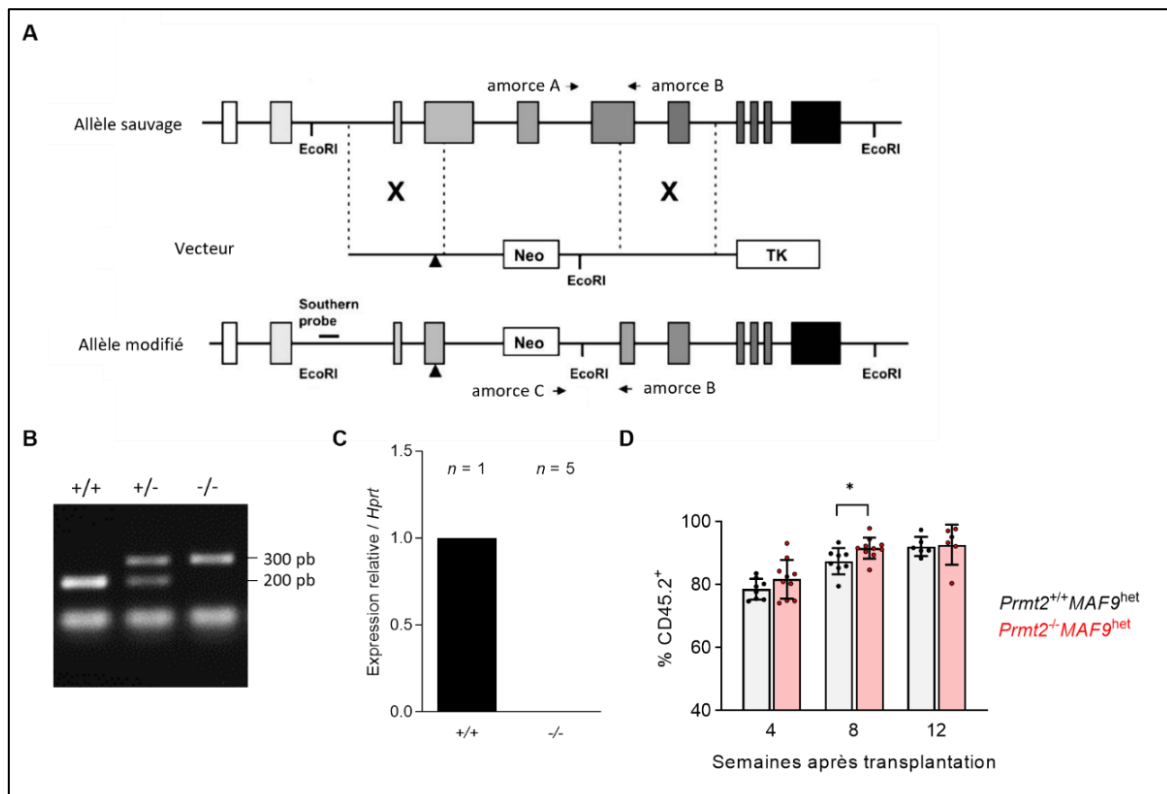


Figure 27. Validation du modèle de souris *Prmt2*^{-/-} et transplantation de cellules *Prmt2*/*MAF9*^{het}. **A.** Modification ciblée du locus *Prmt2*. Le vecteur de RH remplace une partie des exons 4 et 6 et la totalité de l'exon 5 par un gène de résistance à la néomycine. Une mutation générant un codon stop (G119) a également été introduite et est représentée par un triangle noir. Les amorces PCR pour le génotypage sont indiquées : amorce commune aux deux allèles (amorce B), amorce spécifique de l'allèle sauvage (amorce A), et amorce spécifique de l'allèle mutant (amorce C). Schéma adapté de Yoshimoto *et al.*, 2006 [284]. **B.** Génotypage de *Prmt2* par PCR, détection des allèles sauvage (+) et mutant (-) qui présentent des bandes respectives à 190 et 280 paires de bases (pb). **C.** Détection de l'ARN messager correspondant à *Prmt2* dans des échantillons de moelle osseuse de souris sauvages (+/+) et délétées de PRMT2 (-/-) par RT-qPCR. **D.** Suivi par cytométrie en flux de la transplantation de cellules *Prmt2*^{+/+}*MAF9*^{het} et *Prmt2*^{-/-}*MAF9*^{het} (CD45.2⁺) dans des souris receveuses CD45.1⁺.

B. Lignées cellulaires créées

Afin de pouvoir étudier le rôle de PRMT2 dans les LAM *in vitro*, des lignées cellulaires de leucémie aiguë myéloblastique humaine HL-60 (promyéloblastes isolés du sang périphérique par leucophérèse d'une femme caucasienne de 36 ans atteinte d'une LAP) et KG-1a (promyéloblastes isolés à partir de la moelle osseuse d'un homme caucasien de 59 ans atteint de LAM) déplétées de PRMT2 ont été produites grâce à la technologie d'édition génomique CRISPR-Cas9. Ces modèles ont été validés par séquençage d'ADN génomique, puis le niveau d'expression génique de *PRMT2* a été mesuré par RT-qPCR et celui protéique a été détecté par Western Blot. Le modèle HL-60 a été choisi pour sa capacité à répondre à une stimulation par des agents inflammatoires dont le LPS. Le modèle KG-1a, quant à lui, présente l'avantage d'être un modèle de LAM plus immature que le modèle HL-60.

Un plasmide rétroviral d'expression de la protéine de fusion citrine-PRMT2 a permis d'induire la surexpression de PRMT2 dans la lignée humaine de cellules de rein embryonnaire HEK293 ainsi que dans les cellules HL-60. La citrine est une protéine de 27 kDa, qui est dérivée de l'EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), elle-même issue de la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Ces lignées ont été utilisées afin d'immunoprécipiter PRMT2 grâce à l'étiquette (*tag*) citrine qui y est fusionnée. Ensuite, les protéines ont été analysées par spectrométrie de masse dans le but d'identifier de nouveaux partenaires de PRMT2.

C. Anticorps anti-PRMT2

Une problématique importante de ce projet de recherche est la faible qualité des anticorps ciblant notre protéine d'intérêt. En effet, une large gamme d'anti-PRMT2 a été testée au sein de notre laboratoire tout au long de ce projet et la solution afin d'étudier PRMT2 au niveau protéique a nécessité une longue mise au point (**Tableau 5**). La masse moléculaire théorique de PRMT2 est 49 kDa. La plupart des anticorps testés révèlent une bande aux alentours de 55 kDa. Afin de vérifier leur spécificité, ils ont tout d'abord été utilisés sur des échantillons de moelle osseuse de souris WT et *Prmt2*^{-/-}. Il est difficile de déterminer le *knockout* complet chez la souris par Western Blot car les mêmes bandes aspécifiques sont identifiées dans les deux types de souris (**Figure 28A**).

Tableau 5. Références et détails des anticorps ciblant PRMT2 testés dans le projet.

Fournisseur	Référence	Spécificité	Clone	Épitope reconnu	Hôte
Santa Cruz	sc-393254	Souris, Rat, Humain	Monoclonal	mPRMT2 aa 350-376	Souris
ABclonal	A5835	Souris, Humain	Polyclonal	hPRMT2 aa 1-300	Lapin
LS Bio	LS-C482512	Humain	Polyclonal	hPRMT2 entier	Lapin
LS Bio	LS-C155214	Humain	Polyclonal	Région centrale de hPRMT2	Lapin
Cohesion Biosciences	CQA1281	Humain	Polyclonal	hPRMT2 entier	Lapin
Atlas Antibodies	HPA018976	Souris, Rat, Humain	Polyclonal	hPRMT2 aa 326-411	Lapin
Active Motif	61492	Humain	Polyclonal	Région N-terminale de hPRMT2	Lapin

Les anticorps ont également été testés sur des cellules de LAM HL-60 WT et *PRMT2*^{KO}, dont l’extinction de l’expression du gène a été confirmée par séquençage d’ADN génomique et RT-qPCR. La plupart des anticorps présentent une bande aspécifique dans tous les échantillons à une masse moléculaire pouvant correspondre à la protéine (**Figure 28B**). Une publication parue en 2018 utilise un anticorps dirigé contre PRMT2 provenant de *LifeSpan Biosciences* [124], mais sans en préciser la référence. Nous avons testé deux références de ce fournisseur et avons trouvé un anticorps dont la spécificité envers PRMT2 est cohérente. Cet anticorps a été testé et validé sur deux lignées leucémiques dans lesquelles un CRISPR-Cas9 ciblant PRMT2 a été établi, HL-60 et KG-1a (**Figure 28C**). Néanmoins, il est noté la présence d’une bande aspécifique aux alentours de 70 kDa dans les deux lignées. De plus, cet anticorps présente l’inconvénient de ne pas reconnaître l’antigène murin.

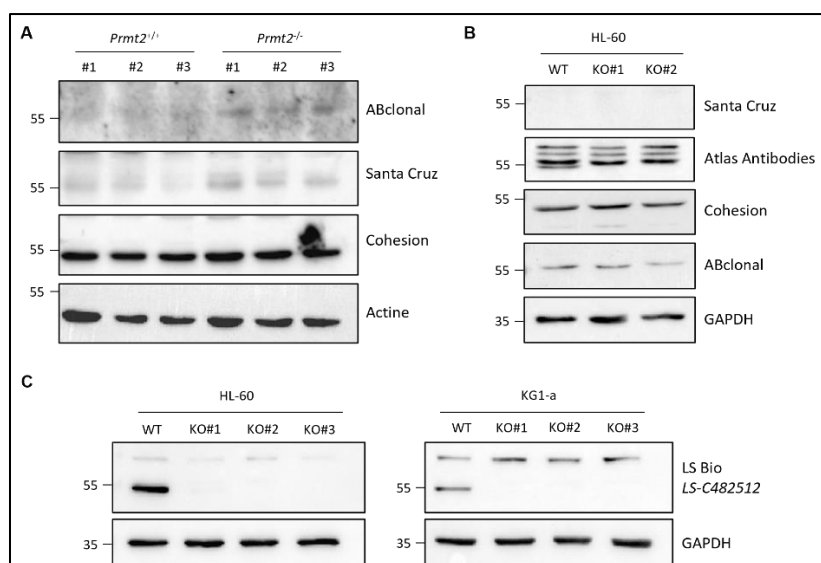


Figure 28. Validation d’un anticorps ciblant spécifiquement PRMT2. A-C. Analyses par Western Blot de l’expression protéique de PRMT2 dans des échantillons de moelles osseuses de souris WT et *Prmt2*^{-/-} (A), de la lignée leucémique HL-60 WT et *PRMT2*^{KO} (B), et validation de l’anticorps LS Bio (LS-C482512) dans les lignées HL-60 et KG-1a WT et *PRMT2*^{KO} (C). La GAPDH et l’actine sont utilisées comme contrôles de charge.

II. Article « *PRMT2 Controls Inflammatory Signaling in Acute Myeloid Leukemia* »

L'expression de PRMT2 est augmentée dans plusieurs types de cancers, où elle est associée au développement de la tumeur, néanmoins son rôle dans les LAM reste inconnu. Nous avons étudié le rôle de PRMT2 par le biais d'un criblage d'expression dans une cohorte de patients atteints de LAM (*The LeuceGene Project*), suivi d'études fonctionnelles dans des cellules de LAM *PRMT2*^{KO}. Nous avons également analysé le compartiment hématopoïétique et la réponse à une inflammation dans un modèle de souris n'exprimant pas notre protéine d'intérêt (*Prmt2*^{-/-}). Dans la cohorte de patients atteints de LAM, les échantillons de patients exprimant faiblement *PRMT2* étaient enrichis de multiples signatures inflammatoires, y compris une expression accrue des gènes liés à NF-κB, et présentaient un taux de survie inférieur aux patients avec une expression plus élevée de *PRMT2*. En accord avec ce rôle de PRMT2 dans le contrôle négatif de la signalisation inflammatoire, les macrophages dérivés de moelle osseuse (BMDM pour *Bone Marrow-Derived Macrophages*) provenant de souris *Prmt2*^{-/-} ont montré une augmentation de la signalisation des cytokines pro-inflammatoires, y compris l'IL6, après un déclenchement par du LPS. De plus, en l'absence de PRMT2 dans les cellules de LAM, l'activation accrue de la voie de signalisation NF-κB entraîne une surexpression de ses gènes cibles, dont l'IL6. La cytokine correspondante déclenche à son tour la voie JAK/STAT3 en se liant à son récepteur, IL6R. STAT3 est activée et est transloquée dans le noyau pour agir comme un facteur de transcription sur ses gènes cibles. Nous émettons l'hypothèse que PRMT2 pourrait agir comme un répresseur direct en séquestrant l'une des sous-unités NF-κB dans le cytoplasme des cellules de LAM, éventuellement en méthylant ses résidus arginine. PRMT2 pourrait moduler transcriptionnellement l'expression des gènes liés à NF-κB, soit en agissant sur la méthylation des résidus arginine de la queue de l'histone, soit en recrutant des complexes de facteurs de transcription sur la chromatine, ce qui entraînerait une production accrue de protéines inhibitrices de NF-κB. L'ensemble de ces résultats identifie PRMT2 comme un régulateur clé du contrôle de l'inflammation dans les LAM.

PRMT2 Controls Inflammatory Signaling in Acute Myeloid Leukemia

Camille Sauter¹, Thomas Morin¹, Fabien Guidez¹, John Simonet¹, Cyril Fournier^{1,2}, Céline Row^{1,2,4}, Denis Masnikov¹, Baptiste Pernon¹, Anne Largeot^{1,#}, Aziza Aznague^{1,2,3}, Yann Hérault⁵, Guy Sauvageau⁶, Marc Maynadié^{1,4}, Mary Callanan^{1,2,3}, Jean-Noël Bastie^{1,7}, Romain Aucagne^{1,2,3*}, Laurent Delva^{1*}

1 Inserm UMR 1231, Team Epi2THM, LabEx LipSTIC Team, UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne, Dijon, France; 2 Unit for Innovation in Genetics and Epigenetics in Oncology, Dijon University Hospital, Dijon, France; 3 CRIGEN, Crispr-Functional Genomics, Dijon University Hospital and Université de Bourgogne, Dijon, France; 4 Department of Hematology Biology, University Hospital Dijon Bourgogne François-Mitterrand, Dijon, France; 5 Université de Strasbourg, CNRS UMR7104, INSERM U1258, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch-Graffenstaden, France; 6 Molecular Genetics of Stem Cells, Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; 7 Department of Clinical Hematology, University Hospital Dijon Bourgogne François-Mitterrand, Dijon, France

#Present address: Tumor Stroma Interactions, Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg, Luxembourg

*Co-seniors

Keywords : PRMT2, inflammation, acute myeloid leukemia, STAT3, NF- κ B

Corresponding authors

Laurent Delva: Inserm UMR 1231, Team Epi2THM, LabEx LipSTIC Team, UFR des Sciences de Santé,
Université de Bourgogne, Dijon, France; Tel: +33(0)380393440; email: Laurent.Delva@u-bourgogne.fr

Camille Sauter: Inserm UMR 1231, Team Epi2THM, LabEx LipSTIC Team, UFR des Sciences de Santé,
Université de Bourgogne, Dijon, France; Tel: +33(0)380393440; email: camille.sauter@inserm.fr

Abstract

Arginine methylation is catalyzed by protein arginine methyltransferases (PRMTs) and is implicated in various cellular processes, including cancer development. PRMT2 expression is increased in several cancer types where it is associated with tumor development, although its role in acute myeloid leukemia (AML) is unknown. Here, we interrogated the role of PRMT2 in AML through expression screening in an AML patient cohort, followed by functional studies in AML PRMT2 KO cells and a *Prmt2* KO mouse model. In the AML cohort, low *PRMT2* expressors were enriched for multiple inflammatory signatures, including increased expression of NF- κ B-related genes, and showed inferior survival. In keeping with a role for PRMT2 in negative control of inflammatory signaling, mouse bone-marrow derived macrophages (BMDMs) from *Prmt2* KO mice showed increased pro-inflammatory cytokine signaling, including IL6, upon LPS treatment. By using a PRMT2-depleted human AML model, aberrant inflammatory signaling was mechanistically linked to overproduction of IL6, coming from a deregulation of the NF- κ B signaling pathway and leading to hyperactivation of STAT3. Together, these findings identify PRMT2 as a key regulator of the control of inflammation in AML.

Significance

So far, no substantial link has been made between protein arginine methyltransferases (PRMTs) and inflammation in the context of acute myeloid leukemia (AML). In this work, we assess for the first time the link between PRMT2 and inflammatory processes in an AML context. We have found that a deregulation of PRMT2 expression leads to an overactivation of the inflammatory mechanisms in normal hematopoietic cells, AML cells and patients. Thus, PRMT2 could be recognized as a biomarker of inflammation in this context, leading to a better adaptation of the treatments to AML patients.

Introduction

Arginine methylation of proteins is involved in the regulation of various cellular processes including DNA repair, gene transcription and post-transcriptional regulation (1), and is catalyzed predominantly by protein arginine methyltransferases (PRMTs). In hematological malignancies, PRMTs are major actors in many cellular mechanisms such as proliferation, cell cycle, inhibition of apoptosis, and RNA splicing. They are also involved in controlling gene expression, through methylation of histone tails (2). Interestingly, there are currently phase I/II clinical trials using PRMT inhibitors showing promising results on hematological malignancies, especially lymphomas, acute myeloid leukemia (AML), and myelodysplastic neoplasms (3).

Among the nine members of the family, PRMT2 is the only one harboring a Src Homology 3 (SH3) binding domain, which is essential for its catalytic activity (4). Although several partners of PRMT2 have been described, its methylation substrates remain widely unknown (5). In cancer, *PRMT2* expression is upregulated in hepatocellular carcinoma and glioblastoma, and is involved in tumor development (6,7). Conversely, its expression is decreased in cardia gastric cancer (8), suggesting a potential antitumor activity.

To further explore the role of PRMT2 in hematopoiesis and AML, we used PRMT2 knock-out (KO) mouse model, AML cell lines as well as AML patient data. We demonstrate that PRMT2 controls the inflammatory signaling in mouse and human hematopoiesis. Specifically, our work shows that PRMT2 controls Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation through the downregulation of the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathway in AML cells, leading to an inhibition of the interleukin-6 (IL6) production. In the same manner, AML patients harboring a low expression of *PRMT2* display a high inflammatory signature associated with an increased expression of several NF- κ B-related genes and may exhibit a lower survival rate. Altogether, the results indicate that PRMT2 is a key regulator of the inflammatory phenotype of AML.

Results

PRMT2 modulates the inflammatory phenotype of AML patients

We have previously demonstrated that the lysine acetyltransferase KAT6A is a partner of KMT2A and Symplekin in hematopoietic stem and progenitor cells (9, 10). A yeast two-hybrid screening was performed with the specific PQ (Pro/Gln-stretch) domain of KAT6A as bait and human bone marrow (BM) cDNA library as prey (Supplemental Figure 1, A and B) and revealed PRMT2 as one of the potential interaction partners of KAT6A. This interaction was confirmed by co-immunoprecipitation in human cells (Supplemental Figure 1C). Knowing the importance of KAT6A fusion proteins in AML initiation and maintenance, we decided to focus our attention on the role of PRMT2 in this context.

To define the extent of PRMT2 involvement in AML initiation and maintenance, we analyzed *PRMT2* expression in 371 patients with *de novo* AML (excluding acute promyelocytic leukemias) using data from *The Leucegene Project* (Table 1). *PRMT2* expression appears to be heterogenous within the cohort and patients with lower *PRMT2* expression display a lower survival rate (Figure 1, A and B). Reanalysis of exome sequencing data from the same patients did not reveal differences between high vs low *PRMT2* expression groups, thus indicating that poor survival across high versus low *PRMT2* groups reflects PRMT2-linked signaling processes (Figure 1C, Supplemental Figure 2A).

To investigate this further, we divided these patients into two groups (by deciles), showing, high (90% decile) and low *PRMT2* (10% decile) expression levels, respectively (Table 1). We performed a gene set enrichment analysis (GSEA) across these two groups and revealed 11 gene sets that were significantly enriched in *PRMT2*^{low} compared to *PRMT2*^{high} patients. Predominant among these gene signatures was a TNF via NF-κB signaling hallmark (Figure 1, D and E). We found that expression of several NF-κB functional subunit genes were inversely correlated with *PRMT2* expression within the 371 AML patients (Figure 1F).

Recent studies have shown that serum ferritin is deregulated in most AML patients, and high levels of ferritin are correlated with inflammation and chemoresistance (11).

Interestingly, *PRMT2*^{low} patients, showing an important inflammatory signature, also show higher levels of *FTH1* and *FTL* genes, corresponding to heavy and light chains of ferritin, respectively (Figure 1G). We analyzed the immune cell composition of the AML samples by using ImmuCellAI analysis (12) and found that *PRMT2*^{low} patients display a significantly higher proportion of monocytes and a decreased abundance of Natural Killer T cells (NKT) compared to *PRMT2*^{high} patients (Supplemental Figure 2B), suggesting an increased activation of the innate immune response and potential dysregulation in the development and maintenance of these cells. Altogether, these findings indicate that PRMT2 could be involved in the molecular mechanism of inflammatory regulation in AML, thus explaining the increased expression of pro-inflammatory genes in patients displaying a low *PRMT2* expression.

Inflammation pathways are enriched in absence of PRMT2 in AML cells

To assess the roles of PRMT2 in AML, we generated *PRMT2* knock-out cell lines (*PRMT2*^{KO}) from the lipopolysaccharide (LPS)-sensitive HL-60 cells (Figure 2A). We investigated whether PRMT2 knock-out causes upregulation of the expression of other PRMTs at the protein level but we couldn't detect any difference (Figure 2B). Additionally, no significant effect of PRMT2 depletion on cell proliferation (Figure 2C) or on myeloid cell surface markers was found (Supplemental Figure 3).

We performed RNA-seq to determine the possible effects of PRMT2 on gene expression in HL-60 cells. GSEA comparing *PRMT2*^{KO} to WT cells was performed and revealed an enrichment of 7 sets of genes. Interestingly, we found the genes involved in the NF-κB signaling pathway in response to TNF as the most enriched set of gene (Figure 2, D and E). We highlighted NF-κB subunit genes in the top 20 enriched genes in the "TNFA signaling via NFKB" hallmark set of genes in *PRMT2*^{KO} cells (Figure 2F). Taken together, this is evidence of a role for PRMT2 in the control of inflammatory signaling in AML.

Prmt2^{-/-} BM-derived macrophages exhibit a dysregulated inflammatory response

To deepen our understanding of the effects of PRMT2 on inflammation, we used *Prmt2* knock-out (*Prmt2^{-/-}*) mice (13). We investigated the hematopoietic compartment of these mice and revealed that PRMT2-deficient mice showed no discernible variation in the populations of mature and immature blood and BM cells (Supplemental Figure 4, A and B). Similarly, *Prmt2^{-/-}* BM cells demonstrated comparable hematopoietic reconstitution ability to normal BM cells when transplanted in a competitive setting (Supplemental Figure 4C).

We generated an *ex vivo* model of bone marrow-derived macrophages (BMDMs) using monocytes isolated from BM (Figure 3A). Following LPS treatment, *Prmt2^{-/-}* macrophages did not reveal any morphological change (Figure 3B, Supplemental Figure 4D) or any change in the expression of surface markers either with or without LPS treatment for 24h (Supplemental Figure 4E). However, stimulation of *Prmt2^{-/-}* BMDMs by LPS caused a significantly higher expression of *IL6* and *Tumor Necrosis Factor (TNF)* cytokines (Figure 3C) and it also resulted in an increase in their secretion (Figure 3D). This demonstrates an exacerbated response to LPS in absence of PRMT2, thus confirming a role for PRMT2 in the control of the inflammatory phenotype in mouse BMDMs. Taken together, these data suggest that even though PRMT2 does not seem to have a crucial role in the formation of mature blood cells in homeostatic conditions, it alleviates the inflammatory response induced by LPS in the mouse.

PRMT2 is involved in the regulation of STAT3 activation

To test the findings from the mice in human AML cells, we treated *PRMT2^{KO}* HL-60 cells with LPS. This produced higher levels of *IL6* expression and secretion compared to WT cells (Figure 4, A and B). It is known that the binding of IL6 to its receptor (IL6R) contributes to the activation of JAK/STAT signaling pathway. We first investigated the IL6 receptor (IL6R) expression in *PRMT2^{KO}* cells and it was comparable to that seen in control cells (Supplemental Figure 5A).

However, in the absence of PRMT2 and under LPS stimulation, STAT3 activation, characterized by its phosphorylation at tyrosine 705 (Y705), is highly increased compared to control cells without any significant change in STAT3 protein expression (Figure 4, C and D). These results identify a regulatory role of PRMT2 on STAT3 after IL6 binding to its receptor, following LPS stimulation. Methylation of hypothalamic STAT3 by PRMT2 has already been described under a stimulation by leptin (14). However, we did not identify any direct interaction between PRMT2 and STAT3 (Supplemental Figure 5B).

NF-κB-dependent activation of STAT3 is repressed by PRMT2

By treating HL-60 *PRMT2*^{KO} cells with IL6, instead of LPS, we showed that the increased level of secreted IL6 is responsible for the previously observed overactivation of STAT3. As expected, the difference of phosphorylated STAT3 levels between the WT and *PRMT2*^{KO} cells is abolished under IL6 treatment (Figure 5, A and B). However, other signaling pathways such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways can lead to the activation of STAT3. We did not find any difference between the activated and total form of any of the studied MAPKs, i.e. SAPK/JNK, ERK1/2, and p38 (Figure 5C) between *PRMT2*^{KO} and WT cells, suggesting that PRMT2 has little or no role in these pathways.

Under LPS/TLR4 (Toll-Like Receptor 4) stimulation of myeloblastic cells such as HL-60, IL6 production can be triggered by several signaling modules, including NF-κB (15, 16). We first discovered that *PRMT2*^{KO} cells express higher levels of TLR4 at their surface than control both in unstimulated and in LPS-stimulated conditions, meaning that PRMT2 can modulate the surface expression of the TLR4 in AML cells (Figure 5D). Interestingly, upon LPS stimulation in HL-60 *PRMT2*^{KO} cells, increased levels of IL6 appear to result from an overactivated NF-κB pathway, as evidenced by higher levels of p65 translocation into the nucleus, more specifically after 8h of LPS treatment (Figure 5E).

Concomitantly, we observed an increase in the inhibitor of NF- κ B alpha (I κ B α) phosphorylated form in *PRMT2*^{KO} cells resulting in I κ B α degradation, as more evidenced after 8h of treatment with LPS (Supplemental Figure 5C). These results indicate that in absence of PRMT2 in AML cells, enhanced activation of the NF- κ B signaling pathway leads to an overexpression of its target genes including *IL6*. The corresponding cytokine in turn triggers the JAK/STAT3 pathway by binding to its receptor, IL6R. STAT3 is activated and translocates into the nucleus to act as a transcription factor on its target genes. We hypothesize that PRMT2 could act as a direct repressor by sequestering one of the NF- κ B subunits in the cytoplasm of AML cells, possibly by methylating its arginine residues (Figure 6A). PRMT2 could transcriptionally modulate the NF- κ B-related gene expression, either by acting on the methylation of histone tail arginine residues or by recruiting transcription factor complexes on the chromatin (Figure 6, B and C), thus leading to an increased production of NF- κ B inhibitor proteins.

Discussion

Here, we demonstrate for the first time that PRMT2 downregulation leads to an overactivation of the inflammatory processes in AML. Indeed, a direct link between inflammation and AML has been previously highlighted, indicating that inflammation plays a major role in myelosuppression, chemoresistance and AML disease progression (17). Furthermore, IL6 and ferritin are inflammatory markers that have a strong impact on prognosis for AML patients and the anti-inflammatory molecule dexamethasone potentiates the effect of chemotherapies in AML patients with a high white blood cell count (18), demonstrating the urge to find new markers of inflammation to better adapt treatment of AML to the patient.

It has been shown that cytokine signaling pathways are altered in AML, with impacts on prognosis and drug efficiency. IL6 is considered as a critical cytokine, implicated in regulatory pathways of inflammation, immune regulation (19), and cancer (20, 21). Overexpression of IL6 was detected in AML patients and has been correlated to a poorer prognosis and drug resistance (22–25). Interestingly, mesenchymal cells can induce chemoresistance of AML through activation of the IL6/STAT3 pathway (26) but the molecular mechanism involved is not well established yet.

Arginine methylation, known to control several cellular processes also contributes to the control of inflammation. Although the roles of PRMTs on inflammatory pathways are known, no substantial work has uncovered the link between PRMT and inflammation in the context of AML. PRMT2 has already been studied in an inflammatory context (27–31) but not in AML or normal monocytes. The increased expressions and secretion of IL6 and TNF in *Prmt2*^{-/-} mice have already been described in macrophages (31) and confirm our findings, although we assess for the first time the hematopoietic compartment of this model. Ganesh *et al.* uncovered an effect of PRMT2 on the NF- κ B signaling pathway using murine *Prmt2*^{-/-} fibroblasts (29). Vurusaner *et al.* have reported that PRMT2 deficiency enhances the inflammatory pathways in macrophages coming from atherosclerosis plaques

(27). Conversely, PRMT2-induced arginine methylation of TLR4 cytoplasmic domain has been described as a positive regulation of the interferon beta (IFN β) signaling (30).

Other PRMTs are involved in the inflammatory response: PRMT1 acts as an inhibitor of inflammation by methylating RelA/p65 (32) and the association of PRMT1 with CARM1 (PRMT4) co-activates STAT5 for the upregulation of CITED2, resulting in the negative regulation of NF- κ B (33). Conversely, PRMT5 stimulates the NF- κ B signaling pathway through an interaction with TRAIL receptor and methylates RelA/p65, thus promoting pro-inflammatory cytokine expression (34). PRMT6 and CARM1 also participate in the activation of inflammatory processes by directly acting on RelA/p65 and in the chromatin remodeling at the promoter of pro-inflammatory genes (35–37).

Apart from its roles in inflammation, PRMT2 is also able to methylate arginine residues located on histone tails, and especially the arginine 8 on the histone 3 (H3R8), thus regulating target gene transcription. More recently, two reports uncovered the connection between PRMT2 and pro-inflammatory pathways via the methylation of H3R8, in hepatocellular carcinoma (HCC) and dextran sulfate sodium-induced colitis in mouse, respectively (7, 38). These works support our hypothesis that beyond its role in AML in the control of inflammation through the cytoplasmic pathway of the NF- κ B signaling, PRMT2 could also act in the nucleus by methylating H3R8 either to activate transcription of NF- κ B inhibitor genes or by repressing transcription of NF- κ B target genes (Figure 6B).

Histone tail methylation by PRMTs has been studied in hematological malignancies, including AML. For example, PRMT6 methylates H3R2, thus preventing the trimethylation of H3K4 and the binding to other methyltransferase complexes to the H3 tail (39, 40). Moreover, since this class of proteins may belong to coactivator or corepressor complexes, PRMT2 could be part of one of these complexes, thus leading to a modulation of transcription of NF- κ B target genes (Figure 6C) (3). As we detected a physical interaction between PRMT2 and the lysine acetyltransferase KAT6A, which is often involved in these complexes, it is likely that PRMT2 interacts with KAT6A in this context. In AML,

CARM1, which methylates RUNX1, activates its complex with the DPF2 protein, leading to the inhibition of *miR-223* expression (41).

PRMT5 can interact with MEP50, antagonizing the H3K27 trimethylation by the Polycomb Repressor Complex 2 (PRC2) (42). Finally, the complex composed of PRMT1/KDM4C/KAT6A-NCOA2 can stimulate *HOX* gene transcription through the methylation of H4R3 in AML (43).

Taken together, our results point to a critical role for PRMT2 in the control of inflammation in AML. We have found that PRMT2-depleted AML cells exhibit a pro-inflammatory signature. *Prmt2*^{-/-} murine BMDMs stimulated with LPS display increased production of IL6 and TNF cytokines, indicating that PRMT2 is involved in the inflammatory response in normal hematopoiesis. Furthermore, we demonstrated that PRMT2-depleted AML cells show heightened activation of the NF-κB signaling pathway, leading to an overexpression of IL6 and ultimately an increased phosphorylation of the STAT3 protein. Other signaling pathways leading to activation of the JAK/STAT3 signal are not impacted by PRMT2. Finally, we observe that adult AML patients with a low expression of *PRMT2* display a lower survival rate and an increased activation of inflammatory signatures compared to the high *PRMT2* expressors. Recognition of PRMT2 as a biomarker of inflammation in AML would help to adapt treatment possibly through the synergistic use of anti-inflammatory molecules with other cytotoxic drugs.

Methods

CRISPR-Cas9 nucleofection

Two crRNA targeting PRMT2 were designed: AA (5'-CCUGACGGAUAAAGU-3') and AB (Forward: 5'-CGUGGAUGAGUACGA-3'). The ribonucleoprotein complexes were formed as specified in the manufacturer's protocol (Alt-R CRISPR-Cas9 System, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium). They were electroporated through the Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza, Basel, Switzerland). After 48h, cells were washed and resuspended in Pre-Sort Buffer (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland) and a single-cell sorting was performed in a 96-well plate containing culture medium supplemented with 50% of HL-60 conditioned medium using a BD FACSMelody (BD Biosciences).

Western Blot

Total cell lysates were obtained by resuspending cells in 1X cell lysis buffer (10X stock solution: 9803, Cell Signaling, Danvers, MA) supplemented with a protease inhibitor cocktail (cOmplete, Sigma-Aldrich, Burlington, MA) and a phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP, Sigma-Aldrich). They were incubated 30 min on ice and centrifuged at 17,000 g for 15 min. NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction kit (78833, Thermo Scientific, Waltham, MA) was used for cell fractionation. For Western Blot, 50 µg of protein were mixed with Laemmli buffer 1X (4X stock solution: Tris-HCl pH 6.8 200 mM, DTT 400 mM, SDS 277 mM, bromophenol blue, glycerol 30%). Samples were heated at 95°C for 5 min. Samples were separated by SDS-PAGE (4% stacking gel, 10% resolving gel) and transferred into a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). The membranes were blocked for 1h in BSA (5% solution in 1X TBS-T (0.1%)) and stained sequentially with primary and secondary antibodies. The following primary antibodies were used: Anti-mouse PRMT4 (12495), GAPDH (97166) and anti-rabbit, PRMT1 (ab190892, Abcam, Cambridge, UK), PRMT2 (LS-C482512, LS-Bio, Lynnwood, WA), PRMT3 (ab191562, Abcam), PRMT5 (79998), p-STAT3 (9145), STAT3 (12640), p-IκBα (2859), IκBα (4812), p-

SAPK/JNK (9251), SAPK/JNK (9252), p-ERK1/2 (9101), ERK1/2 (9102), p-p38 (4511), p38 (9212), SP1 (9389), p65 (8242). An anti-beta actin directly coupled with HRP (A3854, Sigma-Aldrich) was also used.

All antibodies were purchased from Cell Signaling, except when specified and were all diluted in blocking buffer and used at 4 °C overnight, then washed three times in 1X TBS-T (0.1%). The secondary anti-rabbit (7074) or anti-mouse (7076) antibody conjugated with horseradish peroxidase was added, and membranes were incubated at RT for 1 h. Membranes were then washed three times. To obtain the chemiluminescence signal, membranes were incubated 5 min with Clarity or Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad) and read on a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Human AML patients

A part of this study is associated with the Leucegene project, an initiative approved by the Research Ethics Boards of Université de Montréal and Maisonneuve-Rosemont Hospital (Montréal, QC, Canada). All AML samples were collected with informed consent between 2001 and 2015 according to Quebec Leukemia Cell Bank procedures. Normal BM samples were obtained from the Quebec Leukemia Cell Bank and from Lonza. A subset of the AML cohort was previously deposited in the Gene Expression Omnibus (GSE49642 and GSE52656).

Mice

Experiments using mice were approved by the Ethics committee of the Université de Bourgogne. Mice were housed in a temperature-controlled environment under a 12h light-dark cycle with free access to water and a standard irradiated rodent chow diet. All mice used were maintained under specific pathogen-free conditions according to animal-study protocols reviewed and approved in accordance with Université de Bourgogne institutional guidelines for animal care and under protocols approved by the Université de Bourgogne Institutional Animal Care and Use Committee.

Prmt2^{-/-} mice were generated by Elizabeth Nabel (Cardiovascular Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD). *Prmt2*^{-/-} mice were backcrossed ten times with C57BL/6J mice (Janvier Labs, le Genest Saint Isle, France). For genotyping, genomic DNA was prepared from tail biopsies using the REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich). Deleted and wild type *Prmt2* alleles were identified as previously described (14).

BM-derived macrophage differentiation and treatment

Murine primary macrophages derived from BM (BMDMs) were obtained from 6- to 8-week-old male/female mice and monocytes were magnetically isolated from total BM filtered through a 45 µm mesh (Monocyte Isolation Kit (BM), mouse, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). They were cultured with 100 ng/mL murine CSF-1 (130-101-706, Miltenyi) for five days. An inflammatory phenotype was induced after five days of differentiation by adding 100 ng/mL of sonicated LPS (*E. coli* O127:B8, Sigma-Aldrich) to the culture medium. Pictures of the macrophages were taken every 12h during differentiation using a live imager (Incucyte® S3 Live-Cell Analysis System, Sartorius, Goettingen, Germany).

Cell culture and treatments

HL-60 obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), subclones and murine BMDMs were grown in RPMI 1640 with L-Glutamine (Dutscher, Bernolsheim, France) supplemented with 10% FBS (Dutscher) and 1% of antibiotics (10,000 U/mL Penicillin, 10 mg/mL Streptomycin, 25µg/mL Amphotericin B, PAN-Biotech, Aidenbach, Germany). The human cell line HEK293 obtained from the ATCC and subclones were grown in DMEM (Dutscher) supplemented as previously described. All cells were incubated in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. HL-60

cells were treated with 100 ng/mL sonicated LPS (*E. coli* O127:B8, Sigma-Aldrich) or 40 ng/mL human IL6 (SRP3096, Merck, Darmstadt, Germany).

RNA isolation and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) with a previous step to homogenize the samples (QIAshredder, Qiagen). cDNA was synthesized from 1 µg of RNA using the sensiFAST cDNA Synthesis Kit (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH). cDNA was amplified with the GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI) using the ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Mouse Taqman probes for *Il6* (Mm00446190_m1) and *Tnf* (Mm00443250_m1) and human Taqman probes for *IL6* (Hs00174131_m1) was used. Mouse *B-Actin* (Mm02619580_g1) and human *PPIA* (Hs04194521_s1) were used as normalization controls. All probes were purchased from ThermoFisher Scientific.

ELISA

All ELISAs were purchased from BD Biosciences and performed following the manufacturer's protocol. For human samples, the Human IL6 ELISA Kit II (550799) was used and for murine samples the BD OptEIA™ Mouse IL6 ELISA (550950) and the BD OptEIA™ Mouse TNF ELISA (560478) kits were used.

Flow cytometry

Cells were centrifuged at 300 g for 5 min and washed twice with 1X PBS. The anti-human TLR4-PE antibody (564215, BD Biosciences) is added and diluted in 1X PBS supplemented with 2% FBS and incubated for 20 min at 4°C. After incubation, excess antibodies were diluted in 1X PBS supplemented

with 2% FBS, samples were centrifuged at 300 g for 5 min and washed twice. Sample acquisition was performed using a LSR Fortessa (BD Biosciences) flow cytometer and data were analyzed with FlowJo (v10.5.3).

RNA-Seq and GSEA

For high-throughput RNA-seq, cells were harvested from HL-60 wild type, HL-60 *PRMT2*^{KO} or the same cell lines treated with 100 ng/mL LPS during 24h. RNA was extracted (TRIzol™ reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA) and RNA-seq was performed by GENEWIZ (Azenta Life Sciences, Burlington, MA). The paired-end reads were aligned to the human genome reference GRCh38 (genome-build-accession GCA_000001405.28) with the well-known aligner STAR (v2.7.6a) (44) using the 2-pass mode. The read counts were also done with STAR. The library DESeq2 (v1.39.8) (45) from R (v4.1.1) was used to normalize the read counts and perform the differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution.

Statistical analyses

Overall survival was determined from the time of diagnosis until death or last follow-up. Survival curves were calculated using the Kaplan-Meier method and compared using the Log-rank test. Normality of data was assessed with the Shapiro-Wilk test. For normally distributed data, an unpaired t-test was performed, otherwise the non-parametric Mann-Whitney test was used. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism (v9.5.1).

Author contributions

C.S. contributed to research design, performed the research, analyzed the data, and drafted the manuscript; T.M. contributed to experiments and data analysis; F.G. contributed to data analysis, helpful discussions, and critically reviewed the manuscript; J.S. conducted experiments and contributed to data analysis; C.F. analyzed omic data; C.R. performed and analyzed flow cytometry data; D.M. participated to data analysis, and critically reviewed the manuscript; B.P. critically reviewed the manuscript; A.L. conducted yeast two-hybrid assay; A.A. performed experiments; Y.H. and G.S. provided study materials; M.M. critically reviewed the manuscript; M.C. designed and co-interpreted the AML patient RNA-seq/GSEA, exome and ImmuCellAI analyses and reviewed the manuscript; J.N.B. participated in the research design, contributed to discussions and critically reviewed the manuscript; R.A. and L.D. contributed to research design, supervised the research and critically reviewed the manuscript.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the IMAFLOW Core Facility at the Université de Bourgogne supported by Burgundy Regional Council (Anabelle Sequeira, Serge Monier, and Nicolas Pernet) for all the flow cytometry data acquisition, and the animal facility (Valérie Saint-Giorgio) from the Université de Bourgogne for the mouse studies. We also thank Dr François Hermetet for providing the antibodies against phosphorylated and total MAPK proteins.

This work was supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11 LABX-0021 (LipSTIC LabEx), the Association Laurette Fugain (to Laurent Delva), the Ligue Nationale contre le Cancer (Coordination Interrégionale des régions Grand Est et Bourgogne-Franche Comté) (to Laurent Delva), the Cancéropôle Est (to Laurent Delva), the FEDER, and the Regional Council of Bourgogne Franche-Comté. Camille Sauter was supported by fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (ECO201906009006; 3 years), the Fondation ARC (ARCD0C42022010004491; 1 year) and the Société Française d’Hématologie (SFH; 4 months), John Simonet by the LipSTIC LabEx, Denis Masnikov and Baptiste Pernon by the French Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation (MESRI), and Dr. Anne Largeot by fellowships from Inserm associated with the Regional Council of Bourgogne and the SFH.

References

1. E. Guccione, S. Richard, The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation. *Nat Rev Mol Cell Bio* 20, 642–657 (2019).
2. J. W. Hwang, Y. Cho, G.-U. Bae, S.-N. Kim, Y. K. Kim, Protein arginine methyltransferases: promising targets for cancer therapy. *Exp Mol Medicine* 53, 788–808 (2021).
3. C. Sauter, et al., Protein Arginine Methyltransferases as Therapeutic Targets in Hematological Malignancies. *Cancers* 14, 5443 (2022).
4. V. Cura, et al., Structural studies of protein arginine methyltransferase 2 reveal its interactions with potential substrates and inhibitors. *Febs J* 284, 77–96 (2017).
5. V. Cura, J. Cavarelli, Structure, Activity and Function of the PRMT2 Protein Arginine Methyltransferase. *Life* 11, 1263 (2021).
6. F. Dong, et al., PRMT2 links histone H3R8 asymmetric dimethylation to oncogenic activation and tumorigenesis of glioblastoma. *Nat Commun* 9, 4552 (2018).
7. G. Hu, et al., PRMT2 accelerates tumorigenesis of hepatocellular carcinoma by activating Bcl2 via histone H3R8 methylation. *Exp Cell Res* 394, 112152 (2020).
8. I. Bednarz-Misa, et al., Altered L-Arginine Metabolic Pathways in Gastric Cancer: Potential Therapeutic Targets and Biomarkers. *Biomol* 11, 1086 (2021).
9. J. Paggetti, et al., Crosstalk between leukemia-associated proteins MOZ and MLL regulates HOX gene expression in human cord blood CD34+ cells. *Oncogene* 29, 5019–5031 (2010).
10. A. Largeot, et al., Symplekin, a polyadenylation factor, prevents MOZ and MLL activity on HOXA9 in hematopoietic cells. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Mol Cell Res* 1833, 3054–3063 (2013).
11. S. Bertoli, et al., Ferritin heavy/light chain (FTH1/FTL) expression, serum ferritin levels, and their functional as well as prognostic roles in acute myeloid leukemia. *Eur. J. Haematol.* 102, 131–142 (2019).
12. Y. Miao, et al., ImmuCellAI: A Unique Method for Comprehensive T-Cell Subsets Abundance Prediction and its Application in Cancer Immunotherapy. *Adv. Sci.* 7, 1902880 (2020).
13. T. Yoshimoto, et al., The arginine methyltransferase PRMT2 binds RB and regulates E2F function. *Exp Cell Res* 312, 2040–2053 (2006).
14. H. Iwasaki, et al., Disruption of Protein Arginine N-Methyltransferase 2 Regulates Leptin Signaling and Produces Leanness In Vivo Through Loss of STAT3 Methylation. *Circ Res* 107, 992–1001 (2010).
15. M. K. Poplutz, I. Wessels, L. Rink, P. Uciechowski, Regulation of the Interleukin-6 gene expression during monocytic differentiation of HL-60 cells by chromatin remodeling and methylation. *Immunobiology* 219, 619–626 (2014).
16. S. U. Islam, et al., Decursinol Angelate Inhibits LPS-Induced Macrophage Polarization through Modulation of the NFκB and MAPK Signaling Pathways. *Molecules* 23, 1880 (2018).

17. C. Récher, Clinical Implications of Inflammation in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers Oncol* 11, 623952 (2021).
18. S. Bertoli, et al., Dexamethasone in hyperleukocytic acute myeloid leukemia. *Haematologica* 103, 988–998 (2018).
19. T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto, IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Csh Perspect Biol* 6, a016295 (2014).
20. D. R. Hodge, E. M. Hurt, W. L. Farrar, The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 41, 2502–2512 (2005).
21. J. Mauer, J. L. Denson, J. C. Brüning, Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol* 36, 92–101 (2015).
22. B. Sanchez-Correa, et al., Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: Survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels. *Cytokine* 61, 885–891 (2013).
23. A. M. Stevens, J. M. Miller, J. O. Munoz, A. S. Gaikwad, M. S. Redell, Interleukin-6 levels predict event-free survival in pediatric AML and suggest a mechanism of chemotherapy resistance. *Blood Adv* 1, 1387–1397 (2017).
24. M. I. Saadi, et al., Expression Levels of Il-6 and Il-18 in Acute Myeloid Leukemia and Its Relation with Response to Therapy and Acute GvHD After Bone Marrow Transplantation. *Indian J Surg Oncol* 12, 465–471 (2021).
25. P. Peterlin, et al., A new cytokine-based dynamic stratification during induction is highly predictive of survivals in acute myeloid leukemia. *Cancer Med-us* 10, 642–648 (2021).
26. D. Hou, et al., Stromal cells promote chemoresistance of acute myeloid leukemia cells via activation of the IL-6/STAT3/OXPHOS axis. *Ann Transl Medicine* 8, 1346–1346 (2020).
27. B. Vurusaner, et al., Loss of PRMT2 in myeloid cells in normoglycemic mice phenocopies impaired regression of atherosclerosis in diabetic mice. *Sci Rep-uk* 12, 12031 (2022).
28. M. I. Vhuiyan, et al., PRMT2 interacts with splicing factors and regulates the alternative splicing of BCL-X. *J Biochem* 162, mvw102 (2017).
29. L. Ganesh, et al., Protein Methyltransferase 2 Inhibits NF- κ B Function and Promotes Apoptosis. *Mol Cell Biol* 26, 3864–3874 (2006).
30. J. Wang, et al., Arginine methylation by PRMT2 promotes IFN- β production through TLR4/IRF3 signaling pathway. *Mol Immunol* 139, 202–210 (2021).
31. E. Dalloneau, P. L. Pereira, V. Brault, E. G. Nabel, Y. Hérault, Prmt2 Regulates the Lipopolysaccharide-Induced Responses in Lungs and Macrophages. *J Immunol* 187, 4826–4834 (2011).
32. A. Reintjes, et al., Asymmetric arginine dimethylation of RelA provides a repressive mark to modulate TNF α /NF- κ B response. *Proc National Acad Sci* 113, 4326–4331 (2016).

33. M. A. Kleinschmidt, G. Streubel, B. Samans, M. Krause, U.-M. Bauer, The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nucleic Acids Res* 36, 3202–3213 (2008).
34. D. P. Harris, S. Bandyopadhyay, T. J. Maxwell, B. Willard, P. E. DiCorleto, Tumor Necrosis Factor (TNF)- α Induction of CXCL10 in Endothelial Cells Requires Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5)-mediated Nuclear Factor (NF)- κ B p65 Methylation*. *J Biol Chem* 289, 15328–15339 (2014).
35. A. D. Lorenzo, Y. Yang, M. Macaluso, M. T. Bedford, A gain-of-function mouse model identifies PRMT6 as a NF- κ B coactivator. *Nucleic Acids Res* 42, 8297–8309 (2014).
36. M. Covic, et al., Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF- κ B-dependent gene expression. *Embo J* 24, 85–96 (2005).
37. F. Miao, S. Li, V. Chavez, L. Lanting, R. Natarajan, Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase-1 Enhances Nuclear Factor- κ B-Mediated Gene Transcription through Methylation of Histone H3 at Arginine 17. *Mol Endocrinol* 20, 1562–1573 (2006).
38. J. Li, et al., Protein arginine methyltransferase 2 (PRMT2) promotes dextran sulfate sodium-induced colitis by inhibiting the SOCS3 promoter via histone H3R8 asymmetric dimethylation. *Brit J Pharmacol* 179, 141–158 (2022).
39. D. Hyllus, et al., PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Gene Dev* 21, 3369–3380 (2007).
40. E. Guccione, et al., Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* 449, 933–937 (2007).
41. L. P. Vu, et al., PRMT4 Blocks Myeloid Differentiation by Assembling a Methyl-RUNX1-Dependent Repressor Complex. *Cell Reports* 5, 1625–1638 (2013).
42. F. Liu, et al., PRMT5-mediated histone arginine methylation antagonizes transcriptional repression by polycomb complex PRC2. *Nucleic Acids Res* 48, 2956–2968 (2020).
43. N. Cheung, et al., Targeting Aberrant Epigenetic Networks Mediated by PRMT1 and KDM4C in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 29, 32–48 (2016).
44. A. Dobin, et al., STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21 (2013).
45. M. I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550 (2014).

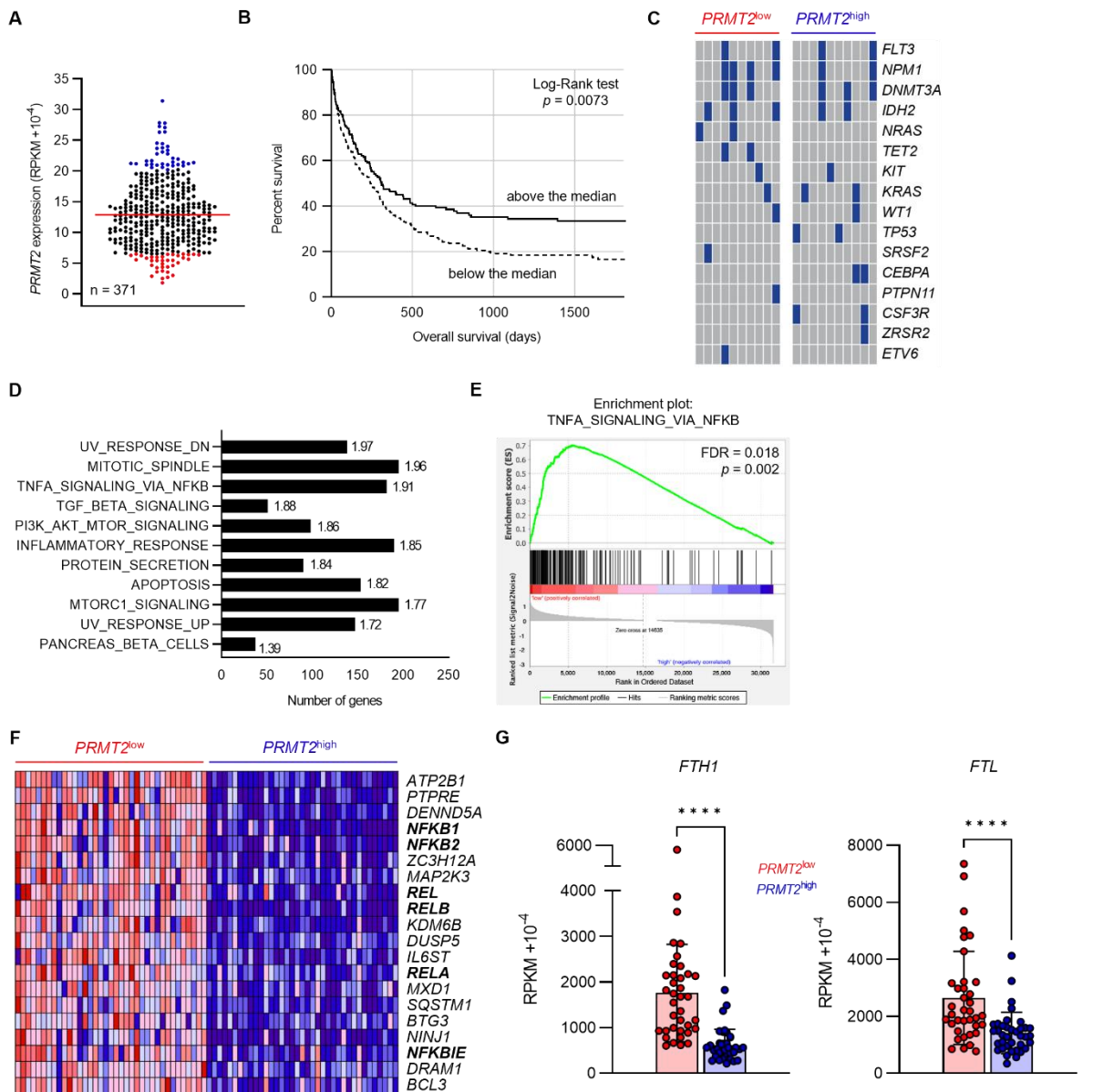


Figure 1. AML patients with a low *PRMT2* expression display a higher inflammatory signature. **A.** *PRMT2* gene expression within the Leucegene cohort (non-APL AML, $n = 371$) at diagnosis with the *PRMT2*^{low} patients in red ($n = 37$) and *PRMT2*^{high} patients in blue ($n = 37$). **B.** Survival curves of the patients depending on their *PRMT2* expression: above or below the median of expression of the cohort. **C.** Mutation profile of the *PRMT2*^{low} and *PRMT2*^{high} patients for a subset of frequently mutated genes in AML. Blue: mutated gene; grey: non mutated gene. **D.** The bar graph represents the most significantly overrepresented hallmarks after a gene set enrichment analysis (GSEA) of *PRMT2*^{low} compared to *PRMT2*^{high} patients with normalized enrichment scores on the right. All gene sets are FDR < 25% and $p < .01$. **E.** GSEA plot for the “TNFA signaling via NFKB” hallmark with FDR and nominal p indicated. **F.** Heatmap representing the top 20 enriched genes of the “TNFA signaling via NFKB” hallmark. NF- κ B-related genes appear in bold. **G.** Box plots showing *FTH1* and *FTL* expressions in *PRMT2*^{low} versus *PRMT2*^{high} subgroups. The p values are indicated in the graphs; **** $p < 0.0001$.

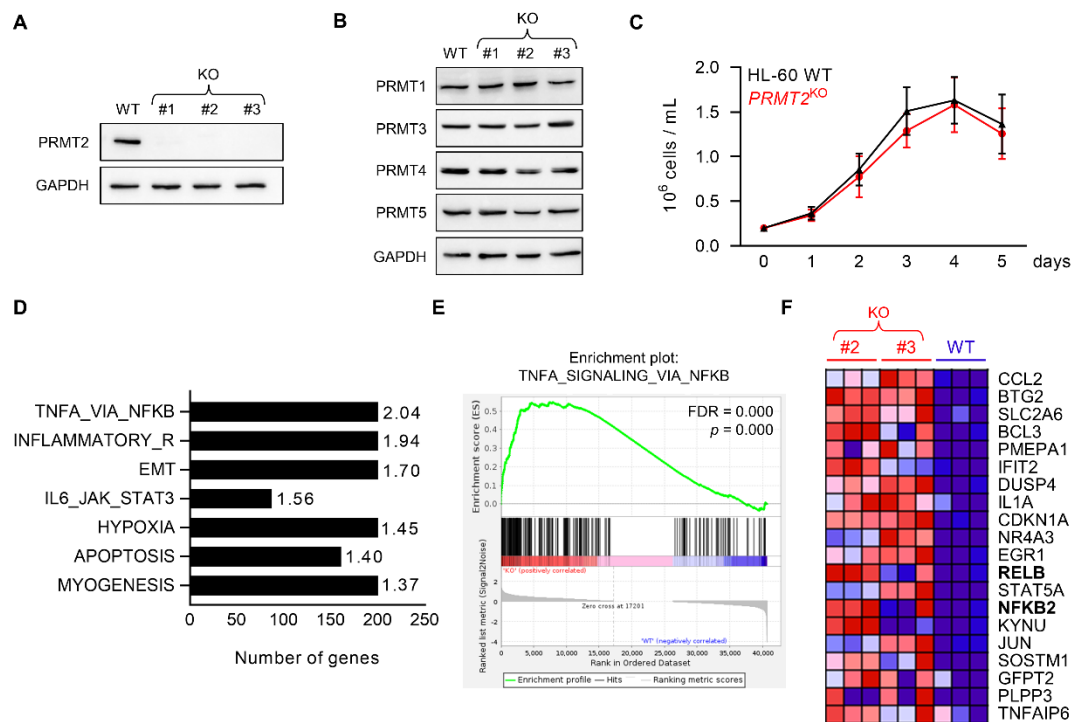


Figure 2. The lack of PRMT2 increases the inflammatory phenotype of leukemic cells *in vitro*. **A-B.** Western Blot analyses on WT HL-60 or 3 different clones of *PRMT2*^{KO} cells (KO) for PRMT2 (A) and other PRMT (-1, -3, -4, and -5) expressions (B). GAPDH is used as loading control. All presented blots are representative figures from at least three independent experiments. **C.** Assessment of cell proliferation of the 3 *PRMT2*^{KO} clones compared to WT HL-60 cells by cell counting, shown as mean ± SD of three independent experiments. **D.** The bar graph represents the most significantly overrepresented hallmarks after a gene set enrichment analysis (GSEA) of #2 and #3 *PRMT2*^{KO} clones compared to WT with normalized enrichment scores on the right. All gene sets are FDR < 25% and *p* < .01. **E.** GSEA plot for the “TNFA signaling via NFKB” hallmark with FDR and nominal *p* indicated. **F.** Heatmap representing the top 20 enriched genes of the “TNFA signaling via NFKB” hallmark. NF-κB-related genes appear in bold.

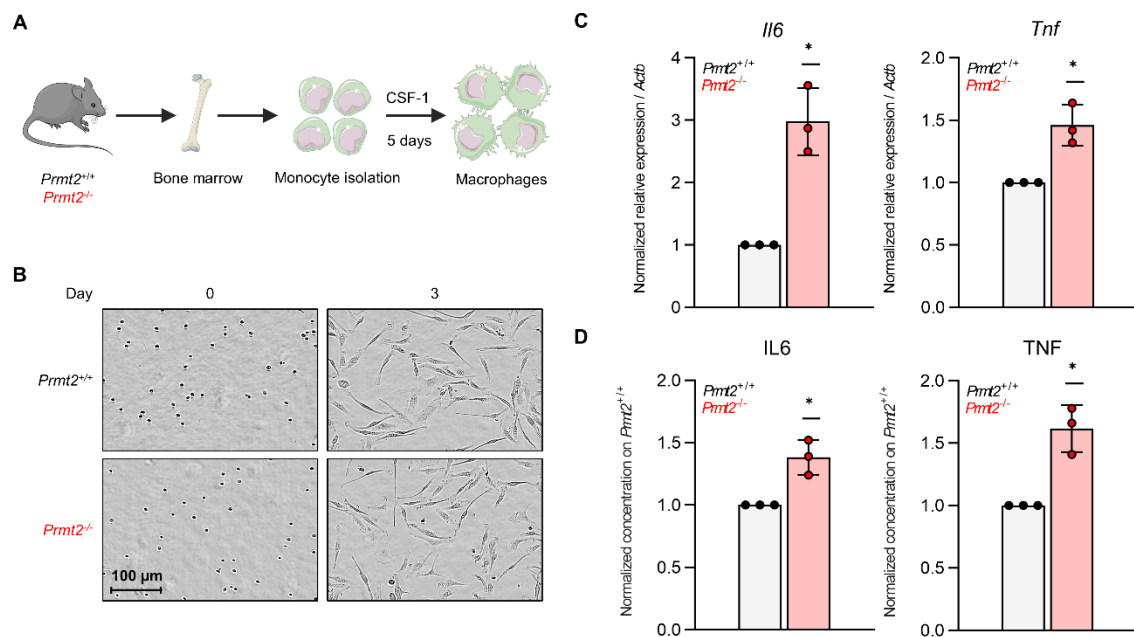


Figure 3. The absence of PRMT2 exacerbates the inflammatory phenotype of mouse BM-derived macrophages (BMDMs). **A.** Schematic representation for the obtention of BMDMs from purified monocytes of *Prmt2*^{-/-} or control (*Prmt2*^{+/+}) mouse BM. **B.** Morphological analysis of monocytes after 0 and 3 days of differentiation into macrophages. Images from phase-contrast microscopy using an Incucyte® S3 Live-Cell Analysis System at magnification x20. **C.** *Il6* (left) and *Tnf* (right) expression measured by RT-QPCR on total RNA from mouse BMDMs after stimulation by 100 ng/mL LPS during 8h. **D.** ELISA on BMDM culture media for IL6 (left) and TNF (right) after stimulation by 100 ng/mL LPS during 8h. All data represent three independent experiments. The *p* values are indicated in the graphs; **p* < 0.05.

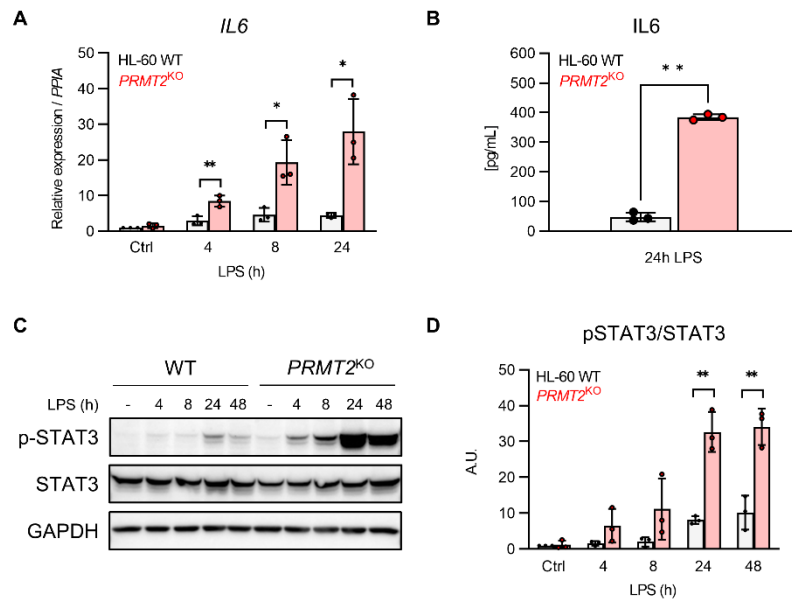


Figure 4. PRMT2 is involved in the human inflammatory response through the control of STAT3 activation in vitro. **A.** RT-QPCR on total RNA measuring *IL6* in *PRMT2*^{KO} and WT cells after stimulation by 100 ng/mL LPS during 4, 8, or 24h. **B.** ELISA on human *IL6* in *PRMT2*^{KO} and WT cell culture medium after stimulation by LPS (100 ng/mL) during 24h. **C-D.** Western Blot analysis (C) and quantitation (D) of phosphorylated (Y705) and total form of STAT3 after stimulation by LPS (100 ng/mL) during 4, 8, 24 or 48h. GAPDH is used as loading control. Ctrl: Control. All presented data are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. The presented blot corresponds to a representative figure from at least three independent experiments. The *p* values are indicated in the graphs; **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

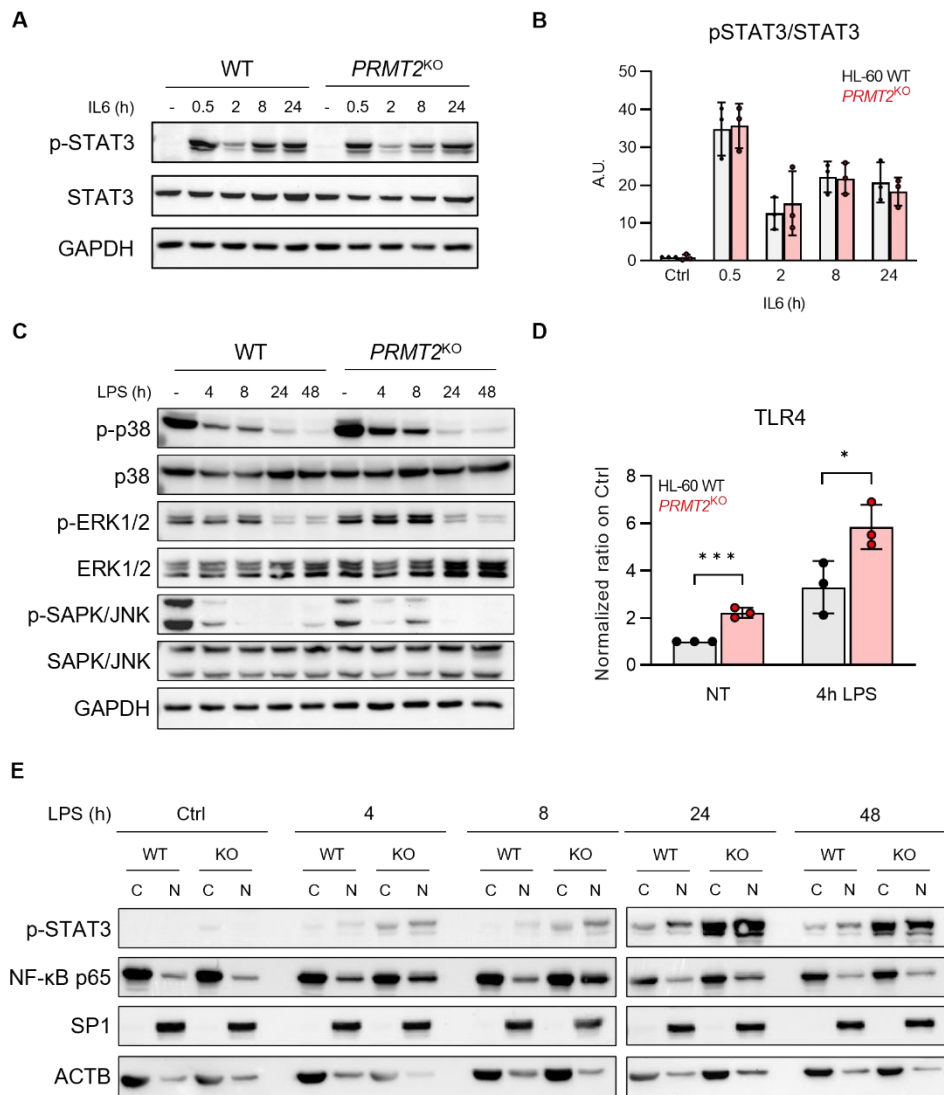


Figure 5. PRMT2 acts on the NF- κ B signaling pathway in AML. A-B. Western Blot analysis (A) and quantitation (B) of phosphorylated (Y705) and total form of STAT3 after stimulation by IL6 (40 ng/mL) during 0.5, 2, 8 or 24h, shown as mean \pm SD of three independent experiments. **C.** Western Blot analysis of phosphorylated and total form of the SAPK/JNK, ERK1/2, and P38 MAPKs on *PRMT2*^{KO} and WT cells after stimulation by 100 ng/mL LPS during 4, 8, 24 or 48h. **D.** Flow cytometry analysis for the TLR4 receptor from unstimulated or LPS-stimulated WT (grey) or *PRMT2*^{KO} HL-60 cells (red). **E.** Western Blot analysis of NF- κ B p65 and phosphorylated (Y705) STAT3 nuclear translocation after cellular fractionation of *PRMT2*^{KO} and WT HL-60 cells. SP1 and B-actin (ACTB) are nuclear and cytoplasmic controls, respectively. Ctrl: Control. All presented blots are representative figures from three independent experiments.

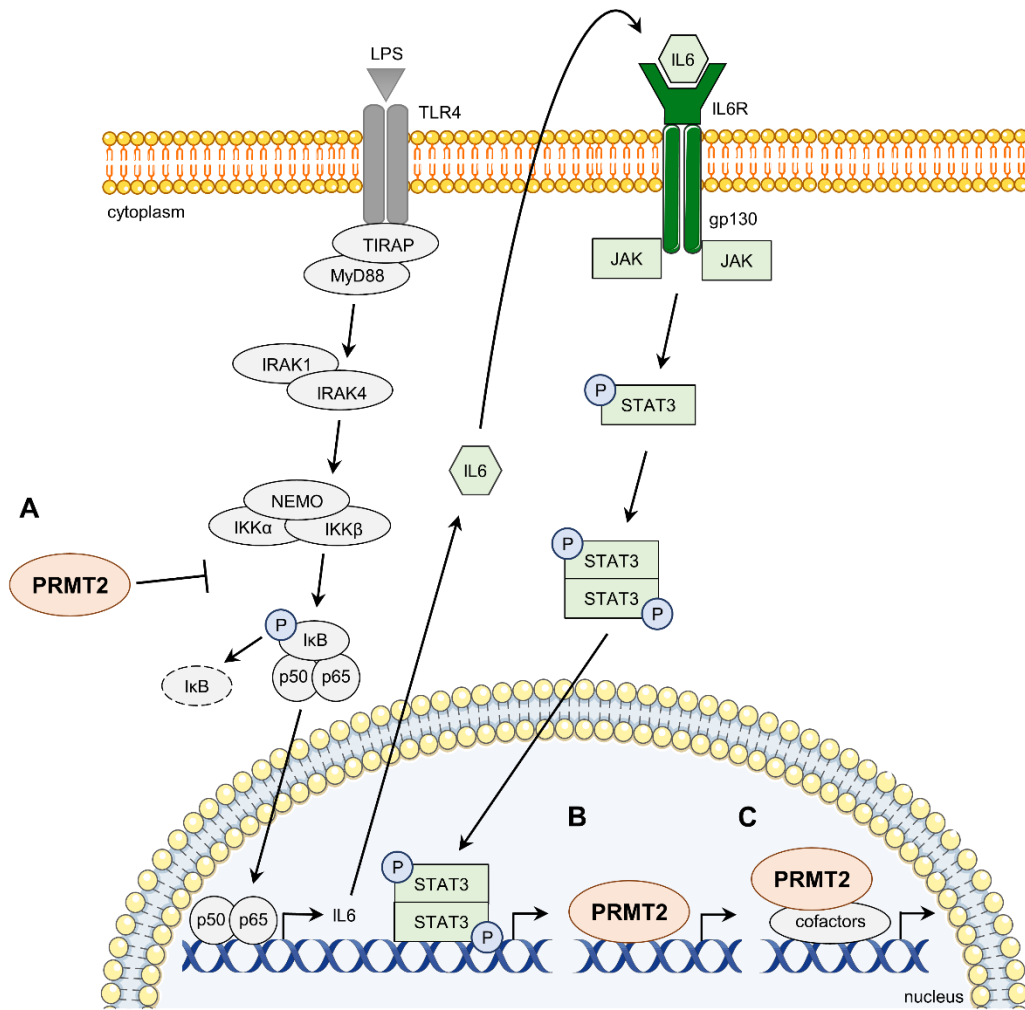


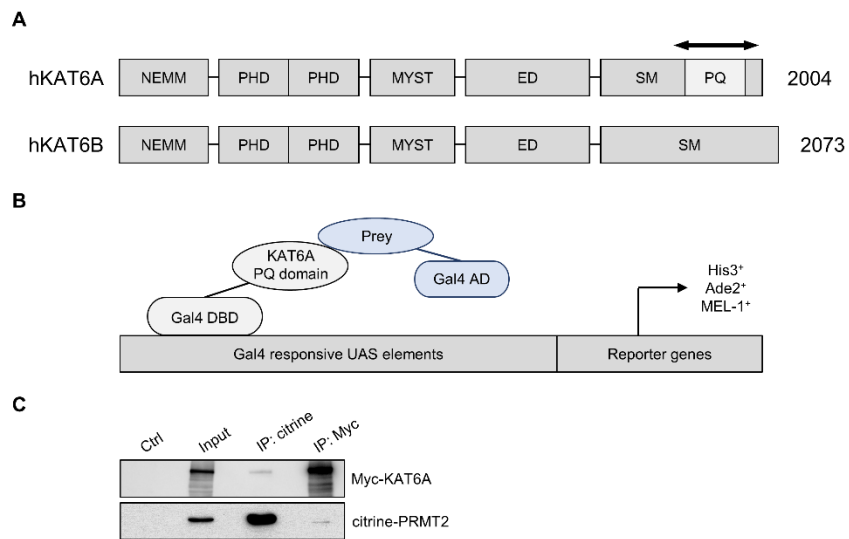
Figure 6. Putative roles of PRMT2 in the control of the inflammatory processes in a cellular model of AML. PRMT2 could act directly on the NF- κ B pathway in the cytoplasm by methylating a key factor of this signaling cascade, thus preventing its activation, leading to the sequestration of p65 in the cytoplasm (A), a decreased production of IL6 by the HL-60 cell and a decreased activation of STAT3 through the IL-6R signal. In the nucleus, PRMT2, known to have a transcriptional function, could control the transcription of genes encoding regulatory proteins of the NF- κ B pathway through the methylation of H3R8 (B) or also as a member of transcriptional cofactor complexes (C), thus leading to the same consequences on NF- κ B repression.

Table 1. Clinical characteristics of the patients from the Leucegene cohort, with the *PRMT2*^{low} and *PRMT2*^{high} groups.

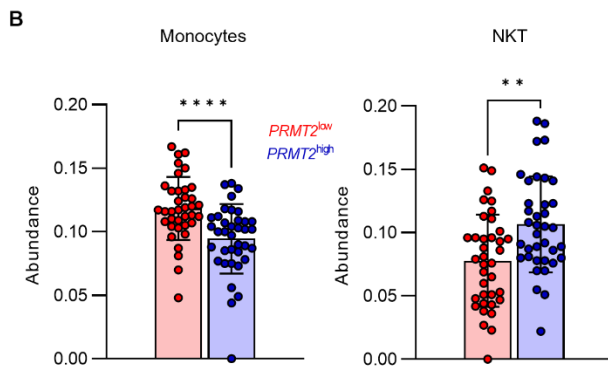
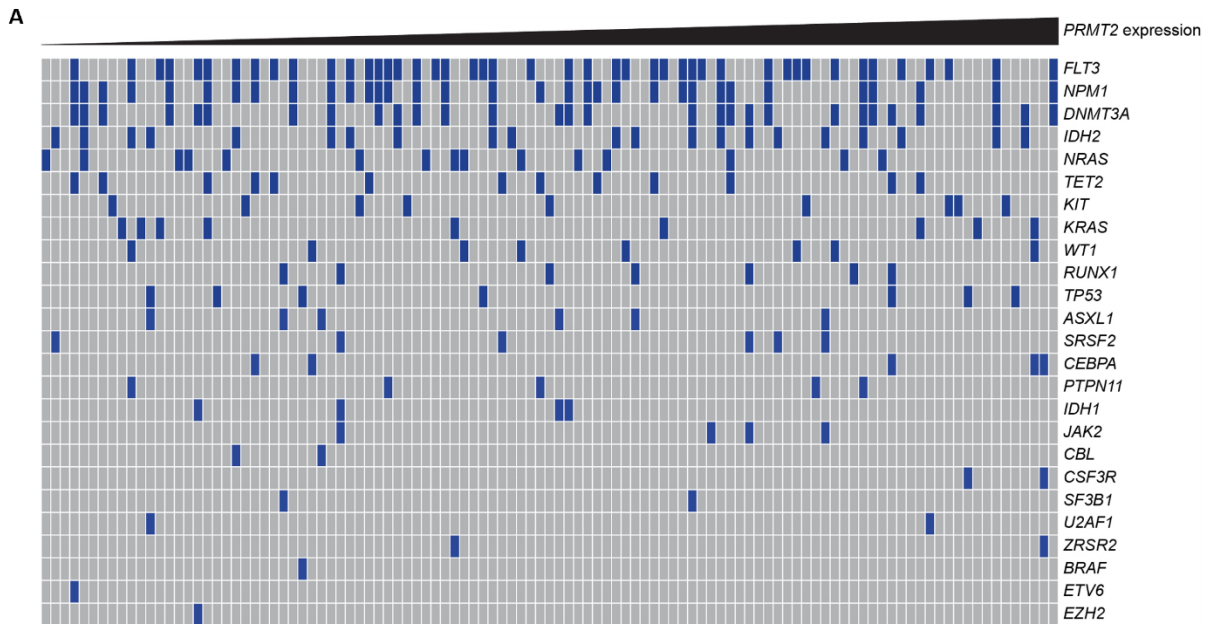
	Leucegene (n = 371)	<i>PRMT2</i> ^{low} (n = 37)	<i>PRMT2</i> ^{high} (n = 37)	Statistical significance
De novo	346 (93.3%)	36 (97.3%)	35 (94.6%)	
t-AML	25 (6.7%)	1 (2.7%)	2 (5.4%)	
Sex				
Male	210 (56.6%)	19 (51.4%)	23 (62.2%)	
Female	161 (43.4%)	18 (48.6%)	14 (37.8%)	
Age (years)				
Median	58	57	55	
Range	17-87	22-82	18-84	
WBC count (x10⁹/L)				
Median	33.2	14.5	73.4	***
Range	0.8-361.2	1.3-322.5	2.9-361.2	
Cytogenetic risk				
Favorable	46 (12.4%)	4 (10.8%)	9 (24.3%)	
Intermediate	206 (55.5%)	19 (51.4%)	22 (59.5%)	
Adverse	117 (31.5%)	14 (37.8%)	6 (16.2%)	
FAB subtype				
M0	23 (6.2%)	2 (5.4%)	4 (10.8%)	
M1	103 (27.8%)	10 (27.0%)	14 (37.8%)	
M2	50 (13.5%)	9 (24.3%)	7 (18.9%)	
M4	56 (15.1%)	4 (10.8%)	4 (10.8%)	
M5	63 (17%)	5 (13.5%)	5 (13.5%)	
M6	8 (2.2%)	1 (2.7%)	0	
M7	2 (0.5%)	0	0	
Not classifiable	66 (17.8%)	6 (16.2%)	3 (8.1%)	

WBC: White blood count

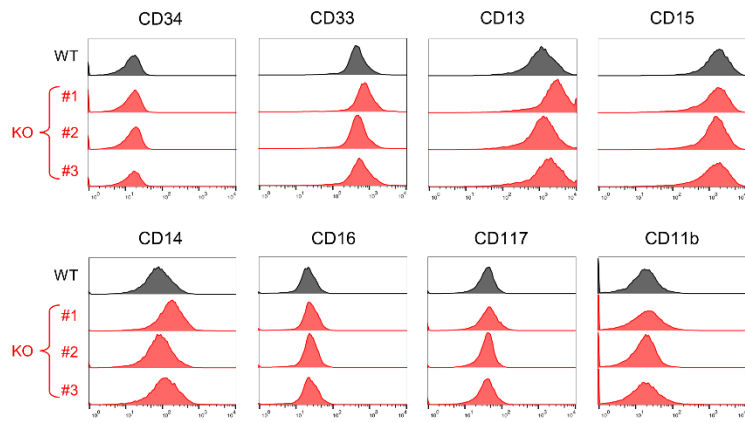
Supplementary Information



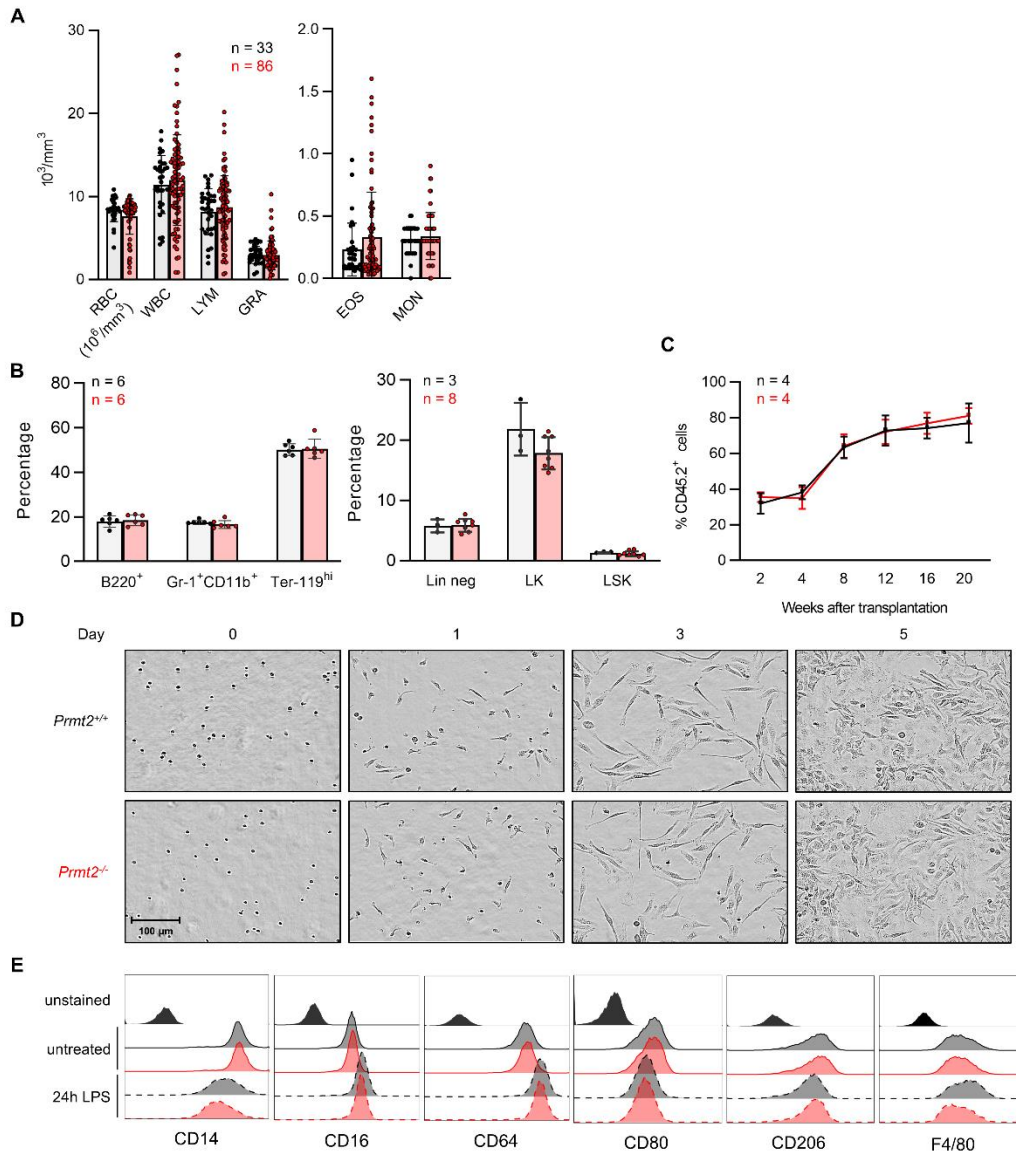
Supplemental Figure 1. PRMT2 physically interacts with KAT6A. **A.** Schematic representation of human KAT6A and KAT6B proteins with amino acid lengths. **B.** Schematic representation of the yeast two-hybrid system performed to identify PRMT2 as a partner of KAT6A. **C.** Western Blot analysis after co-transfection followed by co-immunoprecipitation of either Myc-tagged KAT6A or citrine-tagged PRMT2 protein in HEK293 cells. The input fraction represents 5% of the total protein extract. The presented blot is representative of three independent experiments.



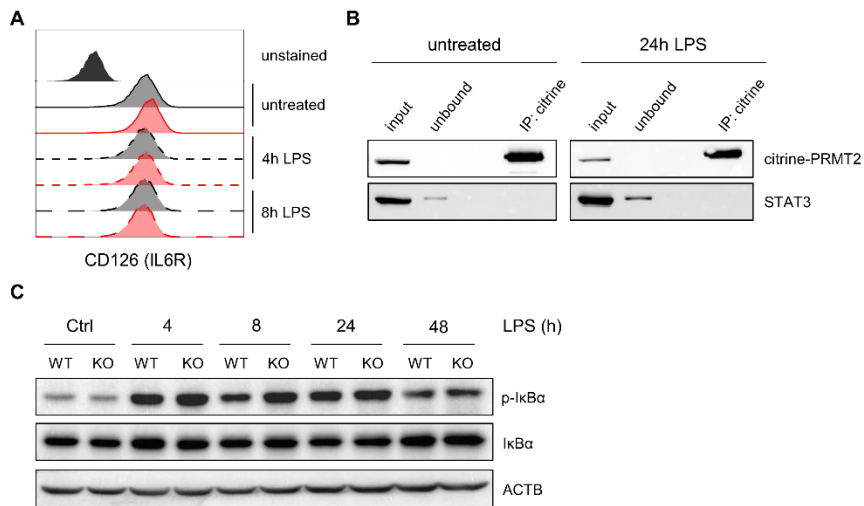
Supplemental Figure 2. **A.** Mutation profile of the 105 AML patient exomes from the Leucegene project depending on their *PRMT2* expression for a subset of frequently mutated genes in AML. Blue: mutated gene; grey: non mutated gene. **B.** Box plots from ImmuCellAI analysis showing immune cell subset abundance between *PRMT2*^{low} versus *PRMT2*^{high} subgroups. The *p* values are indicated in the graphs; ***p* < 0.01; *****p* < 0.0001.



Supplemental Figure 3. *PRMT2*^{KO} does not exhibit variations in myeloid differentiation markers compared to WT HL-60 cells. Flow cytometry analysis showing fluorescence intensity for the CD34, CD33, CD13, CD15, CD14, CD16, CD117, and CD11b surface markers on WT HL-60 and 3 different clones of *PRMT2*^{KO} cells. Cells are considered as positive if the mean fluorescence intensity is above 10².



Supplemental Figure 4. PRMT2 is dispensable in mouse hematopoiesis. **A.** Blood cell counts in *Prmt2*^{-/-} or control (*Prmt2*^{+/+}) mice. RBC: red blood cells; WBC: white blood cells; LYM: lymphocytes; GRA: granulocytes; EOS: eosinophiles; MON: monocytes. **B.** Flow cytometry analysis on BM showing percentages of B cells (B220⁺), monocytes/neutrophils (Gr-1⁺CD11b⁺), and erythroid cells (Ter-119^{hi}) (left) and lineage negative, LK and LSK (right). **C.** Flow cytometry analysis of hematopoietic reconstitution of *Prmt2*^{-/-} or control BM cells (CD45.2⁺) transplanted into recipient mice (CD45.1⁺) in competition with recipient's cells (1:1 ratio). Number of mice in each group are shown on graphs. All presented data are expressed as mean ± SD. **D.** Morphological analysis of monocytes during differentiation into macrophages. Images from phase-contrast microscopy using an Incucyte® S3 Live-Cell Analysis System at magnification x20. **E.** Flow cytometry analysis for CD14, CD16, CD64, CD80, CD206, and F4/80 surface markers from unstimulated or 24h LPS-stimulated *Prmt2*^{+/+} (grey) or *Prmt2*^{-/-} BMDMs (red). Unstained cells are shown in black as negative control. Graphs presented are representative figures from three independent experiments.



Supplemental Figure 5. **A.** Flow cytometry analysis for the IL6 receptor (CD126) from unstimulated or LPS-stimulated WT (grey) or *PRMT2*^{KO} HL-60 cells (red). Unstained cells are shown in black as negative control. **B.** Western Blot analysis of STAT3 after immunoprecipitation of citrine-PRMT2 unstimulated or 24h LPS-stimulated HL-60 cells. The input fraction represents 5% of the total protein extract. **C.** Western Blot analysis of phosphorylated (Ser32) and total form of IκBα in *PRMT2*^{KO} and WT HL-60 cells. B-Actin (ACTB) is used as loading control. All presented blots are representative of three independent experiments.

Supplementary Material and Methods

Plasmids, transfection, and retrovirus production

The Myc-MOZ vector was provided by Edward Chan (Indiana University Cancer Center, Indianapolis, IN). The pMA-citrine-PRMT2 plasmid was designed and purchased from ThermoFisher Scientific and was subcloned into a pMSCV-pgk-puro vector. For Myc-MOZ and citrine-PRMT2 co-expression assay, HEK293 cells at 80% confluence were transfected with the Myc-MOZ vector (3.5 µg) and the pMA-citrine-PRMT2 plasmid (3.5 µg), using 20 µL of a non-liposomal reagent, following the manufacturer's protocol (JetPRIME, Polypus transfection, Illkirch-Graffenstaden, France). Cells were then incubated for 24h at 37°C. For citrine-PRMT2 retrovirus production, HEK293 were transfected as previously described with 1 µg of Gag-pol, 1 µg of VSV-G, and 8 µg of pMSCV-citrine-PRMT2-pgk-puro plasmids. The medium was removed after 4h, washed with 1X PBS (Dutscher) and replaced. After 24h, the first virus-containing medium was trashed and replaced with fresh medium. Next supernatants were harvested for 4 days and kept at -80°C.

Retrovirus cell infection

The day prior infection, wells were coated with 10 µg RetroNectin (Takara bio, Kusatsu, Japan) per cm² and incubated overnight at 4°C. RetroNectin was removed, washed twice with 1X PBS and viruses were added. The plate was then centrifuged at maximum speed (around 3,000 g) for 1h at RT with the lid. After centrifugation, the supernatant was removed, rinsed with 1X PBS and the HL-60 cells were added at a concentration of 1×10⁶/mL. They were incubated for 48h at 37°C, centrifuged, and washed twice with 1X PBS to remove remaining viruses. Infection efficiency was assessed by detecting the citrine-PRMT2 protein by flow cytometry.

Immunoprecipitation

For immunoprecipitation, we followed protocols provided by the manufacturer (GFP-Trap Magnetic Particles M-270 and Myc-Trap Magnetic Agarose, Chromotek, Planegg, Germany) with some adjusting to our needs.

Briefly, 5×10^6 cells were lysed on ice for 30 min in 200 μ L ice-cold lysis buffer (10mM Tris/HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA, 0.5% NP40) supplemented with a protease inhibitor cocktail (cOmplete, Sigma-Aldrich) and a phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP, Sigma-Aldrich) with frequent homogenization. The lysates were centrifuged at 17,000 g for 10 min at 4°C. Some of the collected supernatants were used as input fractions. The remaining supernatants were incubated with 25 μ L of GFP-Trap Magnetic particles beads and rotating end-over-end for 1h at 4°C. Beads were separated using a magnet until supernatant was clear. Supernatants were discarded and 50 μ L was stored as the unbound fraction. The bead-bound materials were washed four times with 500 μ L of wash buffer (10mM Tris/HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.05% NP40, 0.5mM EDTA). The beads were eluted with 80 μ L of 2X Laemmli and boiled at 95°C for 5 min and the beads were discarded from the proteins using a magnet.

BM cell preparation

BM cells were isolated by crushing mice femora and tibiae using 1X PBS supplemented with 2% FBS and filtered through a 70 μ m mesh. Blood from control and *Prmt2*^{-/-} mice was collected from the lateral tail vein using EDTA-coated tubes (BD Microtainer, BD Biosciences). Complete blood counts were performed using an automated hematology analyzer (Scil Vet abc Plus+, Scil animal care company, Altorf, France).

BM competitive reconstitution

Prmt2^{-/-}, *Prmt2*^{+/+} and *Ly5.1*⁺ (*CD45.1*⁺) mice were euthanized and BMs were harvested as previously described. Five BM cell preparations were made at a concentration of 4×10^6 /mL: only *Ly5.1*⁺ cells; only *Prmt2*^{-/-} cells; only *Prmt2*^{+/+} cells; half *Ly5.1*⁺, half *Prmt2*^{-/-} cells; half *Ly5.1*⁺; half *Prmt2*^{+/+} cells.

For each preparation, five sub-lethally irradiated (9 Gy) *Ly5.1*⁺ mice were transplanted with 0.8×10^6 cells. Every two weeks after the transplantation, three drops of blood were collected from the tail vein in an EDTA-coated tube. Red blood cells were lysed (10X RBC lysis buffer: 155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃, 0.1 mM EDTA) 10 min at 4°C and cells were centrifuged at 300 g for 5 min.

Flow cytometry

Anti-human CD126-PE (BD Biosciences, 561696) and anti-mouse Lineage-APC (BD Biosciences, 558074), c-Kit-BV510 (BioLegend, 135119), Sca-1-PE-Cy7 antibody (eBioscience, 25-5981-82), CD11b-PE-Cy7 (BD Biosciences, 552850), Gr-1-FITC (BD Biosciences, 553127), Ter119-V500 (BD Biosciences, 562120), B220-AF700 (BioLegend, 103232), and CD71-APC antibodies (BioLegend, 113820), CD80-APC-Vio770 (Miltenyi, 130-116-463), CD14-PE-Cy7 (BioLegend, 123316), CD16-FITC (BD Biosciences, 553144), CD64-PE (Miltenyi, 130-103-808), CD206-APC (BioLegend, 141708), F4/80-BV421 (BD Biosciences, 565411), *Ly5.1*-eFluor450 (Invitrogen, 48-0453-82), and *Ly5.2*-APC (BioLegend, 109814) antibodies were used.

Analysis of the HL-60 immunophenotype was performed by the flow cytometry platform of the Department of Hematology Biology (University Hospital Dijon Bourgogne François-Mitterrand). Cell samples were processed in a “lysis-no wash” protocol. Sample acquisition was performed using a Navios® (Beckman-Coulter, Brea, CA) flow cytometer. Two different panels were analyzed: AML10A: CD15-FITC, CD14-PE, CD13-PECF594, CD33-PC5.5, CD34-PC7, CD117-APC, CD7-AA700, CD11b-AA750, CD16 BV421, CD45-KO and AML10B: CD64-FITC, CD10-PE, CD4-PECF594, CD33-PC5.5, CD34-PC7, CD123-APC, CD56-AA700, CD19-AA750, CD38-BV421, CD45-KO.

III. Résultats supplémentaires

A. Étude du rôle de PRMT2 sur l'inflammation *in vivo*

Afin d'étudier l'effet de l'absence de PRMT2 *in vivo* sur les processus inflammatoires, nous avons réalisé des expériences d'injections intrapéritonéales de LPS dans des souris WT et *Prmt2*^{-/-}, puis diverses analyses sanguines ont été effectuées. Des numérations et formules sanguines ont permis d'étudier les changements opérés au sein des populations sanguines lors d'un déclenchement des voies inflammatoires chez ces souris. L'absence de PRMT2 n'affecte ni les proportions d'érythrocytes ni de leucocytes, en particulier aucune différence n'a été détectée dans le nombre de lymphocytes circulants (**Figure 29A-C**). Néanmoins, il est à noter la grande variabilité interindividuelle observée. En effet, chaque souris semble répondre différemment au stress créé par l'injection de LPS au niveau des concentrations en leucocytes. En raison de cette variabilité statistique, il est difficile d'établir une conclusion sur la mesure des concentrations de cytokines pro-inflammatoires plasmatiques (**Figure 29D-E**). C'est pour cette raison que nous avons développé le modèle de BMDM décrit dans l'article.

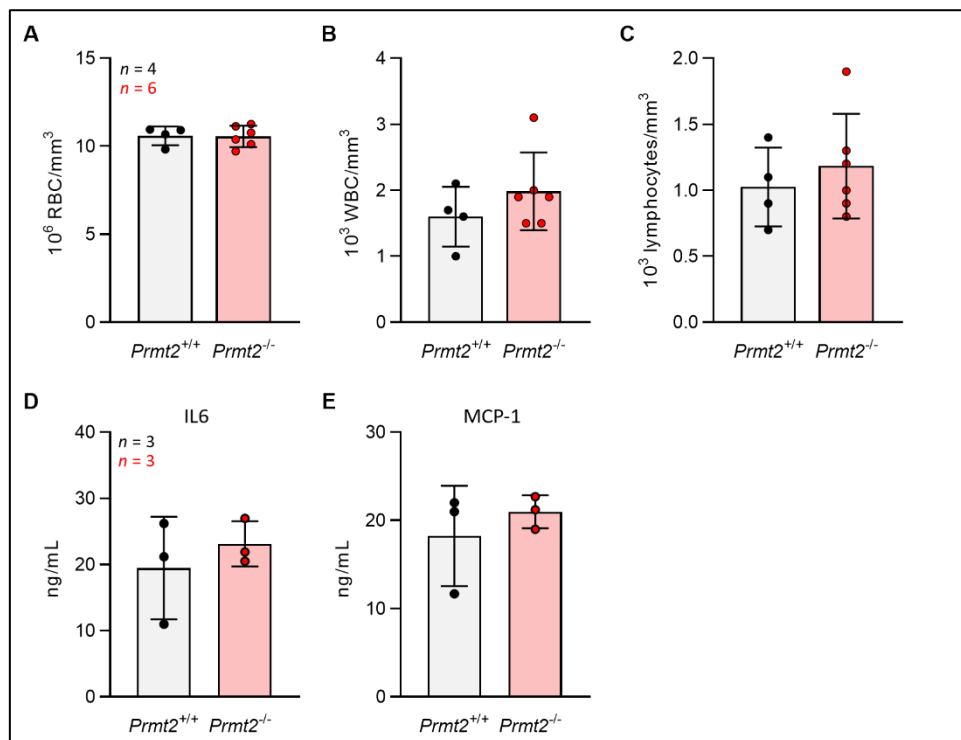


Figure 29. Injections de LPS *in vivo*. A-C. Numération et formule sanguine afin de quantifier les érythrocytes (RBC) (A), les leucocytes (WBC) (B) et en particulier les lymphocytes (C) de souris WT ou *Prmt2*^{-/-} 4h après une injection intrapéritonéale de LPS (1 mg/kg). D-E. Quantification par CBA (Cytometric Bead Assay) de l'IL6 (D) et de MCP-1 (E) dans le plasma des souris 4h après une injection intrapéritonéale de LPS (2 mg/kg).

B. Lien entre PRMT2 et inflammation dans différentes cohortes de patients atteints de LAM

Nous avons eu accès à des échantillons d'ARN de patients atteints de LAM grâce au Centre des Ressources Biologiques (CRB) du CHU François-Mitterrand de Dijon. L'expression de *PRMT2* de ces patients a été mesurée et il apparaît, tout comme cela a été montré dans la cohorte québécoise *The Leucegene Project*, que celle-ci est hétérogène entre les individus (**Figure 30A**). L'analyse par GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) réalisée sur la cohorte de Montréal a révélé que l'expression du gène codant pour la protéine ING4 (*Inhibitor of Growth protein 4*) est un des gènes les plus significativement impacté par la modulation de l'expression de *PRMT2*. En effet, nous avons découvert que les expressions de *PRMT2* et *ING4* sont positivement corrélées chez les 371 patients de *The Leucegene Project* et nous avons confirmé cette corrélation dans les échantillons de patients obtenus *via* le CRB de Dijon (**Figure 30B-C**).

ING4 est connue comme étant un cofacteur des complexes d'histone acétyltransférases et désacétylases et il a été récemment montré qu'elle module négativement la réponse inflammatoire *via* une interaction avec SIRT1 (sirtuine-1). En effet, SIRT1 est capable d'inhiber la voie NF- κ B en désacétylant la lysine 310 de la sous-unité p65 [292]. De plus, cette protéine est connue comme un suppresseur de tumeurs [293], elle peut notamment supprimer la croissance et les métastases de CHC humain par le biais de la voie de signalisation NF- κ B/miR-155/FOXO3a [294].

Comme décrit dans l'article, l'analyse par GSEA des 10% des patients de *The Leucegene Project* présentant les plus faibles expressions de *PRMT2* (n = 37) comparé aux 10% les plus élevées a révélé la voie inflammatoire comme étant surreprésentée chez les patients atteints d'une LAM présentant de faibles expressions de *PRMT2*. En effet, l'expression de gènes liés à la voie NF- κ B est plus importante chez les patients *PRMT2*^{low} que chez les patients *PRMT2*^{high}. De façon intéressante, nous avons confirmé cette différence chez les 10% des patients présentant les plus faibles expressions de *PRMT2* (n = 30) comparé aux 10% les plus élevées dans une autre cohorte de patients atteints de LAM appelée *BeatAML* (**Figure 30D-E**) [295].

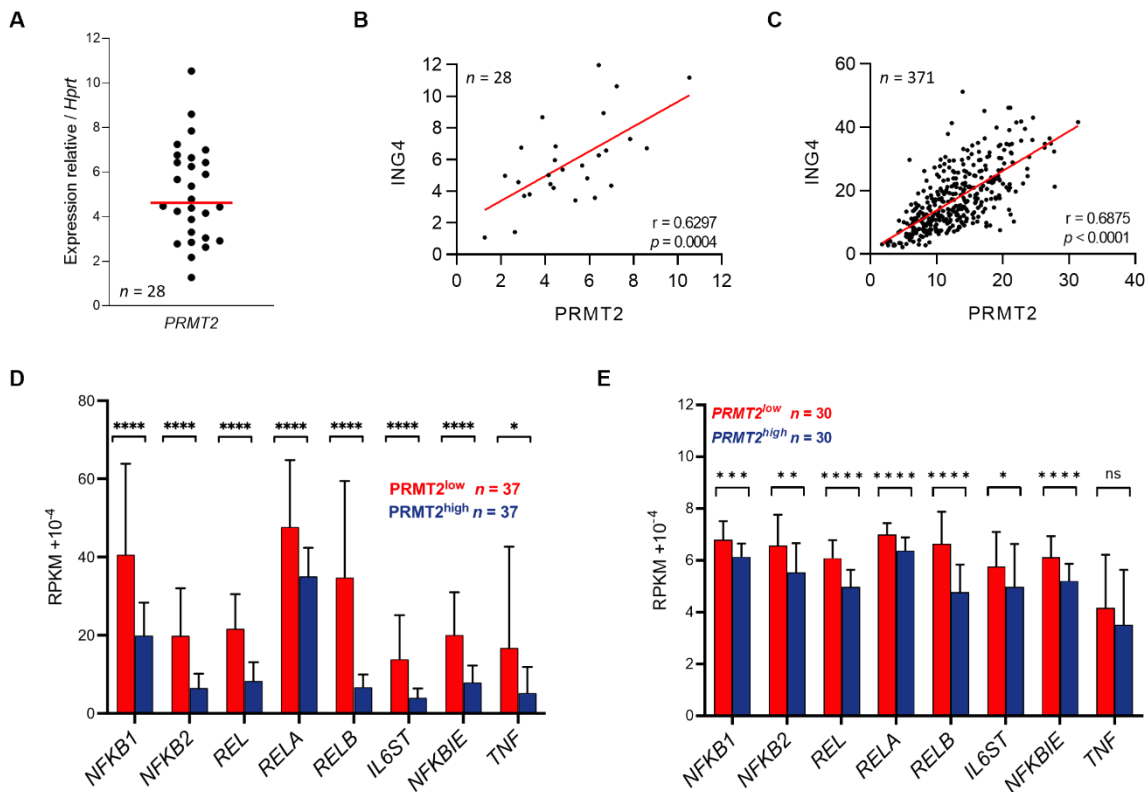


Figure 30. Expression de *PRMT2* et de divers gènes liés à NF- κ B dans différentes cohortes de patients atteints de LAM. A. Expression du gène *PRMT2* dans les échantillons de patients obtenus auprès du CRB de Dijon. B-C. Corrélation entre les expressions de *PRMT2* et *ING4* dans les échantillons de patients obtenus auprès du CRB de Dijon (B) et de la cohorte *The Leucegene Project* (C). D-E. Expression de différents gènes codant des protéines impliquées dans la voie NF- κ B dans les cohortes *The Leucegene Project* (D) et *BeatAML* (E).

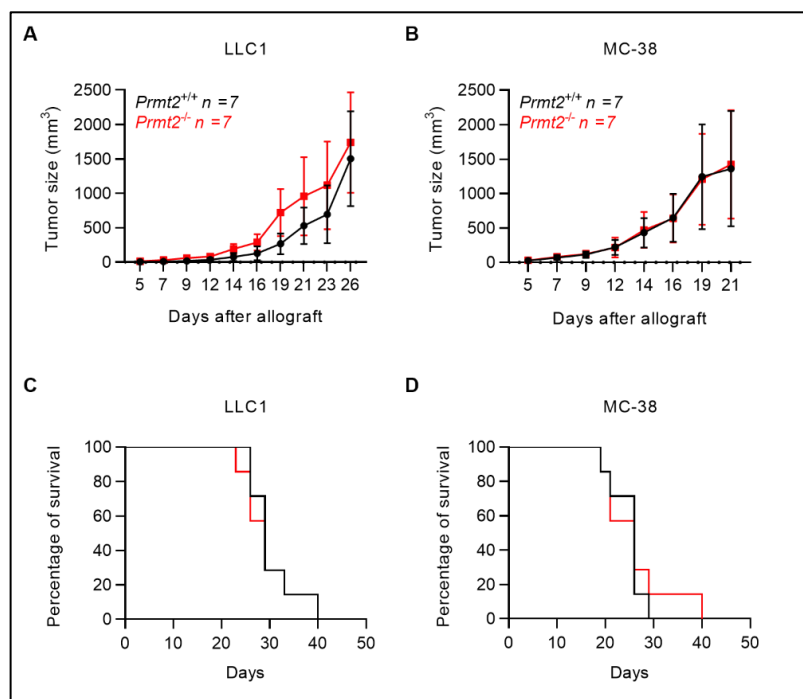
C. Rôle de *PRMT2* dans le microenvironnement tumoral

Un autre objectif de ce travail a été de déterminer le rôle de *PRMT2* au sein du microenvironnement tumoral ainsi que d'étudier son impact selon le degré d'infiltration des tumeurs. À cette fin, une collaboration avec le Dr Émeric Limagne (Centre Georges François Leclerc, le Centre de lutte contre le cancer de Dijon) a été initiée. Des souris WT et *Prmt2*^{-/-} ont été allogreffées de façon sous-cutanée avec l'un des deux modèles de tumeurs LLC1 ou MC38.

La lignée cellulaire LLC1 provient du poumon d'une souris ayant été greffée avec un carcinome pulmonaire primaire. Cette lignée est souvent utilisée comme modèle de métastases car elle présente *in vivo* une forte tumorigénicité. Cette lignée représente un modèle de tumeur dit « froid » caractérisé par une faible infiltration de cellules effectrices, de faibles niveaux de CMH de classe I ainsi qu'une insensibilité aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI pour *Immune Checkpoint Inhibitors*) [296].

La lignée MC-38, quant à elle, est dérivée d'un carcinome du côlon murin et, contrairement aux cellules LLC1, est sensible aux traitements par des ICI et présente une forte population de TIL (*Tumor-Infiltrating Lymphocytes*, pour lymphocytes infiltrant la tumeur), ce qui lui vaut le terme de tumeur « chaude ». Du fait de son rôle de régulateur des voies produisant les cytokines pro-inflammatoires, nous avons émis l'hypothèse que PRMT2 pourrait contrôler le microenvironnement tumoral, notamment dans les tumeurs hautement infiltrées en lymphocytes et autres cellules immunitaires telles que les tumeurs chaudes provenant de la lignée MC-38. Dans les tumeurs peu infiltrées telles que les tumeurs froides provenant de la lignée LLC1, le rôle de PRMT2 pourrait être plus limité du fait de l'absence d'une proportion importante de cellules liées à l'immunité.

Il apparaît néanmoins que l'absence de PRMT2 ne compromet pas le développement des tumeurs, quel que soit le modèle étudié. En effet, la taille des tumeurs qui se sont développées dans des souris *Prmt2*^{-/-} ne diffère pas significativement des souris WT. Néanmoins, une différence est visible sans être significative dans le modèle LLC1. En effet, les souris *Prmt2*^{-/-} présentent des tumeurs de taille légèrement plus importante (**Figure 31A-B**). La survie des souris greffées n'est affectée par l'absence de PRMT2 ni dans le modèle LLC1 ni dans le modèle MC-38 (**Figure 31C-D**). PRMT2 ne semble donc pas indispensable au sein du microenvironnement tumoral, à la fois dans les tumeurs pulmonaires froides et dans les carcinomes du côlon fortement infiltrés en cellules immunitaires.



D. Identification de nouveaux partenaires protéiques de PRMT2

Un autre objectif de cette étude est l'identification de nouveaux partenaires protéiques dont des substrats de PRMT2 dans un modèle de LAM. Dans ce but, une collaboration a été initiée avec la plateforme Protéomique Strasbourg Grand Est (ProFI Strasbourg, Université de Strasbourg) dirigée par le Dr Sarah Cianferani (Institut pluridisciplinaire Hubert Curien, CNRS/Université de Strasbourg, Strasbourg). Tout d'abord, une mise au point de la procédure expérimentale a été réalisée dans des HEK293 surexprimant de façon stable la protéine de fusion citrine-PRMT2. Ces cellules ont été envoyées en spectrométrie de masse *label-free* (sans marquage) après avoir été immunoprécipitées grâce au *tag* citrine.

Par la suite, le modèle HL-60 surexprimant de façon stable la protéine de fusion citrine-PRMT2 a été utilisé. Du LPS est ajouté aux cellules durant quatre heures afin de stimuler un phénotype inflammatoire. Des cellules non stimulées sont utilisées en tant que contrôle. La protéine de fusion est ensuite immunoprécipitée et les échantillons (cinq répétitions de chaque condition) sont envoyés en spectrométrie de masse comme décrit précédemment. Une lignée HL-60 exprimant la protéine citrine seule a été créée et sert de condition contrôle pour les analyses. En effet, ce modèle permet de discerner les protéines interagissant avec PRMT2 de celles pouvant interagir avec la citrine, car cette dernière possède une masse moléculaire importante (27 kDa, soit la moitié de celle de PRMT2).

Des protéines interagissant avec PRMT2 à la fois dans la condition non traitée et dans la condition traitée au LPS ont été identifiées et analysées. Ces protéines ne sont pas retrouvées dans les cellules exprimant uniquement la citrine, afin de valider une interaction spécifique à PRMT2. Au total, 211 protéines ont été identifiées comme enrichies dans les cellules citrine-PRMT2 non traitées, comparé aux cellules exprimant la citrine, contre 142 dans les cellules traitées au LPS comparé aux cellules exprimant la citrine dans les mêmes conditions. Néanmoins, seules 83 protéines sont communes à ces deux analyses, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'interagir avec PRMT2 en présence mais également en absence de stimulation par le LPS (**Figure 32**).

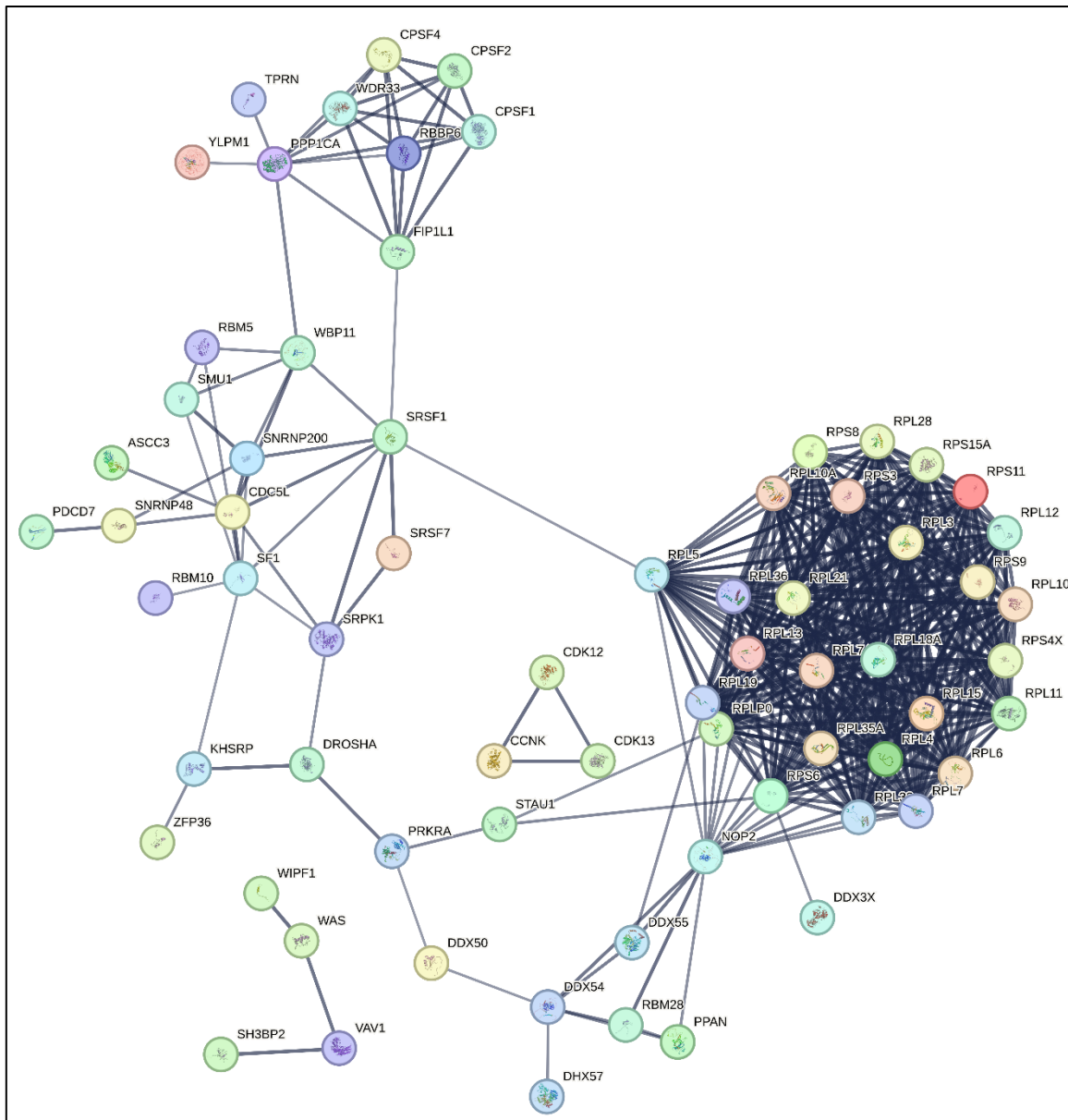


Figure 32. Protéines interagissant avec la protéine de fusion citrine-PRMT2. Protéines présentes à la fois dans les échantillons en absence et en présence de stimulation par du LPS pendant 4h. Les protéines déconnectées de toutes les autres n'apparaissent pas. L'épaisseur des lignes de connexion représente la robustesse des données d'interaction (seuil de confiance : 0,7). Figure réalisée à l'aide du logiciel STRING.

Les processus biologiques dans lesquels PRMT2 semble la plus impliquée sont la prise en charge des ARN messagers pour leur clivage nécessaire à leur polyadénylation (numéro d'accèsion *Gene Ontology* GO:0098789), l'assemblage des larges sous-unités ribosomales (GO:0000027) et leur biogenèse (GO:0042273), ainsi que les processus de traduction dans le cytoplasme (GO:0002181). Les cyclines CCNK, CDK12 et CDK13 interagissent également avec PRMT2 et celles-ci sont impliquées dans la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II.

Deux des protéines les plus représentées dans les échantillons traités ou non avec du LPS sont WAS (*Wiskott-Aldrich Syndrome protein*) et WIPF1 (*WAS/WASL-interacting protein family member 1*). Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) est une maladie rare liée au chromosome X, caractérisée par un ensemble de symptômes dont la microthrombocytopénie, l'eczéma et l'immunodéficience. La protéine WAS est exprimée uniquement dans les cellules hématopoïétiques, et est une protéine régulatrice du cytosquelette d'actine cytoplasmique aux fonctions diverses. La protéine WIPF1 quant à elle est capable d'interagir avec WAS, il est donc possible qu'un complexe WAS/WIPF1/PRMT2 puisse se former dans les cellules HL-60.

Une deuxième analyse sur ces mêmes échantillons a permis d'identifier précisément les peptides appartenant à des protéines interagissant avec PRMT2 et portant un groupement méthyle (**Tableau 6**). De façon notable, peu de protéines semblent méthylées lorsqu'elles interagissent avec PRMT2, ce qui étaye les analyses précédemment réalisées sur notre protéine d'intérêt, montrant qu'il s'agit d'un membre catalytiquement peu actif comparé aux autres PRMT. De façon intéressante, les protéines WAS et WIPF1 présentent des peptides méthylés et pourraient donc correspondre à de nouveaux substrats de PRMT2 dans les LAM.

Tableau 6. Liste des protéines méthylées interagissant avec PRMT2. Ces protéines sont retrouvées à la fois dans les échantillons de cellules HL-60 citrine-PRMT2 et HL-60 citrine-PRMT2 traitées au LPS pendant 4h.

Identifiant UniProt	Nom de la protéine	Modification (résidu modifié)
A6NMY6	ANXA2P2 (<i>Putative annexin A2-like protein</i>)	Methyl (R63)
O43516	WIPF1 (<i>WAS/WASL-interacting protein family member 1</i>)	Methyl (R393, R211)
P11940	PABPC1 (<i>Polyadenylate-binding protein 1</i>)	Oxidation (M490) ; Methyl (R493, R506)
P14678	SNRPB (<i>Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'</i>)	Oxidation (M142) ; Methyl (R108, R147)
P22090	RS4Y1 (<i>Small ribosomal subunit protein eS4, Y isoform 1</i>)	Carbamidomethyl (C41) ; Methyl (R49)
P22626	HNRNPA2B1 (<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>)	Methyl (R213)
P42768	WAS (<i>Actin nucleation-promoting factor WAS</i>)	Methyl (R338)
P49750	YLPM1 (<i>YLP motif-containing protein 1</i>)	Methyl (R831)
P51991	HNRNPA3 (<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i>)	Methyl (R52)
P68363	TUBA1B (<i>Tubulin alpha-1B chain</i>)	Methyl (R79)
Q13435	SF3B2 (<i>Splicing factor 3B subunit 2</i>)	Methyl (R245)
Q6Y7W6	GIGYF2 (<i>GRB10-interacting GYF protein 2</i>)	Methyl (R149)
Q9C0J8	WDR33 (<i>pre-mRNA 3' end processing protein WDR33</i>)	Methyl (R915)

Contrairement à nos attentes, ces analyses n'ont mis en évidence aucune protéine impliquée directement dans les voies de l'inflammation, ni dans la voie de signalisation NF- κ B. Le rôle de PRMT2 dans ces voies pourrait être plus indirect, notamment *via* la méthylation d'un facteur influençant celles-ci, ou bien la méthylation des queues d'histones afin de moduler la transcription de gènes codant pour ces facteurs. PRMT2 pourrait méthyler des facteurs de co-activation ou de co-répression de la transcription. De plus, nos analyses de l'interactome de PRMT2 ont été réalisées avec une protéine de fusion citrine-PRMT2 surexprimée dans les cellules de LAM. La présence de la citrine pourrait fausser ou même empêcher certaines interactions qui auraient lieu avec la protéine endogène, du fait d'une conformation tridimensionnelle modifiée. Des modèles de LAM exprimant les protéines de fusion FLAG-PRMT2 et HA-PRMT2 portant des étiquettes de moindre taille, sont en cours de développement.

E. Recherche du rôle précis de PRMT2 sur la voie NF- κ B

Afin de confirmer que PRMT2 est essentielle dans le contrôle de la voie NF- κ B, nous avons analysé l'expression de la forme active phosphorylée d'I κ B α (*NF- κ B inhibitor alpha*) en présence ou non de BAY11-7082, molécule capable d'inhiber cette phosphorylation. De façon intéressante, les cellules *PRMT2*^{KO} traitées avec du LPS et l'inhibiteur montrent la même extinction de phosphorylation que les cellules WT, alors même que leur niveau de phosphorylation d'I κ B α était plus important lorsque traitées avec du LPS uniquement (**Figure 33A-B**).

Nous nous sommes ensuite intéressés à une protéine située plus en amont dans la voie NF- κ B : TAK1 (*Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase 1*). Lorsqu'elle est activée par phosphorylation, cette kinase est responsable de la phosphorylation d'IKK (*I-kappa-B kinase*), enzyme phosphorylant I κ B α , entraînant de ce fait son activation. Il apparaît que le niveau d'expression protéique de la forme phosphorylée de TAK1 est plus élevé dans les cellules HL-60 *PRMT2*^{KO} en réponse à une stimulation par du LPS (**Figure 33C-D**). Néanmoins, les résultats présentés ont été réalisés dans le cadre du stage de Master 2 recherche de Thomas Morin et doivent être confirmés.

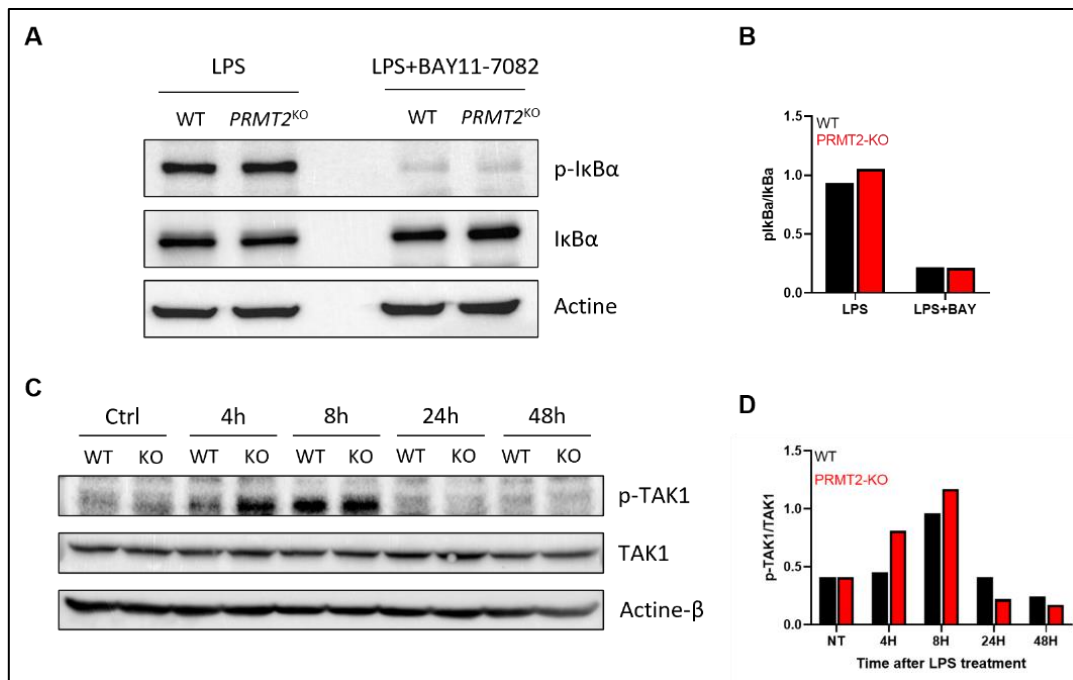


Figure 33. Étude du rôle de PRMT2 sur la voie NF- κ B. A-B. Analyse par Western Blot (A) et quantification (B) des expressions protéiques de la forme totale et phosphorylée d'I κ B α après stimulation par du LPS (100 ng/mL) durant 2h en présence ou non d'un inhibiteur de la voie NF- κ B, le BAY11-7082 (5 μ M). C-D. Analyses par Western Blot (C) et quantification (D) des expressions protéiques des formes totale et phosphorylée de TAK1 dans des cellules WT ou PRMT2^{KO} après stimulation par du LPS (100 ng/mL).

DISCUSSION

I. Résumé des résultats

L'ensemble des résultats issus de ce travail de recherche indique que PRMT2 contribue de façon majeure dans le contrôle de l'inflammation dans les LAM. En effet, nous avons constaté par analyse GSEA sur des données de RNA-seq que les cellules de LAM dépourvues de PRMT2 présentent une signature pro-inflammatoire marquée. Les BMDM murins *Prmt2*^{-/-} stimulées par le LPS montrent une augmentation de l'expression et de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL6 et TNF α , ce qui indique que PRMT2 est également impliquée dans la réponse inflammatoire dans l'hématopoïèse normale. En accord avec les données obtenues sur les modèles cellulaires, nous avons observé que les patients adultes atteints de LAM avec une faible expression de *PRMT2* développent une activation accrue des signatures inflammatoires par rapport aux patients avec une plus forte expression de *PRMT2*.

En outre, nous avons démontré que les cellules de LAM dépourvues de PRMT2 présentent une activation plus importante de la voie de signalisation NF- κ B après une stimulation par du LPS. Cette activation conduit à une surexpression d'IL6 et finalement à une phosphorylation plus importante de la protéine STAT3 (signe de son activation). Nous avons également observé une expression plus importante du récepteur au LPS, le TLR4, dans les cellules n'exprimant pas PRMT2. Une étude plus approfondie de la voie NF- κ B pourrait permettre l'identification de TAK1 comme étant potentiellement une cible de PRMT2.

Nous avons également montré avec les modèles utilisés, qu'un microenvironnement tumoral déplété de PRMT2 n'a pas d'incidence sur le développement de cancers par rapport à un environnement normal, que ce soit dans des modèles de tumeurs faiblement ou fortement infiltrées en cellules immunitaires.

Enfin, une analyse de l'interactome de PRMT2, réalisée par spectrométrie de masse, révèle une implication de cette protéine dans les mécanismes de prise en charge et de modification des ARN messagers, la création des unités ribosomales et les processus de traduction. Il reste à confirmer les interactions avec PRMT2 et à distinguer ses partenaires protéiques substrats ou non.

II. Importance de l'inflammation dans les LAM

À travers la présente étude, nous démontrons pour la première fois que l'absence ou la faible expression de PRMT2 entraîne une suractivation des mécanismes inflammatoires dans les LAM. L'inflammation représente l'une des caractéristiques du cancer et est associée à de nombreux types de tumeurs malignes solides, où elle est souvent associée à un microenvironnement immunitaire unique et peut affecter la réponse aux immunothérapies ainsi que le pronostic du patient [297]. De plus, il a été montré que l'inflammation est étroitement liée à la transformation des MDS en LAM [298]. La LAM étant une hémopathie maligne prévalant principalement chez les personnes âgées, l'inflammation liée au vieillissement pourrait contribuer à son développement.

A. Les cytokines inflammatoires dans les LAM

Des travaux récents ont identifié un sous-ensemble de patients atteints de LAM, adultes et pédiatriques, exprimant des niveaux élevés de gènes pro-inflammatoires dans les cellules leucémiques. En outre, la caractérisation du microenvironnement immunitaire médullaire démontre un remodelage distinct de la moelle en réponse à l'inflammation provoquée par la LAM, mettant en évidence des populations spécifiques de lymphocytes B et T qui sont développées chez les patients avec un phénotype pro-inflammatoire prononcé [299].

L'équipe de Christian Récher a montré que la majorité des patients atteints de LAM présentaient des concentrations élevées de ferritine sérique au moment du diagnostic. Cette augmentation de la concentration de ferritine sérique, résultant de l'inflammation, a un impact direct sur la progression de la maladie ainsi que sur la réponse au traitement. Elle constitue donc un facteur pronostique indépendant dans les LAM. Cette équipe émet l'hypothèse que l'expression de la ferritine induite par les cytokines inflammatoires pourrait participer à une boucle de rétroaction positive soutenant l'activation de NF- κ B dans les cellules de LAM, essentielle pour la chimiorésistance et la survie des CSL [300]. Nos résultats semblent conforter cette hypothèse. En effet, les patients *PRMT2*^{low} arborant une forte signature inflammatoire présentent une expression accrue des gènes codant pour les chaînes lourde (*FTH1*) et légère (*FTL*) de la ferritine.

Il est admis depuis la fin du siècle dernier que la signalisation aberrante des cytokines et des facteurs de croissance est une caractéristique majeure de toutes les leucémies et contribue à la prolifération, à la survie, à l'auto-renouvellement et à la résistance aux chimiothérapies [301]. Parmi les cytokines dont l'expression est aberrante et qui représentent des facteurs de mauvais pronostic dans les LAM, sont retrouvées majoritairement l'IL1 β , l'IL6 et le TNF α .

Les niveaux d'IL1 β et de son récepteur sont augmentés chez les patients atteints de LAM, et l'inhibition du récepteur de l'IL1 entraîne une suppression significative de la clonogénicité et de la progression de la maladie. À l'inverse, un traitement avec de l'IL1 β favorise la croissance des cellules de LAM en augmentant la phosphorylation de la MAPK p38 et en favorisant la sécrétion de divers autres facteurs de croissance et cytokines pro-inflammatoires [302].

Bien que le TNF α puisse être lié à la promotion ou à l'inhibition de la progression des cancers [303], il a été montré que des concentrations de TNF α plus élevées sont associées à des taux de rémission complète plus faibles chez des patients atteints de LAM (sans traitement) et de MDS à haut risque [304]. L'IL6 est quant à elle considérée comme une cytokine pro-inflammatoire critique, impliquée dans les voies de régulation de l'inflammation, du contrôle immunitaire [305] et dans la progression des cancers [306,307]. De nombreux travaux ont démontré qu'une surexpression de l'IL6 est détectée chez des patients atteints d'une LAM, celle-ci étant corrélée à un pronostic plus défavorable et à une résistance thérapeutique [308–311]. Ces deux cytokines pro-inflammatoires sont retrouvées en quantités plus importantes chez les patients *PRMT2*^{low} ainsi que dans notre modèle cellulaire de LAM (HL-60) déplété de *PRMT2*, confirmant donc le rôle protecteur de *PRMT2* contre l'inflammation dans cette pathologie. L'amplification du signal IL6 est un mécanisme d'amplification de sa production et d'une variété d'autres cytokines et chimiokines, par le biais d'une interaction activatrice synergique entre STAT3 et NF- κ B. Elle représente un élément majeur dans les maladies inflammatoires, y compris les syndromes de tempête cytokinique, les maladies auto-immunes et le cancer, ce qui établit un lien solide entre STAT3 et NF- κ B dans ces pathologies [312].

Il est intéressant de noter que les cellules mésenchymateuses peuvent également induire une chimiorésistance dans la LAM grâce à l'activation de la voie IL6/STAT3 [313], mais le mécanisme moléculaire impliqué n'est à ce jour pas encore clairement établi. Nos résultats appuient ces découvertes en mettant au jour le lien entre la signalisation exacerbée de STAT3 avec une forte inflammation en absence de PRMT2.

B. Thérapeutique anti-inflammatoire dans le traitement des LAM

De ce travail de thèse émerge un rôle de PRMT2 dans la modulation de la réponse inflammatoire dans les LAM, particulièrement importante pour le pronostic et la réponse thérapeutique. La dexaméthasone est un médicament anti-inflammatoire largement utilisé dans les LAL et d'autres tumeurs lymphoïdes. Beaucoup moins fréquemment utilisé dans les hémopathies myéloïdes, ce médicament est souvent proposé pour prévenir ou traiter un état inflammatoire grave, appelé syndrome de différenciation, chez les patients atteints d'une LAP et traités avec de l'ATRA et/ou du trioxyde d'arsenic. Le rôle central de la réponse inflammatoire dans la leucémogénèse a incité l'équipe de Christian Récher à évaluer l'impact de la dexaméthasone dans le contexte des LAM.

Dans une étude pré-clinique comprenant 160 patients hyperleucocytaires, l'utilisation de la dexaméthasone améliore l'incidence des rechutes, la survie sans maladie, la survie sans événement et la survie globale. Dans un système de co-culture, la dexaméthasone réduit le nombre de cellules leucémiques et renforce la cytotoxicité des chimiothérapies (doxorubicine et cytarabine).

Ces résultats encourageants ont mené à l'utilisation de la dexaméthasone dans plusieurs essais cliniques dans les LAM [314]. La première étude (DEXAML-01) porte sur des patients jeunes (18 à 60 ans) atteints de LAM à risque favorable ou intermédiaire, en première rémission complète après une chimiothérapie d'induction standard, qui reçoivent soit de la cytarabine à haute dose seule (traitement standard), soit de la cytarabine à haute dose associée à de la dexaméthasone (NCT02416388). Le deuxième essai clinique (DEXAML-02) évalue l'ajout de dexaméthasone pendant les phases d'induction et de consolidation chez des patients de plus de 60 ans (NCT0360906).

Enfin, la troisième étude (DEXAML-03) évalue l'impact de la dexaméthasone ajoutée à une chimiothérapie intensive ou à l'azacitidine chez des patients adultes atteints de LAM en rechute ou réfractaires (NCT03765541) [315]. La dexaméthasone pourrait donc améliorer l'issue des patients atteints de LAM et recevant une chimiothérapie intensive.

III. Rôles des PRMT dans l'inflammation

La méthylation de l'arginine est connue pour contrôler de nombreux processus cellulaires tels que la transcription, l'épissage des ARNm et la transduction des signaux [72]. Cependant, elle contribue également au contrôle des mécanismes de l'inflammation. Bien que certaines fonctions des PRMT dans l'inflammation soient rapportées, aucun travail substantiel n'avait mis jusqu'ici en évidence le lien entre les PRMT et l'inflammation dans le contexte des LAM. Lors de ce travail, nous avons constaté qu'en absence de PRMT2 dans les cellules de LAM, la voie de signalisation NF- κ B canonique est suractivée, ce qui entraîne l'induction de l'expression de ses gènes cibles, notamment l'IL6, favorisant la voie JAK/STAT3 par le biais de la liaison de l'IL6 à son récepteur.

A. Effets de PRMT2 sur les voies de l'inflammation

La première étude au sujet du rôle de PRMT2 sur les voies de signalisation inflammatoires a été publiée en 2006 par l'équipe d'Elizabeth et Gary Nabel. Ceux-ci ont montré dans des MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*, pour fibroblastes embryonnaires murins) que PRMT2 réprime la transcription dépendante de NF- κ B et rend les cellules plus sensibles aux stimuli apoptotiques. L'effet transcriptionnel sur NF- κ B est spécifique à PRMT2, et est associé à l'accumulation nucléaire d'I κ B α , restreignant de ce fait la liaison nucléaire de NF- κ B à l'ADN [316]. Une autre étude confirme l'accumulation nucléaire du facteur appartenant à NF- κ B, p65, dans le noyau de macrophages issus de souris *Prmt2*^{-/-}. De plus, ces macrophages présentent des concentrations plus élevées d'IL6 et de TNF α sécrétés après stimulation par du LPS [317], tout comme nous l'avons montré dans ce travail. Nous avons aussi pour la première fois évalué le compartiment hématopoïétique de ces souris *Prmt2*^{-/-} et montré que PRMT2 ne semble pas avoir d'impact majeur sur l'hématopoïèse murine.

Nos résultats montrent aussi une augmentation de l'expression du TLR4 à la surface des cellules de LAM dépourvues de PRMT2, même en présence de LPS. Nous avançons l'hypothèse que PRMT2, *via* la méthylation du TLR4, empêcherait sa localisation à la surface des cellules, ou inhiberait son mécanisme de recyclage à la membrane. Il a été rapporté en 2021 qu'effectivement, PRMT2 peut se lier au TLR4 afin de le méthyler.

Cette méthylation lui permet d'interagir avec le facteur de transcription IRF3, lui aussi méthylé par PRMT2. Il en résulte la translocation d'IRF3 du cytoplasme vers le noyau, favorisant la transcription de ses gènes cibles, dont la production d'IFN β [289]. PRMT2 aurait donc un rôle activateur du TLR4 dans ce contexte, contrairement à son rôle supposé dans les LAM d'une méthylation inhibitrice de ce récepteur.

PRMT2 est colocalisée avec STAT3 dans les noyaux hypothalamiques, où elle se lie et méthyle STAT3 au niveau du résidu R31 (**Figure 34**). L'absence de PRMT2 entraîne une diminution de la méthylation et une phosphorylation prolongée de STAT3 dans l'hypothalamus, associée à une augmentation de l'expression de la POMC après stimulation par la leptine [290]. De façon intéressante, nous n'avons pas montré d'interaction entre STAT3 et PRMT2 dans nos cellules de LAM. La suractivation observée de STAT3 proviendrait donc d'un évènement lié à PRMT2 se déroulant en amont.

En lien avec la voie NF- κ B, il a également été montré que PRMT2 module l'épissage alternatif du gène *BCL-X*, gène cible de cette voie de signalisation, grâce à une interaction avec le facteur d'épissage SAM68. L'expression de PRMT2 favorise l'expression de la forme longue de *BCL-X*, augmentant le rapport *BCL-X(L)/BCL-X(s)* dans les cellules stimulées par le TNF α ou le LPS. *BCL-X(L)* est la forme d'épissage de *BCL-X* inhibant l'apoptose des cellules, contrairement à *BCL-X(s)*. Ces résultats suggèrent que PRMT2 agit aussi durant la réponse inflammatoire à travers la modulation de l'épissage alternatif [318].

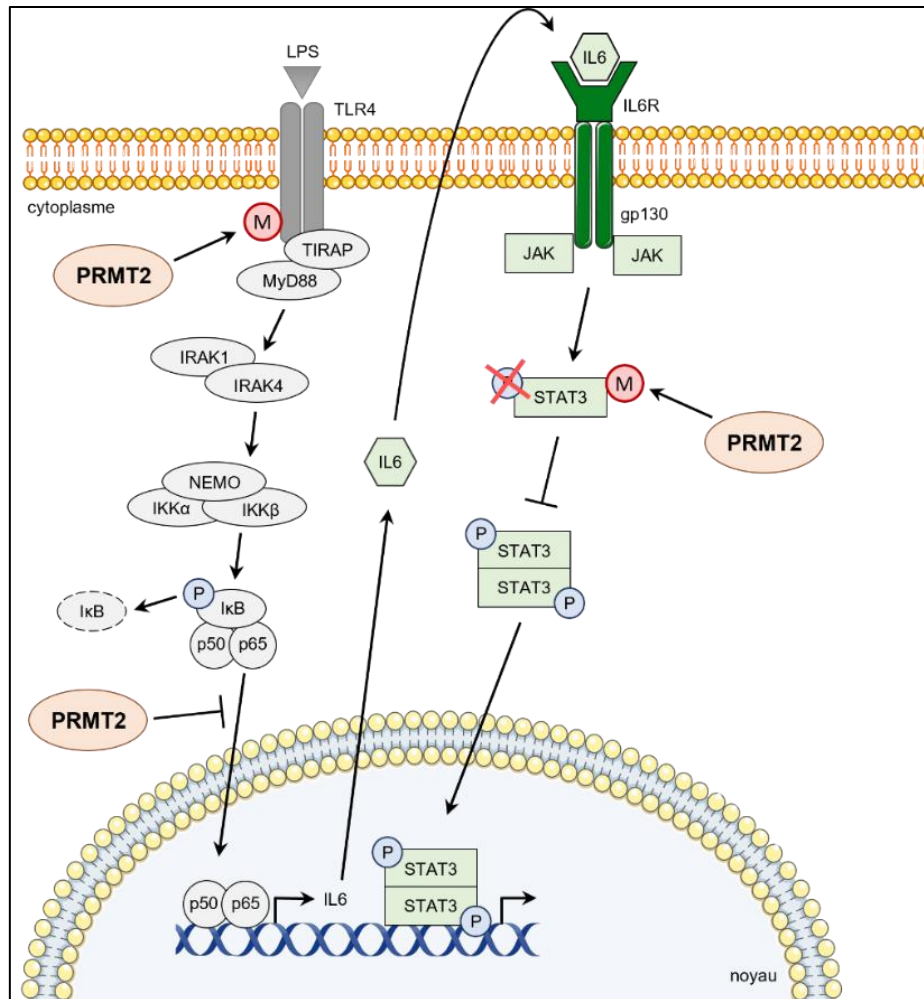


Figure 34. Rôles connus de PRMT2 sur les voies de signalisation NF-κB et JAK/STAT3. PRMT2 méthyle le TLR4, afin d'accroître la signalisation NF-κB en aval. Elle est également capable d'inhiber la translocation du facteur p65 faisant partie du complexe NF-κB dans le noyau, par un mécanisme encore inconnu à ce jour. Enfin, le facteur de transcription STAT3 est méthylé par PRMT2, empêchant *de facto* sa phosphorylation et donc sa dimérisation puis son entrée dans le noyau.

Les cellules CD68⁺ (identifiées comme macrophages) de plaques d'athérosclérose déficientes en PRMT2 et soumises à des conditions normoglycémiques présentent une expression accrue des gènes impliqués dans la signalisation des cytokines et l'inflammation. De même, les BMDM *Prmt2*^{-/-} développent une transcription plus importante des gènes pro-inflammatoires après stimulation par du LPS et une réponse réduite des gènes de résolution de l'inflammation après stimulation avec de l'IL4. Cette réponse augmentée au LPS se produit par le biais d'une activité accrue de NF-κB. Ainsi, la perte de PRMT2 est liée à une régression altérée de l'athérosclérose *via* une réponse inflammatoire élevée dans les macrophages [319].

Une surexpression de PRMT2 réduit aussi la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6 et l'IL1 β , induite par l'angiotensine II, dans des cellules musculaires lisses vasculaires. Dans ces cellules, PRMT2 atténue donc la prolifération et l'inflammation liées à l'angiotensine II [320].

B. Implications des autres PRMT dans la voie NF- κ B

D'autres membres de la famille des PRMT sont impliqués dans la modulation de la réponse inflammatoire dans divers modèles et pathologies. La majorité des travaux rapporte que la méthylation de la sous-unité p65 ou l'interaction des PRMT avec celle-ci accentue l'activation transcriptionnelle des gènes dépendants de la voie de signalisation NF- κ B.

Néanmoins, une étude a mis en évidence une diméthylation asymétrique du résidu R30 de p65 par PRMT1. Contrairement à la diméthylation symétrique de ce même résidu par PRMT5, la méthylation de p65 par PRMT1 empêche la fixation de la sous-unité de NF- κ B à l'ADN, subséquemment la transcription des gènes dépendant de cette voie [321]. En effet, deux études ont mis au jour la diméthylation symétrique de la sous-unité p65 de NF- κ B par PRMT5 au niveau du résidu R30, après stimulation des cellules au TNF α ou à l'IL1 β . Cette méthylation a pour conséquence l'activation de la transcription des gènes dépendants de NF- κ B, notamment *CXCL10* (**Figure 35A-B**) [146,322].

CARM1 est également capable de coactiver la voie de signalisation NF- κ B. Il a été montré que cette enzyme peut interagir *in vitro* directement avec p65. Elle peut former *in vivo* un complexe d'activation transcriptionnel avec les lysine acétyltransférases p300/CBP mais également avec PRMT1. Ce complexe est responsable entre autres de la marque H3R17me2a, enrichie notamment au niveau des promoteurs des gènes *MIP-2* (*Macrophage Inflammatory Protein-2*) et *HIV-1* (*Human Immunodeficiency Virus-1*) (**Figure 35C**) [145,147,323].

De plus, une surexpression de PRMT6 *in vivo* a permis de mettre en évidence son rôle de coactivateur de NF- κ B. En effet, PRMT6 est recrutée à la chromatine et interagit avec p65 afin d'induire la transcription des gènes cibles de cette voie, notamment l'IL6 après stimulation par du TNF α (**Figure 35D**) [324].

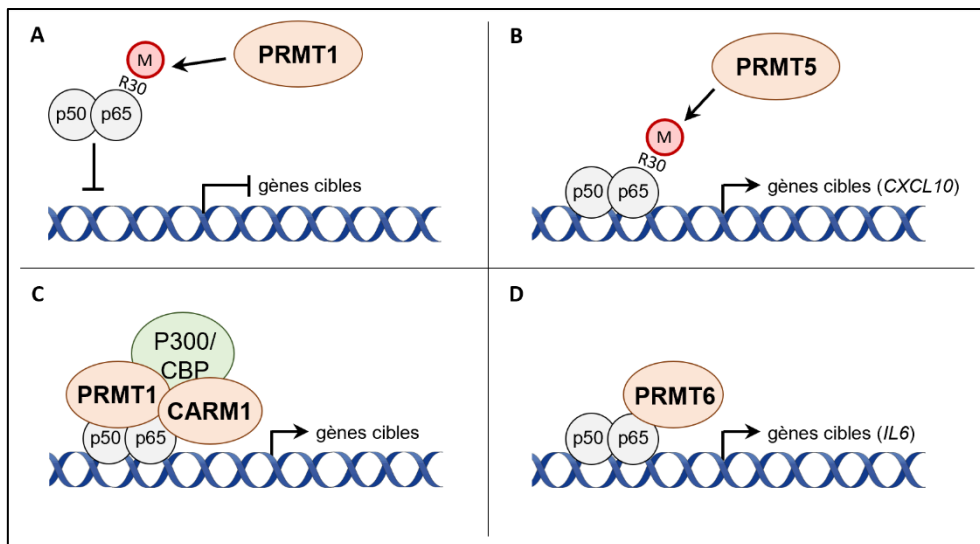


Figure 35. Rôles de différentes PRMT dans la modulation de la transcription dépendante de NF-κB. A. PRMT1 méthyle le résidu R30 de p65, ce qui empêche sa liaison à l'ADN et donc la transcription des gènes cibles de NF-κB. B. PRMT5 méthyle également le résidu R30 de p65, ce qui a pour conséquence, contrairement à la méthylation par PRMT1, d'activer la transcription des gènes cibles de NF-κB, notamment *CXCL10*. C. PRMT1 forme un complexe protéique avec CARM1 et p300/CBP, et interagit avec p65 afin d'activer la transcription des gènes cibles de NF-κB. D. PRMT6 est capable d'interagir avec p65 afin d'activer la transcription des gènes cibles de NF-κB, dont *IL6*.

Les découvertes issues de ces travaux semblent contradictoires par rapport aux nôtres. En effet, nos travaux démontrent une inhibition de la voie NF-κB par l'action de PRMT2. Or, il a été mis en évidence une diméthylation asymétrique p65 par PRMT1, qui, contrairement à la méthylation symétrique de ce même résidu par PRMT5, empêche la fixation de la sous-unité de NF-κB à l'ADN. PRMT2, enzyme de type I, catalyse une diméthylation asymétrique sur ses résidus cibles. Il serait donc possible que la diméthylation asymétrique d'une sous-unité de NF-κB par PRMT2 mène à l'inhibition de cette voie, tout comme cela a été montré dans le cas de PRMT1.

IV. Rôles de PRMT2 dans la progression des cancers

Peu de travaux portant sur les effets de PRMT2 dans les cancers ont été rapportés. Ils témoignent cependant d'un rôle ambivalent de cette protéine, dépendant fortement des modèles expérimentaux et de la pathologie étudiée. En outre, cette enzyme n'avait jamais été auparavant étudiée dans un contexte de LAM, ni d'aucune autre hémopathie maligne.

Dans les CCR (Carcinomes à Cellules Rénales), la présence de PRMT2 favorise *in vitro* et *in vivo* la prolifération et la motilité cellulaires. À travers l'enrichissement de la marque H3R8me2a catalysée par PRMT2, l'expression de l'oncogène *WNT5A* est augmentée, menant à l'activation de la voie de signalisation oncogénique Wnt. Chez les patients atteints de CCR, une corrélation positive a été établie entre l'expression de PRMT2 et une faible survie [288].

De même, la marque épigénétique H3R8me2a catalysée par PRMT2 permet le recrutement et l'accessibilité du facteur de transcription STAT3 à l'ADN dans les CHC. Ce recrutement est responsable de l'activation de l'expression du gène codant pour la protéine anti-apoptotique *BCL2*, démontrant un rôle oncogénique de PRMT2 dans cette pathologie. En sus, une expression aberrante de l'ARNm et de la protéine PRMT2 est observée dans les tissus de patients affectés par ces carcinomes [125].

Grâce au contrôle de la diméthylation asymétrique de H3R8, PRMT2 est identifiée comme un facteur pro-tumorigène dans le GBM (Glioblastome Multiforme). L'inactivation de PRMT2 *in vitro* et *in vivo* conduit à une baisse de la croissance cellulaire et un ralentissement de la tumorigenèse dans le GBM *via* l'inhibition de programmes transcriptionnels oncogéniques résultant d'une diminution de la marque H3R8me2a. La surexpression de PRMT2 est associée à un mauvais pronostic. Il existe une corrélation entre l'abondance des cellules exprimant PRMT2 et un grade tumoral élevé [124].

PRMT2 et CARM1 coopèrent dans le cancer du sein afin de méthyler BRD4, contrôlant ainsi des programmes transcriptionnels impliqués dans le remodelage de la chromatine. La méthylation de BRD4, une protéine lectrice de marques d'acétylation des résidus lysine, promeut sa liaison à l'ADN au niveau des régions hyperacétylées de la chromatine.

La méthylation de BRD4 est cruciale pour son activité dans la DDR et dicte sa sensibilité aux inhibiteurs de BET et aux agents de dommages à l'ADN. En effet, en absence de méthylation, les fonctions oncogéniques de BRD4 sont abolies [287].

Ainsi, PRMT2 semble avoir principalement une fonction oncogénique dans les CCR, les CHC et les GBM en activant des programmes transcriptionnels pro-tumorigéniques grâce à la marque épigénétique H3R8me2a. Nos résultats suggèrent à l'inverse que dans les LAM, PRMT2 posséderait plutôt un effet antitumoral, notamment du fait d'un amenuisement des processus inflammatoires, en particulier au niveau du contrôle de la voie NF- κ B. Deux autres études portant sur le cancer du sein étayaient cette hypothèse en rapportant que la perte de PRMT2 dans le noyau mène à une surexpression de la cycline D1, promouvant ainsi la prolifération cellulaire, et en l'associant à un plus haut grade de tumeur [282]. De plus, une baisse d'expression de PRMT2 mène à une hausse d'expression de ER α 36, un sous-type du récepteur aux œstrogènes, menant à une résistance des cellules de cancer du sein au tamoxifène [281]. Cette enzyme a donc également été caractérisée pour son rôle protecteur envers la prolifération des cellules cancéreuses (**Figure 36**).

Il est intéressant de noter que même si PRMT2 est importante dans la progression de différentes formes de cancers, notre étude révèle que l'absence de PRMT2 dans le microenvironnement tumoral dans des modèles de cancers pulmonaires et de carcinomes du côlon murins n'affecte pas significativement la croissance tumorale. Ce travail en collaboration avec l'équipe de François Ghiringhelli doit être continué en testant d'autres modèles tumoraux. Si les résultats obtenus avec ces deux modèles étaient confirmés, nous pourrions émettre l'hypothèse que PRMT2 pourrait agir directement au sein des cellules tumorales et non au niveau des cellules de l'environnement tumoral, telles que les cellules immunitaires.

Nous décrivons pour la première fois un rôle d'une PRMT qui empêche l'emballement des processus inflammatoires dans les LAM. Dans la cohorte de patients de *The Leucegene Project*, une baisse de l'expression de PRMT2 est associée à une plus faible survie des patients, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature pour les autres PRMT dans cette pathologie. En effet, il a été démontré que la déplétion des PRMT1, -5 et -6 ainsi que de CARM1 dans des modèles de LAM mène à une amélioration de la survie et une baisse de la prolifération des cellules leucémiques [129].

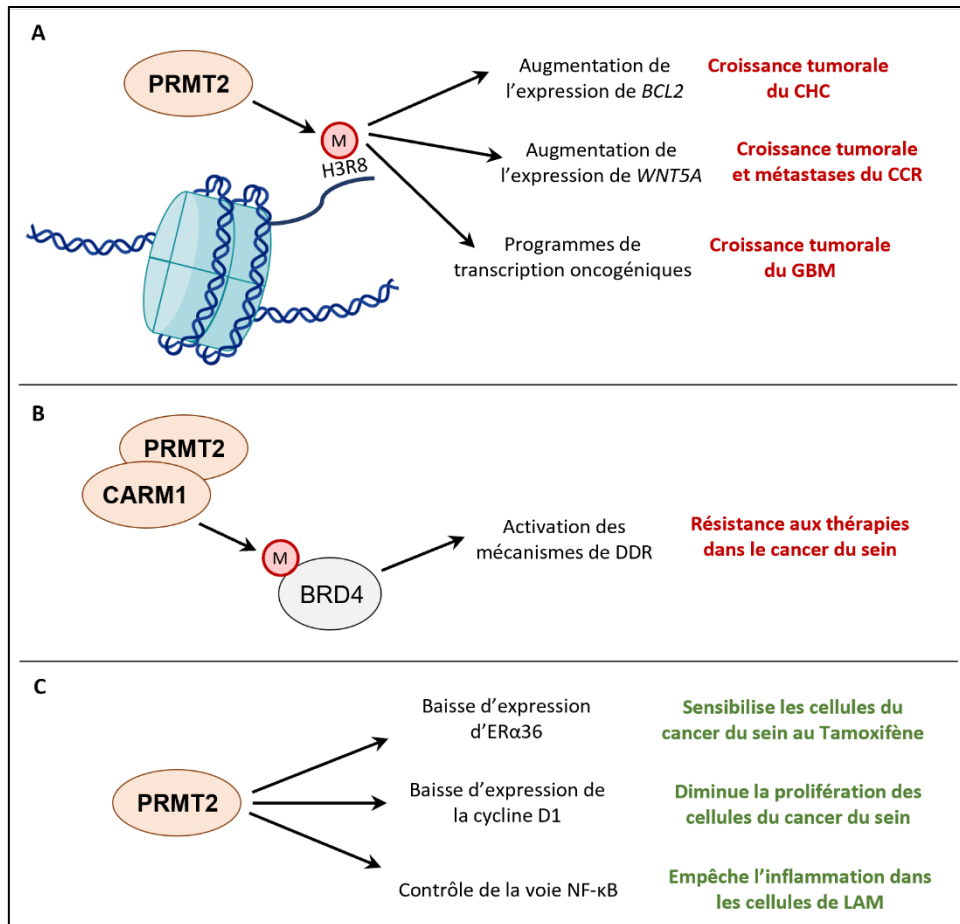


Figure 36. Rôles ambivalents de PRMT2 dans la progression tumorale. **A.** PRMT2 est responsable de la méthylation de H3R8, ce qui entraîne une activité transcriptionnelle d'oncogènes, d'où une augmentation de la croissance tumorale dans les CHC, CCR et GBM. **B.** PRMT2 coopère avec CARM1 afin de méthyler BRD4, ce qui va activer les voies de réparation aux dommages de l'ADN et conférer aux cellules de cancer du sein une résistance aux inhibiteurs de BET et aux agents de dommage à l'ADN. **C.** PRMT2 possède également des activités antitumorales, notamment dans le cancer du sein où il sensibilise les cellules au tamoxifène et réduit la prolifération cellulaire *via* respectivement l'activation de l'expression d'ERα36 et de la cycline D1. Un contrôle de la voie de signalisation NF-κB permet également à PRMT2 de limiter les mécanismes pro-inflammatoires dans les cellules de LAM.

Puisque les protéines PRMT2 et PRMT6 sont structurellement proches, il est possible qu'elles reconnaissent les mêmes cibles, et puissent potentiellement méthyler les mêmes substrats. De façon intéressante, PRMT2 et PRMT6 interviennent toutes deux dans l'expression de la cycline D1. Contrairement à PRMT2 qui réprime son expression dans le cancer du sein, la présence de PRMT6 dans les LAM conduit à une hausse de l'expression de la cycline D1, stimulant la prolifération cellulaire et baissant le nombre de cellules en phase G1 du cycle cellulaire [225].

V. Les nouveaux substrats de PRMT2

A. Les protéines WAS et WIPF1 interagissent avec PRMT2

À ce jour, peu de protéines cibles de PRMT2 ont été découvertes. Son substrat le plus largement étudié est l'histone H3R8, et sa méthylation est associée à une activation de la transcription. Il est aussi possible de citer BRD4, TLR4, IRF3, STAT3 et Cobl comme étant des substrats validés, selon la littérature, de cette méthyltransférase.

Nous avons réalisé une analyse de l'interactome de PRMT2 grâce à une technique de spectrométrie de masse sans marquage, après immunoprécipitation d'une protéine de fusion citrine-PRMT2 dans les cellules de LAM HL-60. Nous avons identifié 83 protéines capables de potentiellement interagir avec PRMT2 à la fois sans stimulation ainsi qu'après une stimulation par le LPS, déclencheur du phénotype inflammatoire de ces cellules. Les processus biologiques dans lesquels PRMT2 semble la plus impliquée sont la prise en charge des ARN messagers pour leur clivage nécessaire à leur polyadénylation, l'assemblage ainsi que la biogenèse des sous-unités ribosomales, et les processus de traduction ayant lieu dans le cytoplasme. Différentes cyclines interagissent aussi avec PRMT2, et celles-ci sont impliquées dans la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II. Deux des protéines dont les peptides sont les plus enrichis parmi les 83 protéines identifiées sont les protéines WAS et WIPF1, et une deuxième analyse sur les mêmes échantillons a permis de découvrir que les deux protéines possèdent des peptides méthylés et pourraient donc représenter de nouveaux substrats de PRMT2.

De façon très intéressante, une augmentation du nombre de macrophages pro-inflammatoires est observée avec une production accrue de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle de souris déficientes pour *Was*, démontrant donc son effet anti-inflammatoire [325–327]. Nos résultats sont cohérents avec cette découverte, puisqu'en présence de PRMT2, une interaction avec cette protéine aux fonctions anti-inflammatoires est observée. Les voies liées à l'inflammation sont d'ailleurs plus faiblement activées qu'en absence de PRMT2.

Une étude portant sur PRMT2 comprend également les analyses d'une expérience d'identification de nouveaux partenaires de PRMT2 par spectrométrie de masse, après un *GST pull-down* utilisant le domaine SH3 de PRMT2. Parmi les protéines identifiées sont notamment retrouvées WAS et WIPF1, tout comme le montrent nos résultats, confirmant ainsi ces deux protéines comme de nouveaux partenaires effectifs, et possiblement comme de nouveaux substrats de PRMT2. Beaucoup de protéines liées à la formation des ribosomes sont également identifiées comme partenaires d'interaction de PRMT2, tout comme dans ce travail de thèse [318].

B. Régulation croisée entre PRMT2 et PLZF

La protéine PLZF (*Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger*) a été décrite pour la première fois en 1993 chez un patient atteint d'une LAP. Le gène codant pour PLZF (appelé *Zbtb16*) comporte 6 exons avec au moins 4 sites d'épissages dans l'exon 1 donnant naissance à des protéines PLZF de tailles et de fonctions différentes. L'extrémité N-terminale de PLZF contient un domaine BTB/POZ (*Poxvirus and Zinc finger*). Ce domaine est crucial pour la fonction répressive de cette protéine parce qu'il est impliqué dans le recrutement de facteurs épigénétiques. Le domaine C-terminal contient 9 structures en doigts de zinc impliquées dans la reconnaissance de motifs permettant à PLZF de se lier directement au génome, afin de réprimer transcriptionnellement des gènes cibles [328].

Il est bien établi que l'activité et la localisation de PLZF sont contrôlées par des modifications post-traductionnelles, notamment l'acétylation, la phosphorylation, la SUMOylation et l'ubiquitinylation. PLZF intervient dans le renouvellement et le maintien des cellules souches, le cycle cellulaire, l'apoptose et dans la réponse aux glucocorticoïdes. C'est une protéine qui agit aussi fortement sur le remodelage de la chromatine à travers le recrutement des enzymes HDAC et DNMT [329].

Au vu de l'implication de PLZF dans les processus épigénétiques, le Dr Fabien Guidez, qui travaille sur cette protéine [330–333], s'est intéressé à son interaction potentielle avec PRMT2. Les résultats présentés ci-après ont été obtenus par son étudiant en Master 2 Recherche, Dametampo Kantame, et sont utilisés avec leur accord dans ce manuscrit.

Afin d'étudier l'interaction entre PLZF et PRMT2, le modèle cellulaire KG-1a (modèle d'étude des LAM immatures et les cellules souches/progénitrices) déplété de PRMT2 créé pour cette étude a été utilisé. Un modèle KG-1a déplété de PLZF a également été créé *via* la stratégie CRISPR-Cas9. Tout d'abord, il apparaît que le KO de PRMT2 n'affecte pas l'expression protéique de PLZF dans les cellules KG-1a (**Figure 37A-B**). Néanmoins, une différence de localisation subcellulaire est observée, avec une accumulation nucléaire de PLZF en absence de PRMT2, de même qu'une diminution de la concentration cytoplasmique de cette protéine (**Figure 37C**). PRMT2 pourrait donc avoir pour rôle de moduler la localisation subcellulaire de PLZF dans le cytoplasme afin d'empêcher sa liaison avec des facteurs nucléaires chromatiniens ou non chromatiniens.

Néanmoins, lorsque la protéine PLZF est absente, les niveaux d'expression génique et protéique de PRMT2 sont fortement diminués (**Figure 37D-E**). PLZF pourrait moduler l'expression de PRMT2 à la chromatine, en se fixant à son promoteur, possiblement en recrutant un complexe de facteurs épigénétiques contrôlant l'activation de l'expression du gène. De plus, PLZF est co-immunoprécipitée avec un anticorps reconnaissant la marque H3R8me2a, signifiant que PLZF porte des épitopes arginine méthylés et pourrait donc correspondre à un substrat non-histone de PRMT2 (**Figure 37F**). Une prédiction de sites de méthylation *in silico* a révélé que 11 sites de PLZF pourraient être méthylés sur des résidus arginine, dont six sites ayant des scores de prédiction supérieurs à 0,75 en comparaison avec le site arginine 8 décrit dans l'histone 3 (**Figure 37G**).

Une CHIP réalisée avec une immunoprécipitation de PLZF a permis de révéler que cette protéine peut se fixer sur le promoteur de *PRMT2*. Cette fixation est beaucoup plus importante dans les cellules PRMT2 KO (**Figure 37H**). Cela confirme l'hypothèse formulée précédemment que PLZF module l'expression de *PRMT2* en se fixant sur son promoteur. Ainsi, il existe des mécanismes de régulation croisée entre PRMT2 et PLZF. PLZF pourrait être un substrat de PRMT2, même si cela reste à confirmer, notamment par des expériences de mutagenèse dirigée. PRMT2 modifierait la localisation subcellulaire de PLZF, en la séquestrant dans le cytoplasme et en l'empêchant *de facto* de se lier à son promoteur. PLZF, quant à lui, modulerait l'expression génique et protéique de PRMT2 en se fixant sur son promoteur et en recrutant possiblement des corégulateurs transcriptionnels (**Figure 37I**).

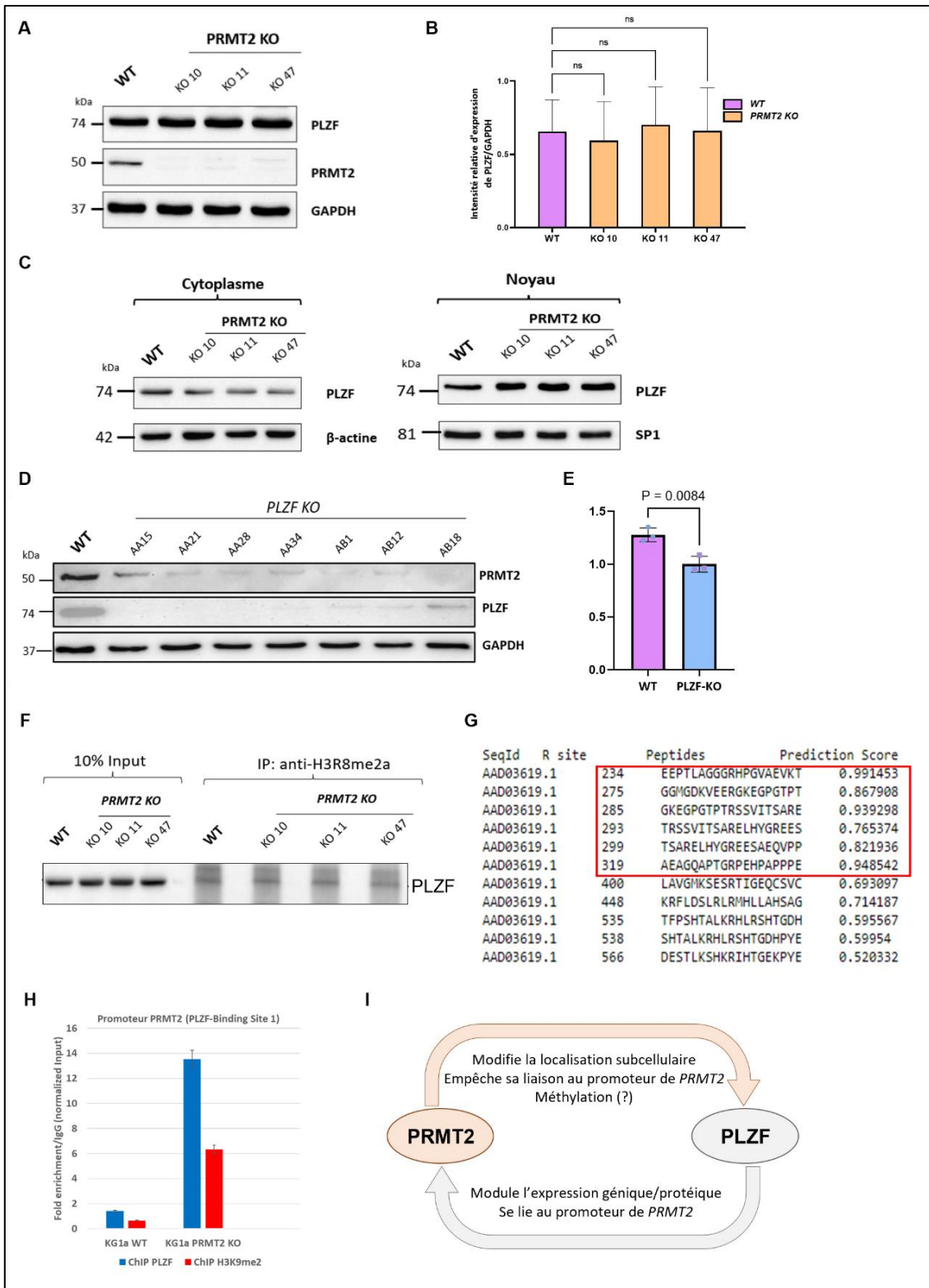


Figure 37. Étude de l'interaction entre PLZF et PRMT2. A-B. Analyse de l'expression de PLZF par Western Blot (A) et densitométrie associée (B) dans des cellules KG-1a WT et PRMT2 KO. C. Analyse par Western Blot des fractions cytoplasmique (gauche) et nucléaire (droite) des cellules KG-1a WT et PRMT2 KO. D-E. Analyse par Western Blot (A) et RT-qPCR (B) de l'expression de PRMT2 dans les cellules KG-1a WT et PLZF KO. F. Analyse par Western Blot après immunoprécipitation de la marque H3R8me2a de l'expression de PLZF. *Input* : 10% de l'extrait protéique total. G. Prédiction des sites de méthylation de PLZF (PRmePred). H. *Fold Enrichment* du promoteur de PRMT2 après immunoprécipitation de chromatine en utilisant PLZF ou H3K9 comme cible dans des cellules KG-1a WT et PRMT2 KO. I. Représentation schématique des fonctions de régulation croisée entre PRMT2 et PLZF dans les LAM.

VI. Rôles putatifs de PRMT2 dans la voie NF- κ B dans les LAM

Nos résultats montrent que les cellules de LAM déficientes pour PRMT2 sécrètent des taux plus importants d'IL6. Cette cytokine étant en partie responsable de l'activation de la voie JAK/STAT3 en aval de son récepteur, l'IL6R, une suractivation de STAT3 est également démontrée en absence de PRMT2. Néanmoins, nous n'avons détecté aucune interaction physique entre PRMT2 et STAT3 ni par spectrométrie de masse ni par co-immunoprécipitation. PRMT2 agit donc très probablement sur la modulation de la production d'IL6.

TLR4, le récepteur au LPS, est retrouvé surexprimé à la surface des cellules de LAM déplétées de PRMT2 stimulées ou non par du LPS. Il pourrait être méthylé par PRMT2, cette méthylation inhibant l'expression du récepteur à la membrane des cellules, ou bien empêchant son recyclage efficient (**Figure 38A**). Il a été précédemment rapporté la méthylation du TLR4 par PRMT2 dans les cellules HEK293 ainsi que dans la lignée macrophagique RAW267.4. Néanmoins, dans ces cellules, cette méthylation a pour effet d'activer le signal lié à ce récepteur, contrairement à ce que suggèrent nos résultats [289].

En absence de PRMT2, la translocation de la sous-unité p65 de NF- κ B est facilitée et la protéine inhibitrice de cette voie, I κ B α , est dégradée de façon plus importante, d'où une suractivation de la voie de signalisation. PRMT2 est responsable de la séquestration de p65 dans le cytoplasme, probablement associée à l'inhibition de la dégradation d'I κ B α (**Figure 38B**). Deux études confirment ce rôle modulateur de PRMT2 sur NF- κ B, en soulignant d'une part le lien entre sa présence et un amoindrissement de la liaison nucléaire de NF- κ B à l'ADN [316] et d'autre part, une accumulation nucléaire de p65 dans les souris *Prmt2*^{-/-} [317].

Nos analyses protéomiques n'ont cependant révélé jusqu'ici aucune interaction directe entre PRMT2 et l'un des facteurs de la voie NF- κ B. Il est possible que nous n'ayons pas encore identifié le partenaire d'interaction. Il est également envisageable que son rôle puisse être plus indirect, en modulant par exemple la transcription des gènes codant pour des protéines inhibitrices de cette voie, ou en inhibant celle de protéines activatrices, en se liant aux queues des histones ou bien en s'associant à des complexes transcriptionnels (**Figure 38C**).

Afin d'étayer cette hypothèse, l'équipe d'Elizabeth et Gary Nabel a mis en évidence que PRMT2 réprime la transcription dépendante de NF- κ B et rend les cellules plus sensibles aux stimuli apoptotiques dans des MEF [316].

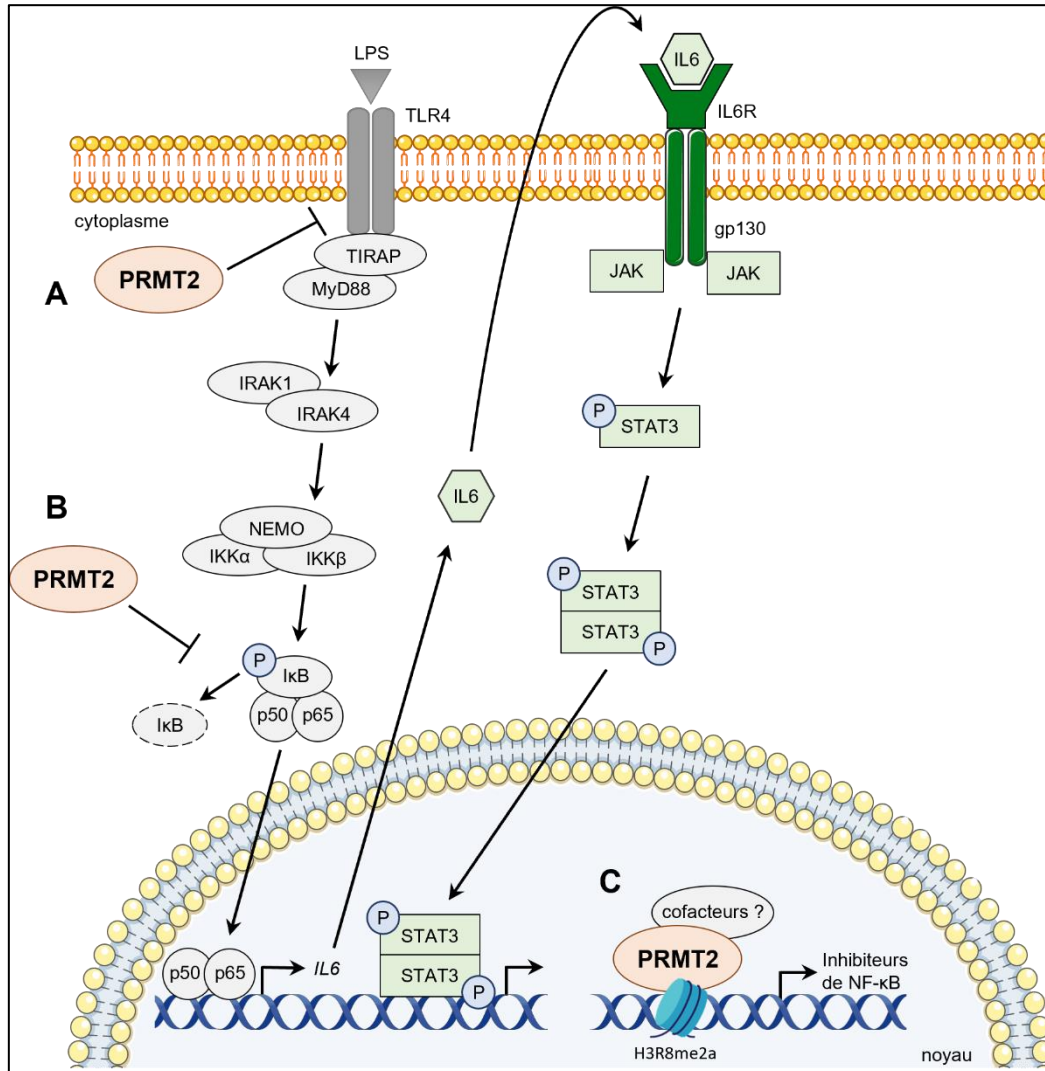


Figure 38. Rôles putatifs de PRMT2 sur le contrôle la voie de signalisation NF- κ B. En absence de PRMT2, le TLR4 est plus fortement exprimé, sans doute du fait que la méthylation inhibitrice du TLR4 par PRMT2 est absente (A). PRMT2 pourrait agir directement sur la voie NF- κ B dans le cytoplasme en méthylant un facteur clé de cette cascade de signalisation, empêchant ainsi son activation, conduisant à la séquestration de p65 dans le cytoplasme (B), à une diminution de la production d'IL6 par les cellules de LAM HL-60 et à une diminution de l'activation de STAT3 par le signal lié à l'IL6R. Dans le noyau, PRMT2, connue pour sa fonction transcriptionnelle, pourrait contrôler la transcription de gènes codant pour des protéines régulatrices de la voie NF- κ B par la méthylation de H3R8 ou également en tant que membre de complexes transcriptionnels (C), entraînant ainsi les mêmes conséquences sur la répression de NF- κ B.

CONCLUSION

Mon travail de thèse a permis d'établir le rôle essentiel de PRMT2 dans le contrôle de l'inflammation dans les LAM. Nous avons constaté que les cellules de LAM dépourvues de PRMT2 présentent une signature pro-inflammatoire, tout comme les patients atteints de LAM avec de faibles taux d'expression de *PRMT2*. Ces derniers ont également un plus faible taux de survie globale, comparé aux patients avec une forte expression de *PRMT2*. Les cellules de LAM dépourvues de PRMT2 présentent une activation accrue de la voie de signalisation NF- κ B après une stimulation par du LPS. Cette activation conduit à une surexpression d'IL6 et finalement à une phosphorylation plus importante de la protéine STAT3. Nous avons également observé une expression plus importante du récepteur au LPS, TLR4, dans les cellules n'exprimant pas PRMT2. Une étude plus approfondie de la voie NF- κ B a permis d'identifier TAK1 comme cible potentielle de PRMT2 durant ce processus. Une étude sur des BMDM de souris *Prmt2*^{-/-} stimulées par du LPS nous a permis de confirmer le lien étroit qui existe en PRMT2 et les voies de l'inflammation dans l'hématopoïèse normale. En effet, une augmentation de l'expression et de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL6 et TNF est observée en absence de notre protéine d'intérêt, reflétant son implication dans la modulation de la réponse inflammatoire. Nous n'avons, pour le moment, pas identifié de rôle de PRMT2 au sein du microenvironnement tumoral, que ce soit dans un modèle de tumeur faiblement ou fortement infiltré en cellules immunitaires. Enfin, une analyse de l'interactome de PRMT2, réalisée par spectrométrie de masse, fait émerger les protéines WAS et WIPF1 comme nouveaux partenaires potentiels ou même substrats de cette méthyltransférase.

Le rôle précis de PRMT2 sur la voie de signalisation NF- κ B reste à élucider afin d'avoir une total compréhension de la modulation de l'inflammation par PRMT2 dans un contexte de LAM très immature. Dans le cadre de la thèse de Sciences de Denis Masnikov, des protéines de fusion FLAG-PRMT2 et HA-PRMT2 seront créées dans le modèle cellulaire leucémique KG-1a, les étiquettes FLAG et HA étant de masse moléculaire plus faible que la citrine. Celles-ci faciliteront l'étude de l'interactome de PRMT2 par spectrométrie de masse, qui permettront de éventuellement de confirmer les résultats que nous avons obtenus et/ou indiqueront d'autres cibles associées à ce modèle représentant outre une LAM immature, un modèle de cellules souches/progénitrices hématopoïétiques normales. Les cibles d'intérêt seront ensuite caractérisées et leur éventuelle méthylation par PRMT2 sera évaluée notamment *via* des expériences de mutagenèse dirigée.

Pour examiner si l'absence ou la surexpression de *PRMT2* affecte *in vivo* la prolifération des cellules cancéreuses dans le microenvironnement, un modèle de xéno greffe de souris immunodéprimées B-NDG (NOD.CB17-*Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1}*/Bcgen) avec des cellules KG-1a WT, *PRMT2*^{KO} ou citrine-*PRMT2* sera utilisé. Cela nous permettra d'évaluer la survie des souris ainsi que la viabilité des cellules. Parmi l'ensemble des études phénotypiques et moléculaires à effectuer, sera analysé l'effet de *PRMT2* sur la localisation des cellules dans les différents organes et tissus.

Une réanalyse de données de RNA-seq précédemment publiées [334] nous a permis de mettre en évidence une forte augmentation de l'expression de *PRMT2* lors de la différenciation des cellules de LAM HL-60 en granulocytes neutrophiles *in vitro* par l'acide tout-trans rétinolique (**Figure 39A-B**). Une étude des effets de l'absence de *PRMT2* sur la différenciation de nos modèles de lignées cellulaires de LAM sera donc initiée dans le cadre du stage de Master 2 Recherche de Mahtab Zabihi.

Les futurs travaux de recherche se concentreront également sur l'étude de la méthylation des histones, en particulier des marques épigénétiques H3R8me2a et H4R3me2a, afin de caractériser la fonction épigénétique de *PRMT2* dans les LAM.

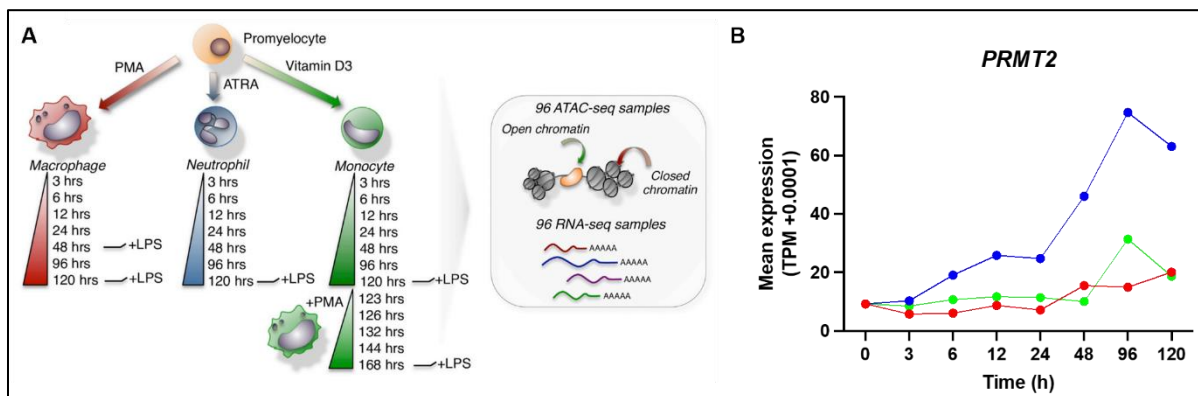


Figure 39. Expression de *PRMT2* lors de la différenciation des HL-60. Méthodes utilisées (A) et expression de *PRMT2* (B) durant la différenciation des cellules HL-60 en macrophages (rouge), neutrophiles (bleu) et monocytes (vert). Figure et données de RNA-seq issues de Ramirez *et al.*, 2017 [334].

ANNEXES

I. Revue « *Protein Arginine Methyltransferases as Therapeutic Targets in Hematological Malignancies* »

La méthylation de l'arginine est une modification post-traductionnelle courante qui affecte l'activité des protéines et la transcription des gènes cibles lorsqu'elle se produit au niveau des queues des histones. Il existe neuf PRMT chez les mammifères, divisées en sous-groupes en fonction de la méthylation qu'elles forment sur une molécule d'arginine. Au cours de la formation et de la maturation des différents types de cellules sanguines, les PRMT ont un rôle central en contrôlant la différenciation cellulaire au niveau transcriptionnel. L'activité enzymatique des PRMT est nécessaire à de nombreux processus cellulaires dans les hémopathies malignes, tels que l'activation du cycle cellulaire et de la prolifération, l'inhibition de l'apoptose, les processus de réparation de l'ADN, l'épissage des ARN et la transcription par la méthylation de l'arginine des queues d'histones. Des molécules ont été développées à des fins pharmacologiques pour inhiber l'activité des PRMT et ont été testées parfois avec succès dans plusieurs modèles d'hémopathies malignes, y compris des échantillons primaires de patients, des xéno greffes dans des souris immunodéficientes, des modèles de souris et des lignées cellulaires humaines. Ils ont un effet significatif en réduisant la viabilité des cellules et en augmentant la survie globale des souris. Les inhibiteurs de PRMT5 ont un fort potentiel thérapeutique, puisque les essais cliniques de phase I dans les hémopathies malignes utilisant ces molécules montrent des résultats prometteurs, soulignant que les inhibiteurs de PRMT pourraient devenir des outils thérapeutiques utiles pour le traitement de certains cancers.

Cette revue a été publiée le 5 novembre 2022 dans le journal scientifique international *Cancers* (Impact Factor 2022 : 5,2).

Review

Protein Arginine Methyltransferases as Therapeutic Targets in Hematological Malignancies

Camille Sauter ^{1,*}, John Simonet ¹, Fabien Guidez ¹, Baptiste Dumétier ¹, Baptiste Pernon ¹, Mary Callanan ^{1,2}, Jean-Noël Bastie ^{1,3}, Romain Aucagne ^{1,2,†} and Laurent Delva ^{1,*,†}

- ¹ Inserm U1231, Team Epi2THM, LipSTIC Labex, UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne, Université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France
² Unit for Innovation in Genetics and Epigenetic in Oncology (IGEO)/CRIGEN Core Facility, University Hospital François Mitterrand, 21000 Dijon, France
³ Department of Clinical Hematology, University Hospital François Mitterrand, 21000 Dijon, France
* Correspondence: camille.sauter@u-bourgogne.fr (C.S.); laurent.delva@u-bourgogne.fr (L.D.)
† These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: This review summarizes the current findings about the cellular roles of protein arginine methyltransferases (PRMTs) in the formation of blood cells from stem cell progenitors and in different blood cancers such as leukemia and lymphoma. The work also provides a substantial insight into the development and the use of PRMT inhibitors for the treatment of hematological cancers. This review aims to show the research community that targeting PRMTs could be a novel and promising therapeutic approach for these diseases.

Abstract: Arginine methylation is a common post-translational modification affecting protein activity and the transcription of target genes when methylation occurs on histone tails. There are nine protein arginine methyltransferases (PRMTs) in mammals, divided into subgroups depending on the methylation they form on a molecule of arginine. During the formation and maturation of the different types of blood cells, PRMTs play a central role by controlling cell differentiation at the transcriptional level. PRMT enzymatic activity is necessary for many cellular processes in hematological malignancies, such as the activation of cell cycle and proliferation, inhibition of apoptosis, DNA repair processes, RNA splicing, and transcription by methylating histone tails' arginine. Chemical tools have been developed to inhibit the activity of PRMTs and have been tested in several models of hematological malignancies, including primary samples from patients, xenografts into immunodeficient mice, mouse models, and human cell lines. They show a significant effect by reducing cell viability and increasing the overall survival of mice. PRMT5 inhibitors have a strong therapeutic potential, as phase I clinical trials in hematological malignancies that use these molecules show promising results, thus, underlining PRMT inhibitors as useful therapeutic tools for cancer treatment in the future.

Keywords: hematological malignancies; arginine methylation; PRMT; inhibitors; clinical trials



Citation: Sauter, C.; Simonet, J.; Guidez, F.; Dumétier, B.; Pernon, B.; Callanan, M.; Bastie, J.-N.; Aucagne, R.; Delva, L. Protein Arginine Methyltransferases as Therapeutic Targets in Hematological Malignancies. *Cancers* **2022**, *14*, 5443. <https://doi.org/10.3390/cancers14215443>

Academic Editor: Brian A. Walker

Received: 6 October 2022

Accepted: 1 November 2022

Published: 5 November 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

1.1. Arginine Methylation

Arginine methylation has been discovered more than 50 years ago on histone proteins [1] and has become a subject of interest in recent years. The methylation of arginine on histone and non-histone proteins is carried out by enzymes called protein arginine methyltransferases (PRMTs); this family of proteins contains nine members in mammals [2]. PRMTs facilitate the shift of a methyl group from a molecule called S-adenosylmethionine to guanidino nitrogen atoms of arginine. Methylarginines can be divided into three distinct forms depending on the number and the locations of the methyl groups: ω -N^G-monomethylarginine (MMA), ω -N^G,N^G-asymmetric dimethylarginine (ADMA), and ω -

N^G, N^G -symmetric dimethylarginine (sDMA). PRMTs are categorized depending on their activity: Type I (PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT6, PRMT8) catalyze MMA and aDMA forms; Type II (PRMT5, PRMT9) catalyze MMA and sDMA forms; and Type III (PRMT7) only forms MMA [3].

1.2. Epigenetic and Cellular Roles of PRMTs

Over 4000 proteins have been identified to be methylated on their arginine residues, thus, leading to a broad range of biological effects. PRMTs control the pre-mRNA splicing of genes involved in cell proliferation, survival, and differentiation. Arginine methylation also occurs on many ribosomal RNA-binding proteins regulating the process of protein biosynthesis. It has been shown that PRMTs participate in the control of many aspects of the DNA damage response through the methylation of key DNA repair and cell cycle checkpoint proteins: PRMT-depleted cells are hypersensitive to DNA damage. Signaling proteins can also be methylated on their arginine residues, thus, leading to a modulation of their activity, especially in different growth factor-receptor signaling pathways such as the TGF β , the EGF, or the PDGF receptor pathways [4,5]. PRMTs are also involved in more specific cellular processes. For instance, the methylation of sirtuin 7 by PRMT6 modulates glucose metabolism and mitochondrial biogenesis. In addition, the arginine methylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) by PRMT4 (also called coactivator-associated arginine methyltransferase 1—CARM1) has inhibitory effects on glycolysis. Actin and neuronal development are also mediated by the arginine methylation of the actin nucleator cordon-bleu WH2 repeat protein by PRMT2, thus, helping the neuronal morphogenesis [6].

PRMTs catalyze the methylation on histone tail arginine that is directly involved in the control of the transcription of target genes, either by compacting or decompacting the chromatin for the transcriptional repression or activation, respectively (Figure 1) [7]. Some of these histone arginine methylations contribute to an activation of the transcription of target genes, which include the arginine 3 of histone 4 asymmetrical demethylation (H4R3me2a) by PRMT1 and PRMT3 [8,9], the H3R17me2a mark catalyzed by CARM1 [10,11], and the H3R2 symmetrical demethylation (H3R2me2s) by PRMT5 [12]. The arginine methylation of histones can also be associated with a repressive chromatin state, as shown with the H4R3 and H2AR3 monomethylation by PRMT7 [13], PRMT5 H3R8me2s [14], and PRMT6 H3R2me2a marks [15].

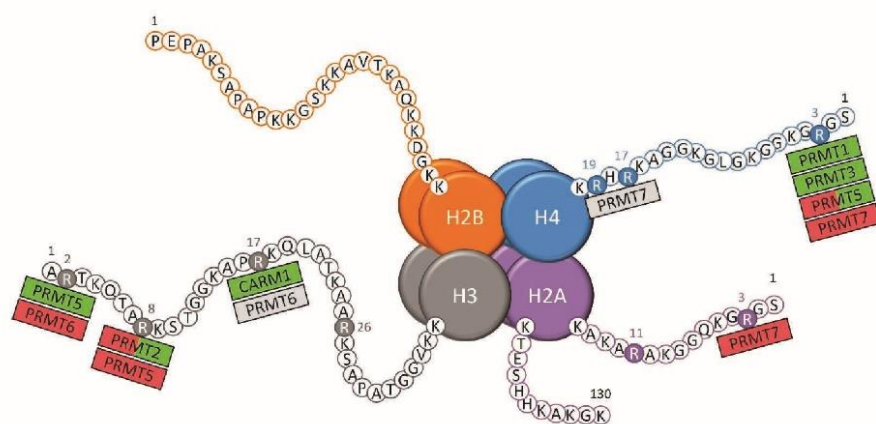


Figure 1. The known sites of arginine methylation on histone tails by protein arginine methyltransferases (PRMTs). Green: transcriptional activation; red: transcriptional repression; grey: unknown role on transcription.

The modification of the chromatin state through epigenetic marks on histone tails is a very active process with regular changes, thus, explaining that a same arginine methylation mark can be associated either with the activation or repression of transcription, depending on many characteristics, such as the other epigenetic marks surrounding the methylated arginine residue [16]. For instance, the H4R3me2s by PRMT5 [17,18] and the H3R8me2a by PRMT2 [19–23] are such epigenetic marks with dual effect. Finally, the role of certain epigenetic marks on transcription remains unclear, such as the H4R17 and H4R19 monomethylations by PRMT7 [24] and the H3R17me2a mark by PRMT6 [10].

1.3. PRMTs and Cancer

It has been found that expression of certain PRMT genes is altered in some cancer types such as *PRMT1* and *CARM1* overexpressed in breast and prostate cancers or *PRMT5* and *PRMT6* overexpressed in lung and blood cancers [25]. A recently published review provides an exhaustive list of the biological mechanisms in which PRMTs are involved in each cancer type [26]. In breast cancer cells, arginine methylation causes cellular proliferation and invasion through the metastasis process, thus, influencing the clinical and survival outcome of patients. These biological phenomena are the consequences of PRMTs targeting nuclear hormone receptors, tumor suppressors, splicing factors, chromatin stability proteins, and signaling pathways such as TGF β [27]. PRMTs have also been studied in brain tumorigenesis. Glioma cells show an increased expression of *PRMT1*, and PRMT5 has been reported to be required for glial cell differentiation and disease progression. Both glioblastoma and medulloblastoma cells have increased PRMT activity through the action of PRMT5 and its association with the oncoprotein MYC [28]. Roles of PRMTs have also been characterized in pancreatic cancers, especially in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) cells and tissues whereby *PRMT1* is found to be overexpressed and is associated with a shorter overall survival and a poorer differentiation status. The heat-shock protein HSP70 has been found to be methylated on specific arginine residues, leading to the regulation of PDA cell drug resistance [29].

Globally, the overexpression of PRMTs is associated with a bad prognosis, thus, explaining the interest on using inhibitors against these proteins as a novel therapeutic strategy. In this review, the roles of PRMTs in the formation of blood cells and in hematological malignancies will be discussed. Moreover, since PRMT inhibition has become a novel and promising therapeutic strategy, we will focus on PRMT inhibitors that are currently used in various models of hematological malignancies and their involvement in clinical trials.

2. Involvement of PRMTs in Hematopoiesis and Hematological Malignancies

2.1. PRMT1

PRMT1 has been identified as the predominant arginine methyltransferase in rat fibroblast cells, and it has been reported that this enzyme contributes to most activities of the PRMTs in mouse tissues [30].

In hematopoiesis, various roles of this enzyme have been demonstrated. Indeed, in hematopoietic cell differentiation, PRMT1 methylates the Runt-related transcription factor 1 (RUNX1), which is involved in hematopoiesis and myeloid differentiation. This methylation occurs on residues R206 and R210 and leads to a positive regulation of transactivation functions of RUNX1 [31]. The biological effects of R206 and R210 methylation on RUNX1 are highlighted using a new mouse model harboring a double arginine-to-lysine mutation (*Runx1*^{KTAMK/KTAMK} mice). The arginine methylation of RUNX1 by PRMT1 is dispensable for T-cell development inside the thymus of these mice, although this modification seems necessary for the maintenance of the peripheral CD4⁺ T-cell population [32]. In primary human CD34⁺ cord blood cells, PRMT1-mediated RUNX1 methylation controls the transcription of the *Integrin Subunit Alpha 2b (CD41)* gene—an early marker of definitive hematopoiesis that is also expressed in megakaryocytic cells and multipotent progenitor cells [31]. The overexpression of PRMT1 in human CD34⁺ hematopoietic stem

cells (HSCs) induces a decrease in *CD41* expression over megakaryopoiesis induced by thrombopoietin (TPO). Therefore, PRMT1 may contribute to the negative regulation of TPO-induced megakaryocytic differentiation [33]. Moreover, another recent study has shown that the pharmacological inhibition of PRMT1 enhances megakaryocytic differentiation in the context of myelodysplastic syndrome (MDS) [34].

PRMT1 expression is relatively low in long-term hematopoietic stem cells (LT-HSCs), whereas its expression is high in myeloid progenitor cells, with the highest expression found in megakaryocyte-erythrocyte progenitors (MEPs). The inhibition of PRMT1 in human $CD34^+$ HSCs leads to an increase in mature megakaryocyte frequency [35]. These findings are consistent with a more recent study demonstrating that *Prmt1* knockout (KO) mice display a decrease in megakaryocyte progenitors. In addition, the depletion of *Prmt1* causes the development of strong anemia and leukopenia [36]. A chemical probe that recognizes specifically PRMT1 called E84 has been generated to define unknown hematopoietic subpopulations with unique epigenetic signatures in blood lineages. Indeed, the PRMT1 expression and staining intensity of E84 are positively correlated and $Lin^- Sca1^+ cKit^+$ (LSK) cells can be divided into subgroups depending on their E84 brightness. As previously shown, $E84^{low}$ cell population contains more LT-HSCs with an enrichment of the signaling lymphocyte activation molecule family (SLAM) progenitors [37].

In more mature cell types, such as monocytes and macrophages, various functions of PRMT1 have been highlighted. PRMT1 controls major histocompatibility complex (MHC) class I through the existence of an HIF1 α -PRMT1 regulatory loop and the regulation of Human leukocyte antigen (HLA)-B expression [38]. It also regulates the methylation of class II MHC transactivator (CIITA), thus, promoting its degradation [39]. In macrophages, PRMT1 methylates GAPDH, suppressing its S-nitrosylation induced by lipopolysaccharides (LPS) and interferon gamma (IFN γ), leading to the inhibition of macrophage cell death [40].

A role of PRMT1 in pre-B cells has been identified via its interaction with BTG2. The PRMT1-BTG2 complex modulates pre-B cell differentiation through the methylation of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), and the complex is also able to impair the pre-B acute lymphoid leukemia (ALL) induction [41]. Although PRMT1 seems dispensable for the mature B-cell number, phenotype, or distribution in the mouse spleen, this enzyme has a role in their activation and differentiation. Moreover, PRMT1 is required in B cells for several processes involved in humoral immunity [42] and for their functionality, as *Prmt1*^{-/-} mice display defects in the antibody response from T-cell-independent, but not from T-cell-dependent, antigen stimulation [43].

A role for PRMT1 has also been highlighted in T cells, more precisely in T-cell polyfunctionality. Indeed, PRMT1-positive $CD8^+$ T cells produce higher levels of interleukin (IL)-2 and are associated with enhanced polyfunctionality—this effect resulting from an epigenetic regulation of effector gene expression through the methylation of H4R3 by PRMT1 [44]. It has also been determined that PRMT1 could regulate Th17 differentiation by controlling the reciprocal recruitment of the signal transducers and activators of transcription STAT3 and STAT5 via H4R3 methylation, thus, resulting in the activation of *IL-17* gene expression [45]. In $CD4^+$ T cells, PRMT1 methylates forkhead box P3 (FOXP3) at residues R48 and R51, and the inhibition of their interaction leads to a decrease in $CD4^+$ T-cell activity, showing that the arginine methylation of FOXP3 accentuates suppressive functions of T cells [46]. GFI1 is a transcriptional factor expressed in T cells and has a role in the regulation of cellular processes such as DNA damage signaling and repair protein expression. The requirement of GFI1 for the binding of PRMT1 with its substrates MRE11 and 53BP1 allows their methylation [47].

In addition to normal hematopoiesis, PRMT1 has a central position in leukemogenesis, and its roles have been characterized in acute myeloid leukemia (AML) and ALL.

In mixed-lineage leukemia (MLL)-rearranged ALL, the methylation of the tyrosine kinase FLT3 on arginine R972 and R973 by PRMT1 controls leukemia cell maintenance in vitro. FLT3-arginine-mutated ALL cell transplantation significantly extended mouse survival compared to FLT3 wild-type (WT) cells. *PRMT1* knockdown favors the eradication

of MLL-rearranged ALL cells as well as its inhibition, especially when combined with a tyrosine kinase inhibitor [36]. In the context of AML, PRMT1 also catalyzes the methylation of the FLT3-ITD⁺ fusion protein at residues R972 and R973. *PRMT1* knockdown blocks leukemic cell survival and growth with a more potent inhibitory effect in FLT3-ITD⁺ cells than in FLT3 WT AML cells [48]. In LSK-derived MLL-cancer stem cells, the PRMT1 function is coregulated by β -catenin and Hoxa9; by mediating similar signaling pathways as β -catenin and Hoxa9, PRMT1 is directly involved in leukemic cell self-renewal [49].

In AML, the MLL-ELN fusion protein cooperates with PRMT1 to promote H4R3 methylation as an oncogenic transcriptional regulatory complex. The direct fusion of MLL with PRMT1 increases hematopoietic cell self-renewal [50]. KMT2A-GAS7 (MLL-GAS7) or KAT6A-NCOA2 (MOZ-TIF2) AML mouse models reveal that the recruitment of PRMT1 is necessary but not sufficient for leukemia induction. The co-recruitment of PRMT1 with the histone demethylase KDM4C by the AML fusion proteins controls the H3K9me3 status of target genes. The suppression of *PRMT1* inhibits leukemogenesis and increases cell apoptosis in these two AML fusion protein models [51].

RUNX1-RUNX1T1 (RUNX1-ETO) is another fusion protein resulting from the t(8;21)(q22;q22) translocation in AML. AE9a is a splice isoform of RUNX1-ETO and is methylated by PRMT1 at residue R142, thus, activating the transcription of AE9a target genes. Knockdown of *PRMT1* suppresses proliferation and decreases the self-renewal of progenitor cells [52].

RNA splicing represents another process regulated by PRMT1 through the methylation of the RNA-binding protein RBM15 at R578 in acute megakaryocytic leukemia. PRMT1 physically interacts with the E3 ligase responsible for RBM15 ubiquitination leading to its degradation, thus, inhibiting the megakaryocytic differentiation [35]. This PRMT1/RBM15 axis for megakaryopoiesis regulation was also later described in normal human HSCs [53]. It has also been demonstrated that PRMT1 is involved in RNA splicing in ALL, and elevated levels of *PRMT1*, *serine and arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1)* mRNA are detected in newly diagnosed pediatric ALL samples compared to complete remission samples. Interestingly, the two proteins interact in ALL in vitro models. SRSF1 has an anti-apoptotic role and could contribute to leukemogenesis by cooperating with PRMT1 [54].

2.2. CARM1 (PRMT4)

CARM1 is essential for the survival of early T-cell progenitors but is dispensable for their differentiation. CARM1 modulates hematopoietic progenitor cell activity and cellularity in the fetal liver and in the bone marrow. In *Carm1* KO mice, thymopoiesis is blocked between the DN1 and DN2 stages [55] as the thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein is methylated by CARM1 at residue R650 in immature T cells. This methylation leads to an increase in early thymocyte progenitor differentiation. Moreover, *Carm1* KO mice bear aberrant T-cell development, underlining the importance of CARM1 in the promotion of thymocyte differentiation [56].

CARM1 gene expression increases after the CD3/CD28 activation of T cells. As a result, in lymphoma cell lines stimulated with LPS, CARM1 expression is augmented, triggering caspase 3 activation, resulting in lymphocyte cell death. Similar results are obtained in spleens of mice injured either with LPS or in a polymicrobial sepsis model [57]. The activation of MHC II through CIITA-dependent transcription is enhanced by the methyltransferase activity of CARM1, as also demonstrated for PRMT1 [39]. CIITA-dependent transcription is mediated by the methylation of the CREB-binding protein by CARM1 at residues R714, R742, and R768—this methylation is required for its association with the HLA-DRA promoter [58].

CARM1 is also important in erythropoiesis through its direct interaction with the chromatin remodeler Mi2. CARM1 and Mi2 form a complex with the transcription factor c-Myb and regulate the c-Myb target gene's transcription in several leukemia cell lines. The depletion of either CARM1 or Mi2 in erythroleukemia cell lines results in proliferation and differentiation deregulation, as seen with the depletion of c-Myb in the same models [59].

AML initiation is dependent on CARM1. Indeed, *Carm1*-deficient mice failed to develop leukemia even one year after transplantation. It is also essential for AE9a-driven leukemia maintenance, as mice depleted for *Carm1* show significant improvements in survival compared to wild types. This effect is due to the methyltransferase activity of CARM1 on fusion oncoproteins [60].

PRMTs can be post-transcriptionally regulated by microRNAs (miRNAs), modulating their methyltransferase activity. CARM1 can repress miR-223 expression through the methylation of RUNX1 at residue R223, leading to a blockade of myeloid differentiation, and conversely, CARM1 expression is repressed post-transcriptionally by miR-223. The knockdown of *CARM1* induces myeloid differentiation of AML cell lines and reduces the leukemia burden in vivo [61].

2.3. PRMT5

PRMT1 and PRMT5 are the most studied PRMTs among the nine members of this protein family. The precise roles of PRMT5 are well known both in hematopoiesis and in several hematological malignancies (Figure 2).

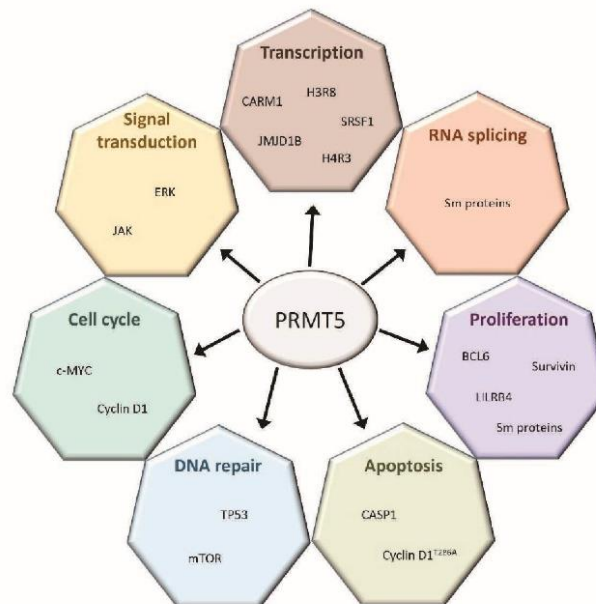


Figure 2. PRMT5 regulates a broad spectrum of cellular processes. PRMT5 interacts with many coding and non-coding genes involved in a large set of cellular functions.

In normal hematopoietic cells, PRMT5 is responsible for the negative regulation of HSCs and progenitor cell proliferation as its overexpression leads to a decreased colony formation ability of the cells. Alterations of both erythroid and granulomonocytic differentiations when *PRMT5* is knocked down are also reported. The phosphorylation of PRMT5 by the Janus kinase 2 active mutant JAK2^{V617F} impairs its methylation activity, resulting in the control of hematopoietic cell populations and differentiation pathways [62]. It was further demonstrated that deletion of *Prmt5* in mice provokes severe pancytopenia and loss of hematopoietic progenitor cells to the benefit of LSK and LT-HSCs. The loss of *Prmt5* deeply affects erythroid differentiation in bone marrow and early thymocyte development in the thymus. In bone marrow cells, *Prmt5* is pivotal to maintain cytokine signaling as deletion of this methyltransferase produces a decrease in the expression of several cytokine receptors [63]. Furthermore, *Prmt5* depletion in mice impairs the genomic stability of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs), inducing increased DNA

damage accumulation and HSPC cell cycle arrest. This effect is due to an overactivation of the p53 pathway, an activation of mTOR signaling as well as a splicing defect of key DNA repair factors, as demonstrated for the lysine acetyltransferase TIP60/KAT5 [64,65]. The PRMT5 methyltransferase can cooperate with the lysine demethylase JMJD1B to control the symmetric demethylation of H4R3 at promoters of hematopoietic genes, provoking a complex transcription regulation of key genes for HSPC survival, proliferation, and differentiation [66].

Zebrafish models have shown that *prmt5* is necessary for blood cell formation, although it is dispensable for blood vessel formation. Prmt5 promotes vascular morphogenesis through the regulation of gene expression by acting as a scaffold protein for chromatin structure [67].

PRMT5 not only has a role in HSPCs but also in T-cell differentiation and more precisely in the CD8⁺ T-cell development. The T-cell-specific depletion of PRMT5 enforces differentiation into Klrp1⁺ effector T cells through the loss of the epigenetic marks H4R3me2s and H3R8me2s, enhancing *B lymphocyte-induced maturation protein-1* transcription [68].

In multiple myeloma (MM) patients, PRMT5 is often overexpressed and is associated with decreased progression-free survival and overall survival [69]. In MM cell lines, PRMT5 controls pyroptosis through the silencing of caspase 1 (*CASP1*). The knockdown of *PRMT5* induces *CASP1* and cleaved *CASP1* expression, and pyroptosis could be rescued in this model by knocking down *CASP1* [70].

In B-cell chronic lymphoid leukemia (CLL) cell lines, the overexpression of *PRMT5* is due to its enhanced translation, caused by an alteration of the expression of miR-19a, -25, -32, -92b, and -96, which targets PRMT5. The upregulation of its expression leads to the silencing of PRMT5 target genes through its epigenetic role at H4R3 and H3R8, especially the retinoblastoma family of tumor suppressor genes [71].

Similar observations reported in mantle cell lymphoma (MCL) show that MCL cell lines with an enhanced PRMT5 expression display aberrant expressions of miR-92b and miR-96. In MCL patient samples, increased PRMT5 expression inhibits the *suppressor of tumorigenicity 7 (ST7)* gene expression via an altered H4R3 and H3R8 methylation profile. Interestingly, the knockdown of *PRMT5* impairs transformed B-cell proliferation and growth [72]. It was further discovered that knockdown of *PRMT5* in B-cell lymphoma cell lines epigenetically increases the expression of miR-33b and miR-96 as previously described, and miR-503. These miRNAs are predicted to bind both Cyclin D1 and c-MYC to reduce their expressions, thus, decreasing B-cell lymphoma cell survival [73].

PRMT5, a driver oncogene in cooperation with nuclear Cyclin D1T286A is also involved in other driver oncogene pathogenesis in aggressive T-cell lymphoma and leukemia. Cyclin D1^{T286A} activates PRMT5 through the phosphorylation of the methylome protein 50 (MEP50), leading to methylation followed by an inhibition of p53-dependent apoptosis of leukemia and lymphoma cell lines [74].

In non-Hodgkin lymphoma (NHL), PRMT5 modulates the TP53/NF-κB p52/BCL3 pathway, which enhances Cyclin D1 proliferative signaling. In addition, the overexpression of PRMT5 epigenetically reduces retinoblastoma proteins' RB1 and RBL2 activity and increases the Polycomb-repressive complex 2 (PRC2) expression in NHL patient samples [75]. This enhanced Cyclin D1, c-MYC, and Survivin expression results from an epigenetic repressive role of PRMT5 at WNT/β-Catenin antagonist *AXIN2* and *WIF1* promoters. This repression generates a constitutive activation of AKT/GSK3 and WNT/β-Catenin signaling pathways [76].

During lymphomagenesis, MYC directly upregulates PRMT5 expression, thus, protecting Sm protein activity, leading to the transcription of genes involved in RNA splicing, cell survival, and proliferation. Anti-proliferative and anti-apoptotic effects are observed in *PRMT5*-depleted B-cell lymphoma using antisense oligonucleotides through the alteration of splicing of genes involved in lymphomagenesis [77]. Following a B-cell receptor activation and triggering of the PI3K/AKT signaling pathway, MYC-mediated *PRMT5* transcription induces cell cycle progression, increasing cell survival and proliferation in

both activated B-cell (ABC) and germinal center (GC) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). In ABC DLBCL, *PRMT5* transcription is also stimulated through the activation of the BTK-mediated NF- κ B pathway [78]. In germinal centers, B-cell lymphoma 6 (BCL6) is methylated at residue R305 by PRMT5, giving rise to GC formation, affinity maturation, and B-cell lymphoma survival and proliferation [79].

In leukemia cell lines, the H3R2 and H3R8 symmetrical dimethylation by PRMT5 antagonizes H3K27 trimethylation by PRC2, thus, maintaining the transcription of target genes, resulting in proliferative effects and cell cycle activation [80].

PRMTs can also interact with each other as it was recently discovered for PRMT5. Indeed, PRMT5 methylation at residue R505 by CARM1 in vitro is essential for its methyltransferase activity, especially on histone 4 at the promoters controlling the β -globin gene (*HBB*) expression, thus, reducing the latter [81].

Various roles of PRMT5 have also been recently characterized in AML, and its methyltransferase activity is important for the development of the MLL-AF9 rearranged types of AML. New substrates have been identified, including many proteins involved in mRNA end processing, splicing, and binding. In AML cell lines, the methylation of SRSF1 by PRMT5 affects its binding to mRNAs and proteins [82]. In MLL-AF9 AMLs, the PRMT5 expression depends on *CDC73*, which is part of the PAF complex to promote the expression of other oncogenic factors such as *STAT5* and *HOXA9* [83]. The overexpression of PRMT5 leads to an increase in leukemia cell growth, especially in FLT3-ITD primary blasts compared to FLT3-WT patients. Conversely, the depletion of PRMT5 significantly decreases AML cell growth either in vitro or in vivo [18]. Patients with newly diagnosed or recurrent AML display an increased expression of *PRMT5*, and a positive correlation is found with the expression of the *leukocyte immunoglobulin-like receptor B4* (*LILRB4*). *LILRB4* expression is triggered by the activation of the mTOR pathway by PRMT5, enhancing the invasion of AML cells [84].

PRMT5 is also highly expressed in acute promyelocytic leukemia (APL), an AML subtype mainly driven by the PML-RAR α oncoprotein. PRMT5 suppresses both the ubiquitination and degradation of PML-RAR α and inhibits its interaction with the E3 ubiquitin ligase RNF4 through its methylation, thus, contributing to leukemic cell proliferation [85].

2.4. PRMT6

Little is known about the role of PRMT6 in hematopoiesis or hematological malignancies. In AML, demethylated H3R2 is considered as the main methylation site of PRMT6 in vivo. The activity of this enzyme is reduced in the presence of the H3K4 or H3K9 methylation marks, but can be slightly enhanced when H3K27 is methylated [86]. The inhibition of H3R2me2a by H3K4 trimethylation is the consequence of the binding of an MLL methyltransferase complex involving WDR5. Conversely, PRMT6 inhibits the transcription of genes known to be regulated by H3K4me3 such as Hox- and Myc-dependent genes by preventing the interaction of MLL complexes with the histone 3 tail [4].

The knockdown of *PRMT6* in erythroleukemic cells resulted in a significantly decreased proliferation and an increase in cells in the G1 phase of the cell cycle due to a reduced *Cyclin D1* expression. In normal leukemic cells, LEF1 (lymphoid enhancer-binding factor-1) interacts with PRMT6, provoking its recruitment at the *Cyclin D1* promoter [87].

PRMT6 is also able, like PRMT1 [31], to interact with RUNX1, negatively affecting megakaryocytic gene expression, thus, repressing the differentiation of human CD34⁺ progenitor cells. Upon megakaryocytic differentiation by TPO, the H3R2 methylation mark is lost for the benefit of the H3K4 methylation increasing the *inter alia* *IL6ST* gene expression through the action of the protein arginine deiminase PADI4 at *SCL/TAL1* (*stem cell leukemia/T-ALL-1*)-target gene expression activation [88,89]. More recent data confirmed that PRMT6 has an important role in the regulation of erythroid differentiation in primary human CD34⁺ cells via its recruitment as a repressor at the promoters of erythroid genes such as *glycophorin A* (*GPA*), whose expression is controlled by *SCL/TAL1* [90]. There is an increased RUNX1 and PRMT6 co-occupancy at the *KLF1* promoter upon megakaryocytic differentiation—

KLF1 is a transcription factor also involved in the maturation of erythroid cells. The inhibition of PRMT6 could promote erythroid differentiation by decreasing the repressive function of the RUNX1 and PRMT6 concomitant actions at the *KLF1* promoter [91].

2.5. PRMT7

PRMT7 is the only known PRMT with a single monomethylation activity on arginine. Activation of the NF- κ B pathway in monocytes leads to *PRMT7* transcription, thus, increasing the monomethylation of histones. Moreover, a reduced expression of *PRMT7* is correlated with a decreased recruitment of monocytes at the injury site, suggesting that PRMT7 could promote monocyte migration [92].

Conditional *CD19* KO mice for Prmt7 (*Prmt7*-CKO) display normal B-cell differentiation in bone marrow and the impairment of mature B-cell formation in the spleen. Moreover, the loss of PRMT7 promotes GC formation and, as shown for PRMT5, PRMT7 can bind to the promoter of *Bcl6*, the master regulator of GC maintenance, to inhibit its functions, leading to a regulation of GC formation [93].

High levels of *PRMT7* transcripts are found in T-ALL, especially in mature subtypes of T-ALL. The genetic depletion of *Prmt7* reduces colony formation and cell viability of T-ALL cells, and most of the differentially monomethylated proteins in *Prmt7* KO cells belong to protein complexes that affect RNA and DNA processing. More importantly, these cells harbor an altered RUNX1 monomethylation status, thus, deregulating the RUNX1-target gene expression. Among them, *BCL11A* and *DNTT*, which are regulators of T-cell development, are identified, indicating that PRMT7 has an indirect role in the pathogenesis of T-ALL through RUNX1 monomethylation [94].

Targeting *PRMT7* through genetic deletion or inhibition delays chronic myeloid leukemia (CML) development and prevents the self-renewal of leukemic stem cells (LSCs) both in mouse and human CML models. The loss of PRMT7 functions results in reprogramming glycine metabolism that induces the generation of toxic methylglyoxal, hence, the eradication of LSCs [95].

2.6. Other PRMTs

The analysis of RNA sequencing data from *RUNX1*-mutated AML patients revealed that *PRMT8* is found among the top 10 of *RUNX1* mutation-associated hub genes [96]. *PRMT8* and *PRMT3* have also been identified as downregulated tumor suppressor genes in pediatric acute monoblastic leukemias [97]. Furthermore, a real-time PCR array has shown that *PRMT2* seems to be downregulated in pediatric ALL [98].

3. Pharmacological Inhibition of PRMTs in Hematological Malignancies

Table 1 presents the chemical tools that have been developed to inhibit the activity of PRMTs in hematological malignancies. They have been tested in several models including primary samples from patients, xenografts of primary specimens into immunodeficient mice, mouse models of hematological malignancies, and human cell lines.

Table 1. Tool compounds for PRMT inhibition in hematological malignancies.

PRMT(s) Inhibited	Drug (Alias)	IC ₅₀	Disease	Experimental Models	References
Type I PRMTs	MS023 [99]	30 nM (PRMT1) 119 nM (PRMT3)	ALL	Cell lines; primary specimens; PDX	[36]
		83 nM (CARM1) 4 nM (PRMT6) 5 nM (PRMT8)	AML	Cell lines; primary specimens; PDX	[48,100]
	Compound 28d [101]	1.1 nM (PRMT1) 22 nM (PRMT3) 63 nM (CARM1) 1.2 nM (PRMT6) 1.1 nM (PRMT8)	MLL	Cell lines	[101]
PRMT1	AMI-408 (compound 4) [102]	ND	AML	Cell lines; mice xenografts	[51]
	TC-E 5003(compound 2e) [103]	1 µM	ALL	Cell lines	[36]
			AML	Cell lines	[48]
	RM-65 [104]	55 µM	AML	Cell lines	[52]
DB75 (Furamidine) [105]	9.4 µM	AMKL	Cell lines	[35]	
CARM1	EPZ025654 (GSK35336023) [106]	3 nM	AML	Cell lines; primary specimens; PDX	[60]
	TP-064 [107]	<10 nM	NHL	Cell lines	[108]
			MM	Cell lines	[107]
	EZM2302 (GSK3359088) [106]	6 nM	MM	Cell lines; xenografted mice gavage	[106]
			AML	Transplanted mice gavage	[60]
NHL	Transplanted mice gavage	[108]			
PRMT5	EPZ015666 (GSK3235025) [109]	22 nM	AML	Cell lines; primary specimens; transplanted mice gavage	[82,83,100,110]
			CLL	Cell lines	[111]
			NHL	Cell lines; PDX	[78]
	EPZ015866 (GSK3203591) [112]	4 nM	MM	Cell lines; primary specimens; xenografted mice gavage	[69]
			NHL	Cell lines; primary specimens	[79,113]
	EPZ015938 (GSK3326595) [113]	6.2 nM	MM	Cell lines	[70]
			AML	Cell lines	[100,114]
GSK3186000A (compound 14) [112]	11 nM	AML	Cell lines; PDX; transplanted or xenografted mice gavage	[78,113]	
			AML	Cell lines	[64,80]

Table 1. Cont.

PRMT(s) Inhibited	Drug (Alias)	IC ₅₀	Disease	Experimental Models	References
	PJ-68 [115]	517 nM	CML	Cell lines; primary specimens; intraperitoneally injected transplanted mice	[115]
	HLCL-61 [18]	7.21–21.46 μ M	AML	Cell lines; primary specimens	[18]
	LLY-283 [116]	22 nM	AML	Cell lines	[114]
	CMP-5 [117]	ND	NHL	Cell lines; mouse primary specimens	[76]
	C220 [118]	ND	MPN	Cell lines; transplanted mice gavage	[118]
PRMT7	JS1310 [95]	5 μ M	CML	Leukemic mice; primary specimens; PDX	[95]

ALL: acute lymphoid leukemia; AML: acute myeloid leukemia; MLL: mixed lineage leukemia; ND: not determined; PDX: patient-derived xenograft; AMKL: acute megakaryoblastic leukemia; NHL: non-Hodgkin lymphoma; MM: multiple myeloma; CLL: chronic lymphoid leukemia; CML: chronic myeloid leukemia; MPN: myeloproliferative neoplasm.

Several PRMT1 and Type I inhibitors exhibit the same effects on AML cell lines with an inhibition of cell growth and a decreased viability of cells [48,51,52,100,101,105]. In mouse AML xenografts, an increase in the overall survival of mice is demonstrated [51]. This effect is synergistic when combined with a tyrosine kinase inhibitor (TKI) in patient-derived xenograft (PDX) models of AML [48] and ALL [36].

Several CARM1-specific inhibitors have also been developed. They show decreased growth of NHL [108], MM [107], and viability of AML cell lines [60]. The gavage of mice with the orally bioavailable CARM1 inhibitor EZM2302 improves survival in an AML model [60] and decreases growth in NHL [108] and MM mouse models [106]. Involvement of CARM1 in the control of the cell cycle is also highlighted, as inhibited cell lines reveal an increased cell cycle arrest in MM [107] and NHL models [108].

In the past few years, PRMT5 inhibitors have been widely tested, especially on AML and NHL. A decrease in cell viability and cell proliferation as well as an increase in apoptosis and cell cycle arrest have been demonstrated in both AML and NHL cell lines treated with PRMT5 inhibitors [18,76,79,80,82,83,110,113,114,119]. PRMT5 inhibition in AML cell lines also leads to an increase in DNA damage in the cells, thus, explaining the increase in leukemic cell death. Indeed, PRMT5 inhibition can sensitize leukemic cells to PARP inhibitors while sparing the normal hematopoietic compartment [64]. As previously described in AML, treatment with a PRMT5 inhibitor impairs DNA repair mechanisms in CLL cell lines. This effect is enhanced when combined with a PARP inhibitor, leading to increased cell death [111].

In MM cell lines, treatment with a PRMT5 inhibitor decreases the levels of H4R3me2s at the *CASP1* promoter, thus, enhancing the pyroptosis of myeloma cells [70]. A decrease in cell proliferation and an increase in apoptosis are also demonstrated in MM with a PRMT5 inhibitor. Moreover, orally treating mice reduces MM growth in vivo [69].

A decrease in a colony-forming ability was observed in CML cell lines and human primary CML cells treated with a PRMT5 inhibitor [115]. PRMT5 inhibition has also been studied in mouse models. A prolonged overall survival of treated mice associated with fewer LSCs is shown in CML—this effect is enhanced in combination with a TKI [115]. Inhibiting PRMT5 in mouse models of NHL and AML extend the survival of mice and promote apoptosis [78,83,113].

PRMT5 inhibition has also been studied in myeloproliferative neoplasms (MPN), especially in JAK2-mutated MPN with a decreased proliferation both in vitro and in patient samples. There is an altered methylation of the E2F1 transcription factor, thus, impacting the cell cycle and DNA damage repair target genes. When combined with JAK1/2 inhibitors, PRMT5 inhibition significantly increases the cell death of MPN cells in vivo [118].

So far, only one PRMT7 inhibitor has been tested in different CML models. JS1310 treatment significantly increases the survival of CML mice and reduces splenomegaly, tumor burden, as well as the number of leukemic stem and progenitor cells in bone marrow and the spleen. Primary CML CD34⁺ cells display increased apoptosis and a lower colony-forming ability when treated with the PRMT7 inhibitor. When xenografted into mice, JS1310-treated primary CML cells induce a decrease in myeloid cell formation [95].

Other PRMT inhibitors have been developed, but studies on their effects on hematological malignancies are restrained. In this context, PRMT1 inhibitors E-84 [120], K313 [121]; the CARM1 inhibitor compound 49 [122]; and the PRMT5 inhibitors Y2431 [123], C_4 [119], JNJ-64619178 [124], compound 5, and compound 19 [125] should be mentioned. In addition, we must mention that the development of the transition state mimics potent CARM1 inhibitors from PABP1-derived peptides that are covalently linked to an adenosine moiety [126].

4. Clinical Trials

Among all the anti-PRMT molecules developed so far, PRMT5 inhibitors represent the most promising potential therapeutic drugs. PRMT5 is the most-expressed PRMT in a large set of cell types and human tissues, and the various roles of PRMT5 are well characterized either in normal hematopoiesis or in hematological malignancies. Moreover, Type I PRMT and specific PRMT5 inhibitors have shown strong results both on leukemia and lymphoma cell lines and in several mouse models of hematological malignancies, thus, explaining their use in clinical trials. There are currently six clinical trials involving Type I and PRMT5 inhibitors in hematological malignancies (Table 2).

Table 2. Clinical trials involving PRMT inhibitors in hematological malignancies.

Trial Number	Official Title of the Study	Number of Patients	Drug (Alias)	PRMT Inhibited	HM Included
NCT03666988	A Phase I, open-label, dose-escalation study to investigate the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity of GSK3368715 in patients with solid tumors and DLBCL.	31	GSK3368715 (EPZ019997)	Type I PRMTs	DLBCL
NCT03614728	A Phase I/II Study to investigate the safety and clinical activity of GSK3326595 and other agents in patients with MDS and AML.	30	GSK3326595 (Pemrametostat)	PRMT5	MDS; CMML; AML
NCT02783300	A Phase I, open-label, dose-escalation study to investigate the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity of GSK3326595 in patients with solid tumors and NHL.	322	GSK3326595 (Pemrametostat)	PRMT5	NHL
NCT03573310	A Phase I, first in-human, open-label study of the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of JNJ-64619178, an inhibitor of PRMT5 in patients with advanced cancers.	114	JNJ-64619178 (Onametostat)	PRMT5	B NHL; lower risk MDS

Table 2. Cont.

Trial Number	Official Title of the Study	Number of Patients	Drug (Alias)	PRMT Inhibited	HM Included
NCT03886831	A Phase I, open-label, multicenter, dose-escalation, dose-expansion study of PRT543 in patients with advanced solid tumors and hematologic malignancies.	227	PRT543	PRMT5	DLBCL; myelodysplasia; myelofibrosis; MCL; AML; CML
NCT04089449	A Phase I, open-label, multicenter, dose-escalation and -expansion study of PRT811 in subjects with advanced solid tumors, CNS lymphoma, and recurrent high-grade gliomas.	145	PRT811	PRMT5	CNS lymphoma

HM: hematological malignancies; DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma; MDS: myelodysplastic syndrome; CMML: chronic myelomonocytic leukemia.

Five out of the six trials are ongoing, with one study (NCT03666988) that is terminated and one study (NCT02783300) that has preliminary results presented in *Annals of Oncology* [127]. These two studies report that even if the use of PRMT inhibitors on patients show promising results for the treatment of hematological malignancies, most patients experienced at least one treatment-related adverse event (TRAE). The most common TRAEs were grade 1 or 2 (including fatigue, anemia, nausea, alopecia) or grade 3 or 4 (including anemia, thrombocytopenia, neutropenia, fatigue). There were no grade 5 related TRAE in either of these studies. Overall, investigators highlight that adverse events are common but manageable.

5. Conclusions

This review summarizes the roles of PRMTs in hematopoiesis and in the different existing hematological malignancies. The importance of arginine methylation for the regulation of HSC differentiation, proliferation, and self-renewal has been highlighted. In a various set of hematological malignancies, they allow the disease progression through the methylation of histone tails that control transcription activation or the repression of target genes. They are also able to directly methylate transcription factors or proteins involved in various cellular processes: RNA splicing and end-processing, DNA damage repair processes, proliferation, cell cycle, and signal transduction in various signaling pathways (Figure 3).

Recently, specific pharmacological PRMT inhibitors have been developed. They participate in a significant improvement in patient conditions in many solid cancers, especially PRMT5 inhibitors that are currently involved in many phase I or II clinical trials. Inhibitors directed against PRMTs type I, i.e., PRMT1, CARM1, PRMT5, and PRMT7, have been tested on hematological malignancy models and have shown a significant decrease in malignant cell proliferation and an increased apoptosis. In mouse models of hematological malignancies, PRMT inhibition leads to an increase in overall survival. There are also ongoing clinical trials involving PRMT5 inhibitors in hematological malignancies, showing, once again, that PRMT inhibition might become a useful therapeutic tool for cancer treatment.

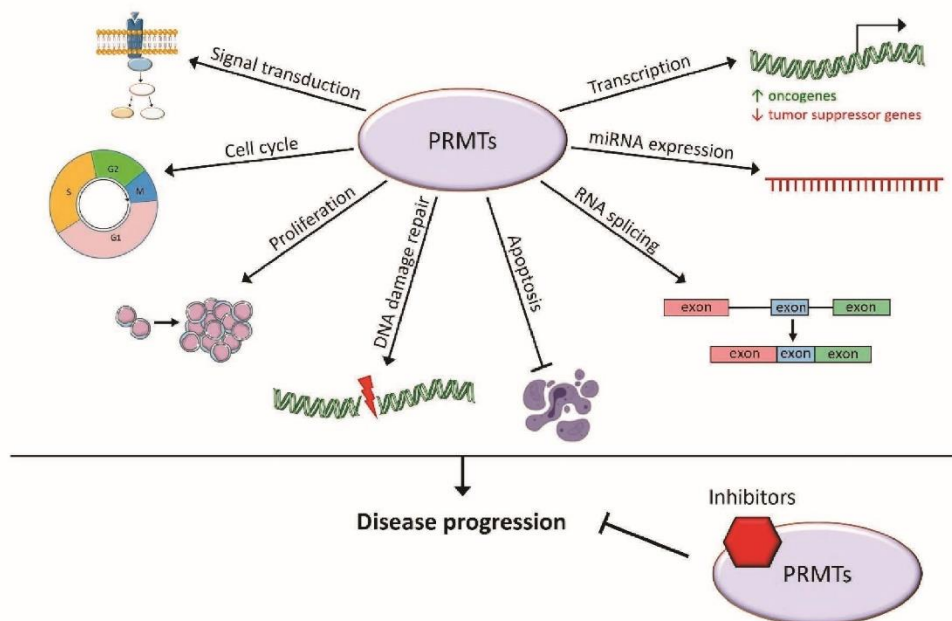


Figure 3. Cellular processes known to be controlled by arginine methylation in hematological malignancies. PRMTs play roles in many cellular functions leading to hematological malignancy progression, and their inhibition has a promising therapeutic effect.

Author Contributions: Conceptualization, C.S., J.S., R.A. and L.D.; writing—original draft preparation, C.S. and L.D.; writing—review and editing, F.G., J.-N.B., B.D., B.P. and M.C.; supervision, R.A. and L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: C.S. fellowship is funded by Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (ECO201906009006) for three years and Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (ARCD0C42022010004491) for one year.

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

References

- Paik, W.K.; Kim, S. Enzymatic Methylation of Protein Fractions from Calf Thymus Nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *29*, 14–20. [CrossRef]
- Bedford, M.T.; Clarke, S.G. Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Mol. Cell* **2009**, *33*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
- Blanc, R.S.; Richard, S. Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol. Cell* **2017**, *65*, 8–24. [CrossRef]
- Guccione, E.; Bassi, C.; Casadio, F.; Martinato, F.; Cesaroni, M.; Schuchlauth, H.; Lüscher, B.; Amati, B. Methylation of Histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL Complex Are Mutually Exclusive. *Nature* **2007**, *449*, 933–937. [CrossRef]
- Wu, Q.; Schapira, M.; Arrowsmith, C.H.; Baryte-Lovejoy, D. Protein Arginine Methylation: From Enigmatic Functions to Therapeutic Targeting. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 509–530. [CrossRef] [PubMed]
- Lorton, B.M.; Shechter, D. Cellular Consequences of Arginine Methylation. *Cell Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 2933–2956. [CrossRef]
- Lorenzo, A.D.; Bedford, M.T. Histone Arginine Methylation. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 2024–2031. [CrossRef] [PubMed]
- Sun, Y.; Teng, Y.; Wang, L.; Zhang, Z.; Chen, C.; Wang, Y.; Zhang, X.; Xiang, P.; Song, X.; Lu, J.; et al. LINC01431 Promotes Histone H4R3 Methylation to Impede HBV Covalently Closed Circular DNA Transcription by Stabilizing PRMT1. *Adv. Sci.* **2022**, *9*, 2103135. [CrossRef]
- Min, Z.; Xiaomeng, L.; Zheng, L.; Yangge, D.; Xuejiao, L.; Longwei, L.; Xiao, Z.; Yunsong, L.; Ping, Z.; Yongsheng, Z. Asymmetrical Methyltransferase PRMT3 Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis via MiR-3648. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 581. [CrossRef]
- Cheng, D.; Gao, G.; Lorenzo, A.D.; Jayne, S.; Hottiger, M.O.; Richard, S.; Bedford, M.T. Genetic Evidence for Partial Redundancy between the Arginine Methyltransferases CARM1 and PRMT6. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 17060–17070. [CrossRef]

11. Kim, J.K.; Lim, Y.; Lee, J.O.; Lee, Y.-S.; Won, N.H.; Kim, H.; Kim, H.S. PRMT4 Is Involved in Insulin Secretion via the Methylation of Histone H3 in Pancreatic β Cells. *J. Mol. Endocrinol.* **2015**, *54*, 315–324. [CrossRef] [PubMed]
12. Chiang, K.; Zielinska, A.E.; Shaaban, A.M.; Sanchez-Bailon, M.P.; Jarrold, J.; Clarke, T.L.; Zhang, J.; Francis, A.; Jones, L.J.; Smith, S.; et al. PRMT5 Is a Critical Regulator of Breast Cancer Stem Cell Function via Histone Methylation and FOXP1 Expression. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 3498–3513. [CrossRef] [PubMed]
13. Karkhanis, V.; Wang, L.; Tae, S.; Hu, Y.-J.; Imbalzano, A.N.; Sif, S. Protein Arginine Methyltransferase 7 Regulates Cellular Response to DNA Damage by Methylating Promoter Histones H2A and H4 of the Polymerase δ Catalytic Subunit Gene, POLD1. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 29801–29814. [CrossRef] [PubMed]
14. Ge, S.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Tian, Y.; Yang, R.; Chen, X.; Li, F.; Zhang, B. Ribavirin Inhibits Colorectal Cancer Growth by Downregulating PRMT5 Expression and H3R8me2s and H4R3me2s Accumulation. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2021**, *415*, 115450. [CrossRef] [PubMed]
15. Okuno, K.; Akiyama, Y.; Shimada, S.; Nakagawa, M.; Tanioka, T.; Inokuchi, M.; Yamaoka, S.; Kojima, K.; Tanaka, S. Asymmetric Dimethylation at Histone H3 Arginine 2 by PRMT6 in Gastric Cancer Progression. *Carcinogenesis* **2018**, *40*, 15–26. [CrossRef]
16. Fulton, M.D.; Brown, T.; Zheng, Y.G. Mechanisms and Inhibitors of Histone Arginine Methylation. *Chem. Rec.* **2018**, *18*, 1792–1807. [CrossRef]
17. Cai, S.; Wang, P.; Xie, T.; Li, Z.; Li, J.; Lan, R.; Ding, Y.; Lu, J.; Ye, J.; Wang, J.; et al. Histone H4R3 Symmetric Di-Methylation by Prmt5 Protects against Cardiac Hypertrophy via Regulation of Filip1L/ β -Catenin. *Pharmacol. Res.* **2020**, *161*, 105104. [CrossRef]
18. Tarighat, S.S.; Santhanam, R.; Frankhouser, D.; Radoska, H.S.; Lai, H.; Anghelina, M.; Wang, H.; Huang, X.; Alinari, L.; Walker, A.; et al. The Dual Epigenetic Role of PRMT5 in Acute Myeloid Leukemia: Gene Activation and Repression via Histone Arginine Methylation. *Leukemia* **2016**, *30*, 789–799. [CrossRef]
19. Dong, F.; Li, Q.; Yang, C.; Huo, D.; Wang, X.; Ai, C.; Kong, Y.; Sun, X.; Wang, W.; Zhou, Y.; et al. PRMT2 Links Histone H3R8 Asymmetric Dimethylation to Oncogenic Activation and Tumorigenesis of Glioblastoma. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4552. [CrossRef]
20. Hu, G.; Yan, C.; Xie, P.; Cao, Y.; Shao, J.; Ge, J. PRMT2 Accelerates Tumorigenesis of Hepatocellular Carcinoma by Activating Bcl2 via Histone H3R8 Methylation. *Exp. Cell Res.* **2020**, *394*, 112152. [CrossRef]
21. Li, J.; Pan, X.; Ren, Z.; Li, B.; Liu, H.; Wu, C.; Dong, X.; Vos, P.; Pan, L.; Sun, J. Protein Arginine Methyltransferase 2 (PRMT2) Promotes Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis by Inhibiting the SOCS3 Promoter via Histone H3R8 Asymmetric Dimethylation. *Br. J. Pharmacol.* **2022**, *179*, 141–158. [CrossRef] [PubMed]
22. Blythe, S.A.; Cha, S.-W.; Tadjuidje, E.; Heasman, J.; Klein, P.S. β -Catenin Primes Organizer Gene Expression by Recruiting a Histone H3 Arginine 8 Methyltransferase, Prmt2. *Dev. Cell* **2010**, *19*, 220–231. [CrossRef] [PubMed]
23. Cura, V.; Cavarelli, J. Structure, Activity and Function of the PRMT2 Protein Arginine Methyltransferase. *Life* **2021**, *11*, 1263. [CrossRef] [PubMed]
24. Jain, K.; Jin, C.Y.; Clarke, S.G. Epigenetic Control via Allosteric Regulation of Mammalian Protein Arginine Methyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 10101–10106. [CrossRef]
25. Yang, Y.; Bedford, M.T. Protein Arginine Methyltransferases and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 37–50. [CrossRef]
26. Hwang, J.W.; Cho, Y.; Bae, G.-U.; Kim, S.-N.; Kim, Y.K. Protein Arginine Methyltransferases: Promising Targets for Cancer Therapy. *Exp. Mol. Med.* **2021**, *53*, 788–808. [CrossRef]
27. Wang, S.-C.M.; Dowhan, D.H.; Muscat, G.E.O. Epigenetic Arginine Methylation in Breast Cancer: Emerging Therapeutic Strategies. *J. Mol. Endocrinol.* **2019**, *62*, R223–R237. [CrossRef]
28. Bryant, J.-P.; Heiss, J.; Banasavadi-Siddagowda, Y.K. Arginine Methylation in Brain Tumors: Tumor Biology and Therapeutic Strategies. *Cells* **2021**, *10*, 124. [CrossRef]
29. Xie, V.K.; He, J.; Xie, K. Protein Arginine Methylation Promotes Therapeutic Resistance in Human Pancreatic Cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2020**, *55*, 58–69. [CrossRef]
30. Tang, J.; Frankel, A.; Cook, R.J.; Kim, S.; Paik, W.K.; Williams, K.R.; Clarke, S.; Herschman, H.R. PRMT1 Is the Predominant Type I Protein Arginine Methyltransferase in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 7723–7730. [CrossRef]
31. Zhao, X.; Jankovic, V.; Gural, A.; Huang, G.; Pardanani, A.; Menendez, S.; Zhang, J.; Dunne, R.; Xiao, A.; Erdjument-Bromage, H.; et al. Methylation of RUNX1 by PRMT1 Abrogates SIN3A Binding and Potentiates Its Transcriptional Activity. *Gene Dev.* **2008**, *22*, 640–653. [CrossRef] [PubMed]
32. Mizutani, S.; Yoshida, T.; Zhao, X.; Nimer, S.D.; Taniwaki, M.; Okuda, T. Loss of RUNX1/AML1 Arginine-methylation Impairs Peripheral T Cell Homeostasis. *Br. J. Haematol.* **2015**, *170*, 859–873. [CrossRef] [PubMed]
33. Chang, Y.-I.; Hua, W.-K.; Yao, C.-L.; Hwang, S.-M.; Hung, Y.-C.; Kuan, C.-J.; Leou, J.-S.; Lin, W.-J. Protein-Arginine Methyltransferase 1 Suppresses Megakaryocytic Differentiation via Modulation of the P38 MAPK Pathway in K562 Cells. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 20595–20606. [CrossRef] [PubMed]
34. Su, H.; Jiang, M.; Senevirathne, C.; Aluri, S.; Zhang, T.; Guo, H.; Xavier-Ferruccio, J.; Jin, S.; Tran, N.-T.; Liu, S.-M.; et al. Methylation of Dual-Specificity Phosphatase 4 Controls Cell Differentiation. *Cell Rep.* **2021**, *36*, 109421. [CrossRef] [PubMed]
35. Zhang, L.; Tran, N.-T.; Su, H.; Wang, R.; Lu, Y.; Tang, H.; Aoyagi, S.; Guo, A.; Khodadadi-Jamayran, A.; Zhou, D.; et al. Cross-Talk between PRMT1-Mediated Methylation and Ubiquitylation on RBM15 Controls RNA Splicing. *Elife* **2015**, *4*, e07938. [CrossRef]
36. Zhu, L.; He, X.; Dong, H.; Sun, J.; Wang, H.; Zhu, Y.; Huang, F.; Zou, J.; Chen, Z.; Zhao, X.; et al. Protein Arginine Methyltransferase 1 Is Required for Maintenance of Normal Adult Hematopoiesis. *Int. J. Biol. Sci.* **2019**, *15*, 2763–2773. [CrossRef]

37. Su, H.; Sun, C.-W.; Liu, S.-M.; He, X.; Hu, H.; Pawlik, K.M.; Townes, T.M.; Han, X.; Klug, C.A.; Henary, M.; et al. Defining the Epigenetic Status of Blood Cells Using a Cyanine-Based Fluorescent Probe for PRMT1. *Blood Adv.* **2018**, *2*, 2829–2836. [CrossRef]
38. Gupta, P.; Singh, A.; Gowda, P.; Ghosh, S.; Chatterjee, A.; Sen, E. Lactate Induced HIF-1 α -PRMT1 Cross Talk Affects MHC I Expression in Monocytes. *Exp. Cell Res.* **2016**, *347*, 293–300. [CrossRef]
39. Fan, Z.; Li, J.; Li, P.; Ye, Q.; Xu, H.; Wu, X.; Xu, Y. Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) Represses MHC II Transcription in Macrophages by Methylating CIITA. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40531. [CrossRef]
40. Cho, J.-H.; Lee, R.; Kim, E.; Choi, Y.E.; Choi, E.-J. PRMT1 Negatively Regulates Activation-Induced Cell Death in Macrophages by Arginine Methylation of GAPDH. *Exp. Cell Res.* **2018**, *368*, 50–58. [CrossRef]
41. Dolezal, E.; Infantino, S.; Drepper, F.; Börsig, T.; Singh, A.; Wossning, T.; Fiala, G.J.; Minguet, S.; Warscheid, B.; Tarlinton, D.M.; et al. The BTG2-PRMT1 Module Limits Pre-B Cell Expansion by Regulating the CDK4-Cyclin-D3 Complex. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 911–920. [CrossRef] [PubMed]
42. Infantino, S.; Light, A.; O'Donnell, K.; Bryant, V.; Avery, D.T.; Elliott, M.; Tangye, S.G.; Belz, G.; Mackay, F.; Richard, S.; et al. Arginine Methylation Catalyzed by PRMT1 Is Required for B Cell Activation and Differentiation. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 891. [CrossRef] [PubMed]
43. Hata, K.; Yanase, N.; Sudo, K.; Kiyonari, H.; Mukumoto, Y.; Mizuguchi, J.; Yokosuka, T. Differential Regulation of T-cell Dependent and T-cell Independent Antibody Responses through Arginine Methyltransferase PRMT1 in Vivo. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 1200–1210. [CrossRef]
44. Sung, B.-Y.; Lin, Y.-H.; Kong, Q.; Shah, P.D.; Bieler, J.G.; Palmer, S.; Weinhold, K.J.; Chang, H.-R.; Huang, H.; Avery, R.K.; et al. Wnt Activation Promotes Memory T Cell Polyfunctionality via Epigenetic Regulator PRMT1. *J. Clin. Investig.* **2022**, *132*, e140508. [CrossRef] [PubMed]
45. Sen, S.; He, Z.; Ghosh, S.; Dery, K.J.; Yang, L.; Zhang, J.; Sun, Z. PRMT1 Plays a Critical Role in Th17 Differentiation by Regulating Reciprocal Recruitment of STAT3 and STAT5. *J. Immunol.* **2018**, *201*, 440–450. [CrossRef] [PubMed]
46. Kagoya, Y.; Saijo, H.; Matsunaga, Y.; Guo, T.; Saso, K.; Anczurowski, M.; Wang, C.-H.; Sugata, K.; Murata, K.; Butler, M.O.; et al. Arginine Methylation of FOXP3 Is Crucial for the Suppressive Function of Regulatory T Cells. *J. Autoimmun.* **2019**, *97*, 10–21. [CrossRef]
47. Vadnais, C.; Chen, R.; Fraszczak, J.; Yu, Z.; Boulais, J.; Pinder, J.; Frank, D.; Khandanpour, C.; Hébert, J.; Delleaire, G.; et al. GF11 Facilitates Efficient DNA Repair by Regulating PRMT1 Dependent Methylation of MRE11 and 53BP1. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1418. [CrossRef]
48. He, X.; Zhu, Y.; Lin, Y.-C.; Li, M.; Du, J.; Dong, H.; Sun, J.; Zhu, L.; Wang, H.; Ding, Z.; et al. PRMT1-Mediated FLT3 Arginine Methylation Promotes Maintenance of FLT3-ITD+ Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2019**, *134*, 548–560. [CrossRef]
49. Siriboonpiputtana, T.; Zeisig, B.B.; Zarowiecki, M.; Fung, T.K.; Mallardo, M.; Tsai, C.; Lau, P.N.L.; Hoang, Q.C.; Veiga, P.; Barnes, J.; et al. Transcriptional Memory of Cells of Origin Overrides B-catenin Requirement of MLL Cancer Stem Cells. *EMBO J.* **2017**, *36*, 3139–3155. [CrossRef]
50. Cheung, N.; Chan, L.C.; Thompson, A.; Cleary, M.L.; So, C.W.E. Protein Arginine-Methyltransferase-Dependent Oncogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 1208–1215. [CrossRef]
51. Cheung, N.; Fung, T.K.; Zeisig, B.B.; Holmes, K.; Rane, J.K.; Mowen, K.A.; Finn, M.G.; Lenhard, B.; Chan, L.C.; So, C.W.E. Targeting Aberrant Epigenetic Networks Mediated by PRMT1 and KDM4C in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 32–48. [CrossRef] [PubMed]
52. Shia, W.-J.; Okumura, A.J.; Yan, M.; Sarkeshik, A.; Lo, M.-C.; Matsuura, S.; Komeno, Y.; Zhao, X.; Nimer, S.D.; Yates, J.R.; et al. PRMT1 Interacts with AML1-ETO to Promote Its Transcriptional Activation and Progenitor Cell Proliferative Potential. *Blood* **2012**, *119*, 4953–4962. [CrossRef] [PubMed]
53. Jin, S.; Mi, Y.; Song, J.; Zhang, P.; Liu, Y. PRMT1-RBM15 Axis Regulates Megakaryocytic Differentiation of Human Umbilical Cord Blood CD34+ Cells. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *15*, 2563–2568. [CrossRef] [PubMed]
54. Zou, L.; Zhang, H.; Du, C.; Liu, X.; Zhu, S.; Zhang, W.; Li, Z.; Gao, C.; Zhao, X.; Mei, M.; et al. Correlation of SRSF1 and PRMT1 Expression with Clinical Status of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Hematol. Oncol.* **2012**, *5*, 42. [CrossRef]
55. Li, J.; Zhao, Z.; Carter, C.; Ehrlich, L.I.R.; Bedford, M.T.; Richie, E.R. Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1 Regulates Fetal Hematopoiesis and Thymocyte Development. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 597–604. [CrossRef]
56. Kim, J.; Lee, J.; Yadav, N.; Wu, Q.; Carter, C.; Richard, S.; Richie, E.; Bedford, M.T. Loss of CARM1 Results in Hypomethylation of Thymocyte Cyclic AMP-Regulated Phosphoprotein and Deregulated Early T Cell Development. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25339–25344. [CrossRef]
57. Lai, Y.; Li, X.; Li, T.; Li, X.; Nyunoya, T.; Chen, K.; Kitsios, G.; Nouraie, M.; Zhang, Y.; McVerry, B.J.; et al. Protein Arginine N-Methyltransferase 4 (PRMT4) Contributes to Lymphopenia in Experimental Sepsis. *Thorax* **2022**, 1–11. [CrossRef]
58. Zika, E.; Fauquier, L.; Vandel, L.; Ting, J.P.-Y. Interplay among Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1, CBP, and CIITA in IFN- γ -Inducible MHC-II Gene Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16321–16326. [CrossRef]
59. Streubel, G.; Bouchard, C.; Berberich, H.; Zeller, M.S.; Teichmann, S.; Adamkiewicz, J.; Müller, R.; Klempnauer, K.-H.; Bauer, U.-M. PRMT4 Is a Novel Coactivator of C-Myb-Dependent Transcription in Haematopoietic Cell Lines. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003343. [CrossRef]

60. Greenblatt, S.M.; Man, N.; Hamard, P.-J.; Asai, T.; Karl, D.; Martinez, C.; Bilbao, D.; Stathias, V.; Jermakowicz, A.M.; Duffort, S.; et al. CARM1 Is Essential for Myeloid Leukemogenesis but Dispensable for Normal Hematopoiesis. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 1111–1127. [e5](#). [[CrossRef](#)]
61. Vu, L.P.; Perna, F.; Wang, L.; Voza, F.; Figueroa, M.E.; Tempst, P.; Erdjument-Bromage, H.; Gao, R.; Chen, S.; Paietta, E.; et al. PRMT4 Blocks Myeloid Differentiation by Assembling a Methyl-RUNX1-Dependent Repressor Complex. *Cell Rep.* **2013**, *5*, 1625–1638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Liu, F.; Zhao, X.; Perna, F.; Wang, L.; Koppikar, P.; Abdel-Wahab, O.; Harr, M.W.; Levine, R.L.; Xu, H.; Tefferi, A.; et al. JAK2V617F-Mediated Phosphorylation of PRMT5 Downregulates Its Methyltransferase Activity and Promotes Myeloproliferation. *Cancer Cell* **2011**, *19*, 283–294. [[CrossRef](#)]
63. Liu, F.; Cheng, G.; Hamard, P.-J.; Greenblatt, S.; Wang, L.; Man, N.; Perna, F.; Xu, H.; Tadi, M.; Luciani, L.; et al. Arginine Methyltransferase PRMT5 Is Essential for Sustaining Normal Adult Hematopoiesis. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 3532–3544. [[CrossRef](#)]
64. Hamard, P.-J.; Santiago, G.E.; Liu, F.; Karl, D.L.; Martinez, C.; Man, N.; Mookhtiar, A.K.; Duffort, S.; Greenblatt, S.; Verdun, R.E.; et al. PRMT5 Regulates DNA Repair by Controlling the Alternative Splicing of Histone-Modifying Enzymes. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 2643–2657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Tan, D.Q.; Li, Y.; Yang, C.; Li, J.; Tan, S.H.; Chin, D.W.L.; Nakamura-Ishizu, A.; Yang, H.; Suda, T. PRMT5 Modulates Splicing for Genome Integrity and Preserves Proteostasis of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 2316–2328. [e6](#). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Li, S.; Ali, S.; Duan, X.; Liu, S.; Du, J.; Liu, C.; Dai, H.; Zhou, M.; Zhou, L.; Yang, L.; et al. JMJD1B Demethylates H4R3me2s and H3K9me2 to Facilitate Gene Expression for Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Rep.* **2018**, *23*, 389–403. [[CrossRef](#)]
67. Quillien, A.; Gilbert, G.; Boulet, M.; Ethuin, S.; Waltzer, L.; Vandel, L. Prmt5 Promotes Vascular Morphogenesis Independently of Its Methyltransferase Activity. *PLoS Genet.* **2021**, *17*, e1009641. [[CrossRef](#)]
68. Zheng, Y.; Chen, Z.; Zhou, B.; Chen, S.; Han, L.; Chen, N.; Ma, Y.; Xie, G.; Yang, J.; Nie, H.; et al. PRMT5 Deficiency Enforces the Transcriptional and Epigenetic Programs of Klrg1+CD8+ Terminal Effector T Cells and Promotes Cancer Development. *J. Immunol.* **2021**, *208*, j2100523. [[CrossRef](#)]
69. Gullà, A.; Hideshima, T.; Bianchi, G.; Fulciniti, M.; Samur, M.K.; Qi, J.; Tai, Y.-T.; Harada, T.; Morelli, E.; Amodio, N.; et al. Protein Arginine Methyltransferase 5 Has Prognostic Relevance and Is a Druggable Target in Multiple Myeloma. *Leukemia* **2018**, *32*, 996–1002. [[CrossRef](#)]
70. Xia, T.; Liu, M.; Zhao, Q.; Ouyang, J.; Xu, P.; Chen, B. PRMT5 Regulates Cell Pyroptosis by Silencing CASP1 in Multiple Myeloma. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 851. [[CrossRef](#)]
71. Wang, L.; Pal, S.; Sif, S. Protein Arginine Methyltransferase 5 Suppresses the Transcription of the RB Family of Tumor Suppressors in Leukemia and Lymphoma Cells. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 6262–6277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Pal, S.; Baiocchi, R.A.; Byrd, J.C.; Grever, M.R.; Jacob, S.T.; Sif, S. Low Levels of MiR-92b/96 Induce PRMT5 Translation and H3R8/H4R3 Methylation in Mantle Cell Lymphoma. *EMBO J.* **2007**, *26*, 3558–3569. [[CrossRef](#)]
73. Karkhanis, V.; Alinari, L.; Ozer, H.G.; Chung, J.; Zhang, X.; Sif, S.; Baiocchi, R.A. Protein Arginine Methyltransferase 5 Represses Tumor Suppressor miRNAs That Down-Regulate CYCLIN D1 and c-MYC Expression in Aggressive B-Cell Lymphoma. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 1165–1180. [[CrossRef](#)]
74. Li, Y.; Chitnis, N.; Nakagawa, H.; Kita, Y.; Natsugoe, S.; Yang, Y.; Li, Z.; Wasik, M.; Klein-Szanto, A.J.P.; Rustgi, A.K.; et al. PRMT5 Is Required for Lymphomagenesis Triggered by Multiple Oncogenic Drivers. *Cancer Discov.* **2015**, *5*, 288–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Chung, J.; Karkhanis, V.; Tae, S.; Yan, F.; Smith, P.; Ayers, L.W.; Agostinelli, C.; Pileri, S.; Denis, G.V.; Baiocchi, R.A.; et al. Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5) Inhibition Induces Lymphoma Cell Death through Reactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Pathway and Polycomb Repressor Complex 2 (PRC2) Silencing. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 35534–35547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Chung, J.; Karkhanis, V.; Baiocchi, R.A.; Sif, S. Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5) Promotes Survival of Lymphoma Cells via Activation of WNT/ β -Catenin and AKT/GSK3 β Proliferative Signaling. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 7692–7710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Koh, C.M.; Bezzi, M.; Low, D.H.P.; Ang, W.X.; Teo, S.X.; Gay, F.P.H.; Al-Haddawi, M.; Tan, S.Y.; Osato, M.; Sabò, A.; et al. MYC Regulates the Core Pre-mRNA Splicing Machinery as an Essential Step in Lymphomagenesis. *Nature* **2015**, *523*, 96–100. [[CrossRef](#)]
78. Zhu, F.; Guo, H.; Bates, P.D.; Zhang, S.; Zhang, H.; Nomie, K.J.; Li, Y.; Lu, L.; Seibold, K.R.; Wang, F.; et al. PRMT5 Is Upregulated by B-Cell Receptor Signaling and Forms a Positive-Feedback Loop with PI3K/AKT in Lymphoma Cells. *Leukemia* **2019**, *33*, 2898–2911. [[CrossRef](#)]
79. Lu, X.; Fernando, T.M.; Lossos, C.; Yusufova, N.; Liu, F.; Fontán, L.; Durant, M.; Geng, H.; Melnick, J.; Luo, Y.; et al. PRMT5 Interacts with the BCL6 Oncoprotein and Is Required for Germinal Center Formation and Lymphoma Cell Survival. *Blood* **2018**, *132*, 2026–2039. [[CrossRef](#)]
80. Liu, F.; Xu, Y.; Lu, X.; Hamard, P.-J.; Karl, D.L.; Man, N.; Mookhtiar, A.K.; Martinez, C.; Lossos, I.S.; Sun, J.; et al. PRMT5-Mediated Histone Arginine Methylation Antagonizes Transcriptional Repression by Polycomb Complex PRC2. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 2956–2968. [[CrossRef](#)]

81. Nie, M.; Wang, Y.; Guo, C.; Li, X.; Wang, Y.; Deng, Y.; Yao, B.; Gui, T.; Ma, C.; Liu, M.; et al. CARM1-Mediated Methylation of Protein Arginine Methyltransferase 5 Represses Human γ -Globin Gene Expression in Erythroleukemia Cells. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 17454–17463. [CrossRef] [PubMed]
82. Radzishchanskaya, A.; Shliaha, P.V.; Grinev, V.; Lorenzini, E.; Kovalchuk, S.; Shlyueva, D.; Gorshkov, V.; Hendrickson, R.C.; Jensen, O.N.; Helin, K. PRMT5 Methylome Profiling Uncovers a Direct Link to Splicing Regulation in Acute Myeloid Leukemia. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2019**, *26*, 999–1012. [CrossRef] [PubMed]
83. Serio, J.; Ropa, J.; Chen, W.; Mysliwski, M.; Saha, N.; Chen, L.; Wang, J.; Miao, H.; Cierpicki, T.; Grembecka, J.; et al. The PAF Complex Regulation of Prmt5 Facilitates the Progression and Maintenance of MLL Fusion Leukemia. *Oncogene* **2018**, *37*, 450–460. [CrossRef] [PubMed]
84. Zhao, L.; Cheng, B.; Xiong, J.; Ma, D.; Liu, X.; Wang, L.; Zhang, X.; Wang, J. Protein Arginine Methyltransferase 5 Promotes the Migration of AML Cells by Regulating the Expression of Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor B4. *BioMed Res. Int.* **2021**, *2021*, 7329072. [CrossRef]
85. Huang, X.; Yang, Y.; Zhu, D.; Zhao, Y.; Wei, M.; Li, K.; Zhu, H.; Zheng, X. PRMT5-Mediated RNF4 Methylation Promotes Therapeutic Resistance of APL Cells to As2O3 by Stabilizing Oncoprotein PML-RAR α . *Cell Mol. Life Sci.* **2022**, *79*, 319. [CrossRef]
86. Hyllus, D.; Stein, C.; Schnabel, K.; Schiltz, E.; Imhof, A.; Dou, Y.; Hsieh, J.; Bauer, U.-M. PRMT6-Mediated Methylation of R2 in Histone H3 Antagonizes H3 K4 Trimethylation. *Gene. Dev.* **2007**, *21*, 3369–3380. [CrossRef]
87. Schneider, L.; Herkt, S.; Wang, L.; Feld, C.; Wesely, J.; Kuvardina, O.N.; Meyer, A.; Oellerich, T.; Häupl, B.; Seifried, E.; et al. PRMT6 Activates Cyclin D1 Expression in Conjunction with the Transcription Factor LEF1. *Oncogenesis* **2021**, *10*, 42. [CrossRef]
88. Herglotz, J.; Kuvardina, O.N.; Kolodziej, S.; Kumar, A.; Hussong, H.; Grez, M.; Lausen, J. Histone Arginine Methylation Keeps RUNX1 Target Genes in an Intermediate State. *Oncogene* **2013**, *32*, 2565–2575. [CrossRef]
89. Kolodziej, S.; Kuvardina, O.N.; Oellerich, T.; Herglotz, J.; Backert, I.; Kohrs, N.; Buscató, E.; Wittmann, S.K.; Salinas-Riester, G.; Bonig, H.; et al. PADI4 Acts as a Coactivator of Tal1 by Counteracting Repressive Histone Arginine Methylation. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3995. [CrossRef]
90. Herkt, S.C.; Kuvardina, O.N.; Herglotz, J.; Schneider, L.; Meyer, A.; Pommerenke, C.; Salinas-Riester, G.; Seifried, E.; Bonig, H.; Lausen, J. Protein Arginine Methyltransferase 6 Controls Erythroid Gene Expression and Differentiation of Human CD34+ Progenitor Cells. *Haematologica* **2018**, *103*, 18–29. [CrossRef]
91. Kuvardina, O.N.; Herglotz, J.; Kolodziej, S.; Kohrs, N.; Herkt, S.; Wojcik, B.; Oellerich, T.; Corso, J.; Behrens, K.; Kumar, A.; et al. RUNX1 Represses the Erythroid Gene Expression Program during Megakaryocytic Differentiation. *Blood* **2015**, *125*, 3570–3579. [CrossRef] [PubMed]
92. Günsel, G.G.; Conlon, T.M.; Jeridi, A.; Kim, R.; Ertüz, Z.; Lang, N.J.; Ansari, M.; Novikova, M.; Jiang, D.; Strunz, M.; et al. The Arginine Methyltransferase PRMT7 Promotes Extravasation of Monocytes Resulting in Tissue Injury in COPD. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1303. [CrossRef]
93. Ying, Z.; Mei, M.; Zhang, P.; Liu, C.; He, H.; Gao, F.; Bao, S. Histone Arginine Methylation by PRMT7 Controls Germinal Center Formation via Regulating Bcl6 Transcription. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 1538–1547. [CrossRef] [PubMed]
94. Oksa, L.; Mäkinen, A.; Nikkilä, A.; Hyvärinen, N.; Laukkanen, S.; Rokka, A.; Haapaniemi, P.; Seki, M.; Takita, J.; Kauko, O.; et al. Arginine Methyltransferase PRMT7 Deregulates Expression of RUNX1 Target Genes in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers* **2022**, *14*, 2169. [CrossRef]
95. Liu, C.; Zou, W.; Nie, D.; Li, S.; Duan, C.; Zhou, M.; Lai, P.; Yang, S.; Ji, S.; Li, Y.; et al. Loss of PRMT7 Reprograms Glycine Metabolism to Selectively Eradicate Leukemia Stem Cells in CML. *Cell Metab.* **2022**, *34*, 818–835.e7. [CrossRef] [PubMed]
96. Zhu, F.; Huang, R.; Li, J.; Liao, X.; Huang, Y.; Lai, Y. Identification of Key Genes and Pathways Associated with RUNX1 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Using Bioinformatics Analysis. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2018**, *24*, 7100–7108. [CrossRef]
97. Xiao, P.-F.; Tao, Y.-F.; Hu, S.-Y.; Cao, L.; Lu, J.; Wang, J.; Feng, X.; Pan, J.; Chai, Y.-H. MRNA Expression Profiling of Histone Modifying Enzymes in Pediatric Acute Monoblastic Leukemia. *Die Pharm.* **2017**, *72*, 177–186. [CrossRef]
98. Tao, Y.-F.; Pang, L.; Du, X.-J.; Sun, L.-C.; Hu, S.-Y.; Lu, J.; Cao, L.; Zhao, W.-L.; Feng, X.; Wang, J.; et al. Differential MRNA Expression Levels of Human Histone-Modifying Enzymes in Normal Karyotype B Cell Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 3376–3394. [CrossRef]
99. Eram, M.S.; Shen, Y.; Szewczyk, M.M.; Wu, H.; Senisterra, G.; Li, F.; Butler, K.V.; Kaniskan, H.U.; Speed, B.A.; dela Peña, C.; et al. A Potent, Selective, and Cell-Active Inhibitor of Human Type I Protein Arginine Methyltransferases. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 772–781. [CrossRef]
100. Fong, J.Y.; Pignata, L.; Goy, P.-A.; Kawabata, K.C.; Lee, S.C.-W.; Koh, C.M.; Musiani, D.; Massignani, E.; Kotini, A.G.; Penson, A.; et al. Therapeutic Targeting of RNA Splicing Catalysis through Inhibition of Protein Arginine Methylation. *Cancer Cell* **2019**, *36*, 194–209.e9. [CrossRef]
101. Wang, C.; Jiang, H.; Jin, J.; Xie, Y.; Chen, Z.; Zhang, H.; Lian, F.; Liu, Y.-C.; Zhang, C.; Ding, H.; et al. Development of Potent Type I Protein Arginine Methyltransferase (PRMT) Inhibitors of Leukemia Cell Proliferation. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 8888–8905. [CrossRef] [PubMed]
102. Bonham, K.; Hemmers, S.; Lim, Y.; Hill, D.M.; Finn, M.G.; Mowen, K.A. Effects of a Novel Arginine Methyltransferase Inhibitor on T-helper Cell Cytokine Production. *FEBS J.* **2010**, *277*, 2096–2108. [CrossRef]

103. Bissinger, E.-M.; Heinke, R.; Spannhoff, A.; Eberlin, A.; Metzger, E.; Cura, V.; Hassenboehler, P.; Cavarelli, J.; Schüle, R.; Bedford, M.T.; et al. Acyl Derivatives of P-Aminosulfonamides and Dapsone as New Inhibitors of the Arginine Methyltransferase HPRMT1. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3717–3731. [CrossRef] [PubMed]
104. Spannhoff, A.; Machmur, R.; Heinke, R.; Trojer, P.; Bauer, I.; Brosch, G.; Schüle, R.; Hanefeld, W.; Sippl, W.; Jung, M. A Novel Arginine Methyltransferase Inhibitor with Cellular Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4150–4153. [CrossRef]
105. Yan, L.; Yan, C.; Qian, K.; Su, H.; Kofsky-Wofford, S.A.; Lee, W.-C.; Zhao, X.; Ho, M.-C.; Ivanov, I.; Zheng, Y.G. Diamidine Compounds for Selective Inhibition of Protein Arginine Methyltransferase 1. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2611–2622. [CrossRef] [PubMed]
106. Drew, A.E.; Moradei, O.; Jacques, S.L.; Rioux, N.; Boriack-Sjodin, A.P.; Allain, C.; Scott, M.P.; Jin, L.; Raimondi, A.; Handler, J.L.; et al. Identification of a CARM1 Inhibitor with Potent In Vitro and In Vivo Activity in Preclinical Models of Multiple Myeloma. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17993. [CrossRef]
107. Nakayama, K.; Szewczyk, M.M.; dela Sena, C.; Wu, H.; Dong, A.; Zeng, H.; Li, F.; de Freitas, R.F.; Eram, M.S.; Schapira, M.; et al. TP-064, a Potent and Selective Small Molecule Inhibitor of PRMT4 for Multiple Myeloma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 18480–18493. [CrossRef]
108. Veazey, K.J.; Cheng, D.; Lin, K.; Villarreal, O.D.; Gao, G.; Perez-Oquendo, M.; Van, H.T.; Stratton, S.A.; Green, M.; Xu, H.; et al. CARM1 Inhibition Reduces Histone Acetyltransferase Activity Causing Synthetic Lethality in CREBBP/EP300-Mutated Lymphomas. *Leukemia* **2020**, *34*, 3269–3285. [CrossRef]
109. Chan-Penebre, E.; Kuplast, K.G.; Majer, C.R.; Boriack-Sjodin, P.A.; Wigle, T.J.; Johnston, L.D.; Rioux, N.; Munchhof, M.J.; Jin, L.; Jacques, S.L.; et al. A Selective Inhibitor of PRMT5 with In Vivo and in Vitro Potency in MCL Models. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 432–437. [CrossRef]
110. Secker, K.-A.; Keppeler, H.; Duerr-Stoerzer, S.; Schmid, H.; Schneidawind, D.; Hentrich, T.; Schulze-Hentrich, J.M.; Mankel, B.; Fend, F.; Schneidawind, C. Inhibition of DOT1L and PRMT5 Promote Synergistic Anti-Tumor Activity in a Human MLL Leukemia Model Induced by CRISPR/Cas9. *Oncogene* **2019**, *38*, 7181–7195. [CrossRef]
111. Schnormeier, A.-K.; Pommerenke, C.; Kaufmann, M.; Drexler, H.G.; Koepfel, M. Genomic Deregulation of PRMT5 Supports Growth and Stress Tolerance in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 9775. [CrossRef] [PubMed]
112. Duncan, K.W.; Rioux, N.; Boriack-Sjodin, P.A.; Munchhof, M.J.; Reiter, L.A.; Majer, C.R.; Jin, L.; Johnston, L.D.; Chan-Penebre, E.; Kuplast, K.G.; et al. Structure and Property Guided Design in the Identification of PRMT5 Tool Compound EPZ015666. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 162–166. [CrossRef] [PubMed]
113. Gerhart, S.V.; Kellner, W.A.; Thompson, C.; Pappalardi, M.B.; Zhang, X.-P.; de Oca, R.M.; Penebre, E.; Duncan, K.; Boriack-Sjodin, A.; Le, B.; et al. Activation of the P53-MDM4 Regulatory Axis Defines the Anti-Tumour Response to PRMT5 Inhibition through Its Role in Regulating Cellular Splicing. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9711. [CrossRef] [PubMed]
114. Szewczyk, M.M.; Luciani, G.M.; Vu, V.; Murison, A.; Dilworth, D.; Barghout, S.H.; Lupien, M.; Arrowsmith, C.H.; Minden, M.D.; Baryshte-Lovejoy, D. PRMT5 Regulates ATF4 Transcript Splicing and Oxidative Stress Response. *Redox. Biol.* **2022**, *51*, 102282. [CrossRef] [PubMed]
115. Jin, Y.; Zhou, J.; Xu, F.; Jin, B.; Cui, L.; Wang, Y.; Du, X.; Li, J.; Li, P.; Ren, R.; et al. Targeting Methyltransferase PRMT5 Eliminates Leukemia Stem Cells in Chronic Myelogenous Leukemia. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 3961–3980. [CrossRef]
116. Bonday, Z.Q.; Cortez, G.S.; Grogan, M.J.; Antonysamy, S.; Weichert, K.; Bocchinfuso, W.P.; Li, F.; Kennedy, S.; Li, B.; Mader, M.M.; et al. LLY-283, a Potent and Selective Inhibitor of Arginine Methyltransferase 5, PRMT5, with Antitumor Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 612–617. [CrossRef]
117. Alinari, L.; Mahasenan, K.V.; Yan, F.; Karkhanis, V.; Chung, J.-H.; Smith, E.M.; Quinion, C.; Smith, P.L.; Kim, L.; Patton, J.T.; et al. Selective Inhibition of Protein Arginine Methyltransferase 5 Blocks Initiation and Maintenance of B-Cell Transformation. *Blood* **2015**, *125*, 2530–2543. [CrossRef]
118. Pastore, F.; Bhagwat, N.; Pastore, A.; Radziszewska, A.; Karzai, A.; Krishnan, A.; Li, B.; Bowman, R.L.; Xiao, W.; Viny, A.D.; et al. PRMT5 Inhibition Modulates E2F1 Methylation and Gene-Regulatory Networks Leading to Therapeutic Efficacy in JAK2V617F-Mutant MPN. *Cancer Discov.* **2020**, *10*, 1742–1757. [CrossRef]
119. Zhu, K.; Shao, J.; Tao, H.; Yan, X.; Luo, C.; Zhang, H.; Duan, W. Rational Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Triazole Derivatives as Potent and Selective PRMT5 Inhibitors with Antitumor Activity. *J. Comput. Aid Mol. Des.* **2019**, *33*, 775–785. [CrossRef]
120. Hu, H.; Owens, E.A.; Su, H.; Yan, L.; Levitz, A.; Zhao, X.; Henary, M.; Zheng, Y.G. Exploration of Cyanine Compounds as Selective Inhibitors of Protein Arginine Methyltransferases: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1228–1243. [CrossRef]
121. Qian, K.; Yan, C.; Su, H.; Dang, T.; Zhou, B.; Wang, Z.; Zhao, X.; Ivanov, I.; Ho, M.-C.; Zheng, Y.G. Pharmacophore-Based Screening of Diamidine Small Molecule Inhibitors for Protein Arginine Methyltransferases. *RSC Med. Chem.* **2020**, *12*, 95–102. [CrossRef]
122. Guo, Z.; Zhang, Z.; Yang, H.; Cao, D.; Xu, X.; Zheng, X.; Chen, D.; Wang, Q.; Li, Y.; Li, J.; et al. Design and Synthesis of Potent, Selective Inhibitors of Protein Arginine Methyltransferase 4 against Acute Myeloid Leukemia. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 5414–5433. [CrossRef] [PubMed]
123. Zhang, L.; Cao, C.; Jin, J.; Fan, Y.; Wang, X.; Zhang, Q.; Hu, H.; Ye, X.; Wang, L.; Ye, F. Identification of PRMT5 Inhibitors with Novel Scaffold Structures through Virtual Screening and Biological Evaluations. *J. Mol. Model* **2021**, *28*, 184. [CrossRef] [PubMed]

124. Brehmer, D.; Beke, L.; Wu, T.; Millar, H.J.; Moy, C.; Sun, W.; Mannens, G.; Pande, V.; Boeckx, A.; van Heerde, E.; et al. Discovery and Pharmacological Characterization of JNJ-64619178, a Novel Small Molecule Inhibitor of PRMT5 with Potent Anti-Tumor Activity. *Mol. Cancer Ther.* **2021**, *20*, 2317–2328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Zhu, K.; Tao, H.; Song, J.-L.; Jin, L.; Zhang, Y.; Liu, J.; Chen, Z.; Jiang, C.-S.; Luo, C.; Zhang, H. Identification of 5-Benzylidene-2-Phenylthiazolones as Potent PRMT5 Inhibitors by Virtual Screening, Structural Optimization and Biological Evaluations. *Bioorg. Chem.* **2018**, *81*, 289–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. van Haren, M.J.; Marechal, N.; Troffer-Charlier, N.; Cianciulli, A.; Sbardella, G.; Cavarelli, J.; Martin, N.I. Transition State Mimics Are Valuable Mechanistic Probes for Structural Studies with the Arginine Methyltransferase CARM1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 3625–3630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Siu, L.L.; Rasco, D.W.; Vinay, S.P.; Romano, P.M.; Menis, J.; Opdam, F.L.; Heinhuis, K.M.; Egger, J.L.; Gorman, S.A.; Parasrampur, R.; et al. 438OMETEOR-1: A Phase I Study of GSK3326595, a First-in-Class Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5) Inhibitor, in Advanced Solid Tumours. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, v159. [[CrossRef](#)]

II. Publications scientifiques

- **Sauter, C.** *et al.* (2023). PRMT2 Controls Inflammatory Signaling in Acute Myeloid Leukemia. *Soumis*.
- Dumétier, B., **Sauter, C.** *et al.* (2022). Repeat Element Activation-Driven Inflammation: Role of NFκB and Implications in Normal Development and Cancer?. *Biomedicines*, **10**(12), 3101. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123101>
- **Sauter, C.** *et al.* (2022). Protein Arginine Methyltransferases as Therapeutic Targets in Hematological Malignancies. *Cancers*, **14**(21), 5443. <https://doi.org/10.3390/cancers14215443>
- Burlet, B., Ramla, S., Fournier, C., Abrey-Recalde, M. J., **Sauter, C.** *et al.* (2021). Identification of novel, clonally stable, somatic mutations targeting transcription factors PAX5 and NKX2-3, the epigenetic regulator LRIF1, and BRAF in a case of atypical B-cell chronic lymphocytic leukemia harboring a t(14;18)(q32;q21). *Cold Spring Harbor molecular case studies*, **7**(1), a005934. <https://doi.org/10.1101/mcs.a005934>

III. Congrès

Au cours de mes quatre années de doctorat, j'ai eu l'occasion de participer à des congrès portants sur différents domaines d'expertise, notamment l'hématologie et l'épigénétique (tableau ci-dessous). Les communications orales et affichées se sont déroulées en anglais, à l'exception des congrès de la Société Française d'Hématologie (SFH) ainsi que des 8^{èmes} journées du FILO (*French Innovative Leukemia Organization*), qui spécifiaient ou privilégiaient l'usage de la langue française.

Nom	Lieu	Date	Type de communication
27 ^{èmes} Journées des Jeunes Chercheurs en Cancérologie (ARC)	Paris	Octobre 2023	Oral
<i>European Meeting on PRMTs in Cancer (EuroMeP)</i>	Dijon	Septembre 2023	Poster
43 ^{ème} Congrès de la SFH (Société Française d'Hématologie)	Paris	Mars 2023	Oral
8 ^{èmes} Journées du FILO (<i>French Innovative Leukemia Organization</i>)	Dijon	Décembre 2022	Oral
OncoTrans 2022	Nancy	Novembre 2022	Oral
<i>Methylation Signaling: Beyond Histones and Chromatin</i>	Paris	Octobre 2022	Poster
28 ^{ème} Congrès du CHO (Club Hématopoïèse et Oncogénèse)	Presqu'île de Giens	Octobre 2022	Poster
EHA 2022 (<i>The European Hematology Association</i>)	Vienne	Juin 2022	Poster
6 ^{ème} Edition du Congrès International d'Épigénétique EpiBesançon	Besançon	Mai 2022	Poster
42 ^{ème} Congrès de la SFH (Société Française d'Hématologie)	Paris	Mars 2022	Poster
12 ^{ème} Forum du Cancéropôle Est	Dijon	Novembre 2021	Oral
27 ^{ème} Congrès du CHO (Club Hématopoïèse et Oncogénèse)	Presqu'île de Giens	Octobre 2021	Oral
26 ^{ème} Congrès du CHO (Club Hématopoïèse et Oncogénèse)	Presqu'île de Giens	Octobre 2019	/

J'ai remporté le Prix « **Meilleure Communication Orale** » lors du 12^{ème} Forum du Cancéropôle Est le 18 novembre 2021 à Dijon, ainsi que le Prix « **Jeunes Experts Leucémies** » lors des 8^{èmes} Journées du FILO le 25 novembre 2022 à Dijon.

IV. Formation d'étudiants

- Céline REBUSTELLA, étudiante en Master 2 de Cancérologie (Université de Lyon)
- Lucas BRIGNOLI, étudiant en Master 1 de Biochimie et Biologie Moléculaire (Université de Bourgogne)
- Thomas MORIN, étudiant en Master 1 de Biochimie et Biologie Moléculaire puis Master 2 Signalisation Cellulaire et Moléculaire (Université de Bourgogne)
- Aésa LEMAIRE, étudiante en Master 1 de Biologie (Université de Lorraine)
- Éloïse BIOLET, étudiante en Master 1 de Biologie (Université Clermont Auvergne)
- Ambre PROST, étudiante en Master 1 de Biochimie et Biologie Moléculaire (Université de Bourgogne)
- Hugo BASTIE, étudiant en 2^{ème} année d'école d'ingénieur (SupBiotech, Lyon)
- Mirella NELSON, étudiante en 3^{ème} année de Licence de Biologie (Université de Bourgogne)
- Baptiste BOUILLOT, étudiant en 2^{ème} année de Licence de Biologie (Université de Bourgogne)
- Marie GANZER, étudiante en 2^{ème} année de Licence de Biologie (Université de Bourgogne)
- Eva GENS, stage découverte de 3^{ème} et de seconde (Groupe Scolaire Saint-Joseph, Dijon)

V. Organisation d'un congrès international : EuroMeP

J'ai participé, avec le Dr Laurent Delva et le Dr Fabien Guidez, à l'organisation d'un congrès européen sur le thème des protéines arginine méthyltransférases dans les cancers, les 28 et 29 septembre 2023 à Dijon. Ce fut une occasion pour moi de développer de nouvelles compétences à la fois de communication et d'organisation.

Voici une liste des tâches que j'ai réalisées dans la préparation de cet évènement :

- Réalisation du logo du congrès et de la charte graphique
- Envoi du préprogramme aux orateurs
- Réalisation de l'affiche
- Envoi du programme définitif à tous les participants
- Organisation de la soirée du jeudi : contact avec le restaurant, demande de devis
- Contact avec les orateurs : informations concernant les transports, l'hébergement et la soirée du jeudi
- Organisation des repas et pauses café : contact avec le traiteur, demande de devis
- Réalisation du programme, impression en papier cartonné
- Réalisation de badges nominatifs pour les orateurs
- Réalisation du livret de congrès contenant les résumés des posters
- Réalisation des kits de bienvenue
 - Sacs en toile, carnets de notes et stylos avec le logo (demandes de devis)
 - Achat de cadeaux de bienvenue pour les orateurs
- Installation de la salle accueillant le congrès
- Accueil des participants, distribution des kits de bienvenue
- Installation des repas et pause-café sur le lieu du congrès
- Modération de la séance du vendredi avec le Dr François Hermetet
 - Présentation des orateurs
 - Modération des questions
 - Respect du programme

L'affiche et le programme des deux jours du congrès sont présentés ci-après.



European Meeting on Protein Arginine Methyltransferases in Cancer



*Centre Georges François Leclerc - Dijon
28th and 29th September, 2023*

Scan to register!



1 Rue du Professeur Marion, 21000 Dijon
T1 tram to "CHU – Hôpitaux"
or L3 bus to "CHU – Hôpitaux"



EuroMeP Symposium - Program

Thursday, 28th

12:00 pm – 1:30 pm Welcome cocktail

1:30 pm – 1:40 pm **Laurent Delva, François Ghiringhelli, Marc Maynadié**

Session 1: chairs Mary Callanan & Fabien Guidez

1:40 pm – 2:20 pm **Uta-Maria Bauer** (Marburg, Germany)

PRMTs: important players in human malignancy

2:20 pm – 3:00 pm **Clare Davies** (Birmingham, England, UK)

Understanding the role of PRMTs in the DNA damage response

3:00 pm – 3:40 pm **Thierry Dubois** (Paris, France)

PRMTs as potential therapeutic targets for triple-negative breast cancers

3:40 pm – 4:20 pm Coffee break and Poster session

4:20 pm – 5:00 pm **Muriel Le Romancer** (Lyon, France)

Role of PRMTs in breast cancer

5:00 pm – 5:40 pm **Engin Demirdizen** (Göttingen, Germany)

Identifying therapeutic vulnerabilities for pancreatic cancer treatment

5:40 pm – 6:20 pm **Tiziana Bonaldi** (Milano, Italy)

Multi-layer regulation of adaptive response to chemotherapy by PRMT1 in ovarian cancer: a proteomic perspective

EuroMeP Symposium - Program

Friday, 29th

Session 2: chairs Camille Sauter & François Hermetet

9:30 am – 10:10 am

Romain Aucagne (Dijon, France)

PRMT2 is involved in acute myeloid leukemia through its role on inflammation

10:10 am – 10:50 am

Paola Arimondo (Paris, France)

AntiDOTes for diseases: Chemistry and biology match together to tackle epigenetics

10:50 am – 11:30 am

Coffee break and Poster session

11:30 am – 12:10 pm

Vincent Cura (Illkirch-Graffenstaden, France)

Functional insights from the structures of different PRMTs

12:10 pm – 12:50 pm

Nathaniel Martin (Leiden, Netherlands)

Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT): An emerging & unexploited target in metabolic disease and cancer

12:50 pm

Closing cocktail

Organizing committee:

Laurent Delva
Camille Sauter
Fabien Guidez

Fundings:



BIBLIOGRAPHIE

1. Waddington, C.H. The Epigenotype. *International journal of epidemiology* **2012**, *41*, 10–13, doi:10.1093/ije/dyr184.
2. Morgan, H.D.; Sutherland, H.G.E.; Martin, D.I.K.; Whitelaw, E. Epigenetic Inheritance at the Agouti Locus in the Mouse. *Nat Genet* **1999**, *23*, 314–318, doi:10.1038/15490.
3. Waterland, R.A.; Jirtle, R.L. Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. *Mol Cell Biol* **2003**, *23*, 5293–5300, doi:10.1128/mcb.23.15.5293-5300.2003.
4. Wu, C. -t.; Morris, J.R. Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. *Science* **2001**, *293*, 1103–1105, doi:10.1126/science.293.5532.1103.
5. Matsuyama, H.; Suzuki, H.I. Systems and Synthetic MicroRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *Int J Mol Sci* **2019**, *21*, 132, doi:10.3390/ijms21010132.
6. Mohr, A.; Mott, J. Overview of MicroRNA Biology. *Semin Liver Dis* **2015**, *35*, 003–011, doi:10.1055/s-0034-1397344.
7. Yao, Q.; Chen, Y.; Zhou, X. The Roles of MicroRNAs in Epigenetic Regulation. *Curr Opin Chem Biol* **2019**, *51*, 11–17, doi:10.1016/j.cbpa.2019.01.024.
8. Sætrum, P.; Snøve, O.; Rossi, J.J. Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatr Res* **2007**, *61*, 17–23, doi:10.1203/pdr.0b013e318045760e.
9. Sun, T.; Wu, R.; Ming, L. The Role of M6A RNA Methylation in Cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *112*, 108613, doi:10.1016/j.biopha.2019.108613.
10. García-Vílchez, R.; Sevilla, A.; Blanco, S. Post-Transcriptional Regulation by Cytosine-5 Methylation of RNA. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Gene Regul. Mech.* **2019**, *1862*, 240–252, doi:10.1016/j.bbagrm.2018.12.003.
11. Hotchkiss, R.D. THE QUANTITATIVE SEPARATION OF PURINES, PYRIMIDINES, AND NUCLEOSIDES BY PAPER CHROMATOGRAPHY. *J Biol Chem* **1948**, *175*, 315–332, doi:10.1016/s0021-9258(18)57261-6.
12. Sinsheimer, R.L. THE ACTION OF PANCREATIC DEOXYRIBONUCLEASE II. ISOMERIC DINUCLEOTIDES. *J Biol Chem* **1955**, *215*, 579–583, doi:10.1016/s0021-9258(18)65979-4.
13. Moore, L.D.; Le, T.; Fan, G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacol* **2013**, *38*, 23–38, doi:10.1038/npp.2012.112.
14. Tahiliani, M.; Koh, K.P.; Shen, Y.; Pastor, W.A.; Bandukwala, H.; Brudno, Y.; Agarwal, S.; Iyer, L.M.; Liu, D.R.; Aravind, L.; et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* **2009**, *324*, 930–935, doi:10.1126/science.1170116.
15. Maiti, A.; Drohat, A.C. Thymine DNA Glycosylase Can Rapidly Excise 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine POTENTIAL IMPLICATIONS FOR ACTIVE DEMETHYLATION OF CpG SITES*. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 35334–35338, doi:10.1074/jbc.c111.284620.

16. Meng, H.; Cao, Y.; Qin, J.; Song, X.; Zhang, Q.; Shi, Y.; Cao, L. DNA Methylation, Its Mediators and Genome Integrity. *Int J Biol Sci* **2015**, *11*, 604–617, doi:10.7150/ijbs.11218.
17. Bogdanović, O.; Veenstra, G.J.C. DNA Methylation and Methyl-CpG Binding Proteins: Developmental Requirements and Function. *Chromosoma* **2009**, *118*, 549–565, doi:10.1007/s00412-009-0221-9.
18. Luger, K.; Mäder, A.W.; Richmond, R.K.; Sargent, D.F.; Richmond, T.J. Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution. *Nature* **1997**, *389*, 251–260, doi:10.1038/38444.
19. Marzluff, W.F. Metazoan Replication-Dependent Histone MRNAs: A Distinct Set of RNA Polymerase II Transcripts. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17*, 274–280, doi:10.1016/j.ceb.2005.04.010.
20. Biterge, B.; Schneider, R. Histone Variants: Key Players of Chromatin. *Cell Tissue Res.* **2014**, *356*, 457–466, doi:10.1007/s00441-014-1862-4.
21. Martire, S.; Banaszynski, L.A. The Roles of Histone Variants in Fine-Tuning Chromatin Organization and Function. *Nat Rev Mol Cell Bio* **2020**, *21*, 522–541, doi:10.1038/s41580-020-0262-8.
22. Hansen, B.K.; Gupta, R.; Baldus, L.; Lyon, D.; Narita, T.; Lammers, M.; Choudhary, C.; Weinert, B.T. Analysis of Human Acetylation Stoichiometry Defines Mechanistic Constraints on Protein Regulation. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1055, doi:10.1038/s41467-019-09024-0.
23. Shvedunova, M.; Akhtar, A. Modulation of Cellular Processes by Histone and Non-Histone Protein Acetylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *23*, 329–349, doi:10.1038/s41580-021-00441-y.
24. Aricthota, S.; Rana, P.P.; Haldar, D. Histone Acetylation Dynamics in Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Front. Genet.* **2022**, *13*, 926577, doi:10.3389/fgene.2022.926577.
25. Allis, C.D.; Berger, S.L.; Cote, J.; Dent, S.; Jenuwien, T.; Kouzarides, T.; Pillus, L.; Reinberg, D.; Shi, Y.; Shiekhhattar, R.; et al. New Nomenclature for Chromatin-Modifying Enzymes. *Cell* **2007**, *131*, 633–636, doi:10.1016/j.cell.2007.10.039.
26. Marmorstein, R.; Zhou, M.-M. Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6*, a018762, doi:10.1101/cshperspect.a018762.
27. Seto, E.; Yoshida, M. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6*, a018713, doi:10.1101/cshperspect.a018713.
28. Sabari, B.R.; Zhang, D.; Allis, C.D.; Zhao, Y. Metabolic Regulation of Gene Expression through Histone Acylations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 90–101, doi:10.1038/nrm.2016.140.
29. Nitsch, S.; Shahidian, L.Z.; Schneider, R. Histone Acylations and Chromatin Dynamics: Concepts, Challenges, and Links to Metabolism. *EMBO Rep.* **2021**, *22*, e52774, doi:10.15252/embr.202152774.
30. Hyun, K.; Jeon, J.; Park, K.; Kim, J. Writing, Erasing and Reading Histone Lysine Methylations. *Exp. Mol. Med.* **2017**, *49*, e324–e324, doi:10.1038/emm.2017.11.
31. Mohan, M.; Herz, H.-M.; Shilatifard, A. SnapShot: Histone Lysine Methylase Complexes. *Cell* **2012**, *149*, 498-498.e1, doi:10.1016/j.cell.2012.03.025.

32. Shi, Y.; Lan, F.; Matson, C.; Mulligan, P.; Whetstine, J.R.; Cole, P.A.; Casero, R.A.; Shi, Y. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell* **2004**, *119*, 941–953, doi:10.1016/j.cell.2004.12.012.
33. Cloos, P.A.C.; Christensen, J.; Agger, K.; Helin, K. Erasing the Methyl Mark: Histone Demethylases at the Center of Cellular Differentiation and Disease. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 1115–1140, doi:10.1101/gad.1652908.
34. Poulard, C.; Rambaud, J.; Hussein, N.; Corbo, L.; Romancer, M.L. JMJD6 Regulates ER α Methylation on Arginine. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87982, doi:10.1371/journal.pone.0087982.
35. Poulard, C.; Corbo, L.; Romancer, M.L. Protein Arginine Methylation/Demethylation and Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 67532–67550, doi:10.18632/oncotarget.11376.
36. Zhu, D.; Zhang, Y.; Wang, S. Histone Citrullination: A New Target for Tumors. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 90, doi:10.1186/s12943-021-01373-z.
37. Lan, J.; Lepikhov, K.; Giehr, P.; Walter, J. Histone and DNA Methylation Control by H3 Serine 10/Threonine 11 Phosphorylation in the Mouse Zygote. *Epigenetics Chromatin* **2017**, *10*, 5, doi:10.1186/s13072-017-0112-x.
38. Sawicka, A.; Seiser, C. Histone H3 Phosphorylation – A Versatile Chromatin Modification for Different Occasions. *Biochimie* **2012**, *94*, 2193–2201, doi:10.1016/j.biochi.2012.04.018.
39. Polioudaki, H.; Markaki, Y.; Kourmouli, N.; Dialynas, G.; Theodoropoulos, P.A.; Singh, P.B.; Georgatos, S.D. Mitotic Phosphorylation of Histone H3 at Threonine 3. *FEBS Lett.* **2004**, *560*, 39–44, doi:10.1016/s0014-5793(04)00060-2.
40. Preuss, U.; Landsberg, G.; Scheidtmann, K.H. Novel Mitosis-specific Phosphorylation of Histone H3 at Thr11 Mediated by Dlk/ZIP Kinase. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 878–885, doi:10.1093/nar/gkg176.
41. Barber, C.M.; Turner, F.B.; Wang, Y.; Hagstrom, K.; Taverna, S.D.; Mollah, S.; Ueberheide, B.; Meyer, B.J.; Hunt, D.F.; Cheung, P.; et al. The Enhancement of Histone H4 and H2A Serine 1 Phosphorylation during Mitosis and S-Phase Is Evolutionarily Conserved. *Chromosoma* **2004**, *112*, 360–371, doi:10.1007/s00412-004-0281-9.
42. Cheung, W.L.; Ajiro, K.; Samejima, K.; Kloc, M.; Cheung, P.; Mizzen, C.A.; Beeser, A.; Etkin, L.D.; Chernoff, J.; Earnshaw, W.C.; et al. Apoptotic Phosphorylation of Histone H2B Is Mediated by Mammalian Sterile Twenty Kinase. *Cell* **2003**, *113*, 507–517, doi:10.1016/s0092-8674(03)00355-6.
43. Cavalieri, V. The Expanding Constellation of Histone Post-Translational Modifications in the Epigenetic Landscape. *Genes* **2021**, *12*, 1596, doi:10.3390/genes12101596.
44. Mattioli, F.; Penengo, L. Histone Ubiquitination: An Integrative Signaling Platform in Genome Stability. *Trends Genet.* **2021**, *37*, 566–581, doi:10.1016/j.tig.2020.12.005.
45. Uckelmann, M.; Sixma, T.K. Histone Ubiquitination in the DNA Damage Response. *DNA Repair* **2017**, *56*, 92–101, doi:10.1016/j.dnarep.2017.06.011.

46. Ryu, H.-Y.; Hochstrasser, M. Histone Sumoylation and Chromatin Dynamics. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, gkab280-, doi:10.1093/nar/gkab280.
47. Audia, J.E.; Campbell, R.M. Histone Modifications and Cancer. *Csh Perspect Biol* **2016**, *8*, a019521, doi:10.1101/cshperspect.a019521.
48. Jiang, T.; Zhou, X.; Taghizadeh, K.; Dong, M.; Dedon, P.C. N-Formylation of Lysine in Histone Proteins as a Secondary Modification Arising from Oxidative DNA Damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 60–65, doi:10.1073/pnas.0606775103.
49. Sakabe, K.; Wang, Z.; Hart, G.W. β -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Is Part of the Histone Code. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 19915–19920, doi:10.1073/pnas.1009023107.
50. Kuroishi, T.; Rios-Avila, L.; Pestinger, V.; Wijeratne, S.S.K.; Zemleni, J. Biotinylation Is a Natural, Albeit Rare, Modification of Human Histones. *Mol. Genet. Metab.* **2011**, *104*, 537–545, doi:10.1016/j.ymgme.2011.08.030.
51. Machida, S.; Takizawa, Y.; Ishimaru, M.; Sugita, Y.; Sekine, S.; Nakayama, J.; Wolf, M.; Kurumizaka, H. Structural Basis of Heterochromatin Formation by Human HP1. *Mol. Cell* **2018**, *69*, 385–397.e8, doi:10.1016/j.molcel.2017.12.011.
52. Maison, C.; Almouzni, G. HP1 and the Dynamics of Heterochromatin Maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 296–305, doi:10.1038/nrm1355.
53. Maeda, R.; Tachibana, M. HP1 Maintains Protein Stability of H3K9 Methyltransferases and Demethylases. *EMBO Rep.* **2022**, *23*, e53581, doi:10.15252/embr.202153581.
54. Zhang, R.; Erler, J.; Langowski, J. Histone Acetylation Regulates Chromatin Accessibility: Role of H4K16 in Inter-Nucleosome Interaction. *Biophys. J.* **2017**, *112*, 450–459, doi:10.1016/j.bpj.2016.11.015.
55. Paik, W.K.; Kim, S. Protein Methylation. *Science* **1971**, *174*, 114–119, doi:10.1126/science.174.4005.114.
56. Baldwin, G.S.; Carnegie, P.R. Specific Enzymic Methylation of an Arginine in the Experimental Allergic Encephalomyelitis Protein from Human Myelin. *Science* **1971**, *171*, 579–581, doi:10.1126/science.171.3971.579.
57. CRANG, A.J.; JACOBSON, W. The Methylation in Vitro of Myelin Basic Protein by Arginine Methylase from Mouse Spinal Cord. *Biochem. Soc. Trans.* **1980**, *8*, 611–612, doi:10.1042/bst0080611.
58. Baxter, C.S.; Byvoet, P. Effects of Carcinogens and Other Agents on Histone Methylation by a Histone Arginine Methyltransferase Purified from Rat Liver Cytoplasm. *Cancer Res.* **1974**, *34*, 1418–1423.
59. Boffa, L.C.; Gruss, R.J.; Allfrey, V.G. Manifold Effects of Sodium Butyrate on Nuclear Function. Selective and Reversible Inhibition of Phosphorylation of Histones H1 and H2A and Impaired Methylation of Lysine and Arginine Residues in Nuclear Protein Fractions. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 9612–9621.

60. 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. Methylation of Histone H4 at Arginine 3 Occurs in Vivo and Is Mediated by the Nuclear Receptor Coactivator PRMT1. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 996–1000, doi:10.1016/s0960-9822(01)00294-9.
61. Ma, H.; Baumann, C.T.; Li, H.; Strahl, B.D.; Rice, R.; Jelinek, M.A.; Aswad, D.W.; Allis, C.D.; Hager, G.L.; Stallcup, M.R. Hormone-Dependent, CARM1-Directed, Arginine-Specific Methylation of Histone H3 on a Steroid-Regulated Promoter. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1981–1985, doi:10.1016/s0960-9822(01)00600-5.
62. Schurter, B.T.; Koh, S.S.; Chen, D.; Bunick, G.J.; Harp, J.M.; Hanson, B.L.; Henschen-Edman, A.; Mackay, D.R.; Stallcup, M.R.; Aswad, D.W. Methylation of Histone H3 by Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1 †. *Biochemistry* **2001**, *40*, 5747–5756, doi:10.1021/bi002631b.
63. Larsen, S.C.; Sylvestersen, K.B.; Mund, A.; Lyon, D.; Mullari, M.; Madsen, M.V.; Daniel, J.A.; Jensen, L.J.; Nielsen, M.L. Proteome-Wide Analysis of Arginine Monomethylation Reveals Widespread Occurrence in Human Cells. *Sci. Signal.* **2016**, *9*, rs9, doi:10.1126/scisignal.aaf7329.
64. Rhein, V.F.; Carroll, J.; Ding, S.; Fearnley, I.M.; Walker, J.E. NDUF7 Methylates Arginine 85 in the NDUF2 Subunit of Human Complex I*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 33016–33026, doi:10.1074/jbc.m113.518803.
65. Hatanaka, Y.; Tsusaka, T.; Shimizu, N.; Morita, K.; Suzuki, T.; Machida, S.; Satoh, M.; Honda, A.; Hirose, M.; Kamimura, S.; et al. Histone H3 Methylated at Arginine 17 Is Essential for Reprogramming the Paternal Genome in Zygotes. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 2756–2765, doi:10.1016/j.celrep.2017.08.088.
66. Struck, A.; Thompson, M.L.; Wong, L.S.; Micklefield, J. S-Adenosyl-Methionine-Dependent Methyltransferases: Highly Versatile Enzymes in Biocatalysis, Biosynthesis and Other Biotechnological Applications. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2642–2655, doi:10.1002/cbic.201200556.
67. Kishi, T.; Tanaka, Y.; Ueda, K. Evidence for Hypomethylation in Two Children with Acute Lymphoblastic Leukemia and Leukoencephalopathy. *Cancer* **2000**, *89*, 925–931, doi:10.1002/1097-0142(20000815)89:4<925::aid-cnrcr28>3.0.co;2-w.
68. Marjon, K.; Cameron, M.J.; Quang, P.; Clasquin, M.F.; Mandley, E.; Kunii, K.; McVay, M.; Choe, S.; Kernytsky, A.; Gross, S.; et al. MTAP Deletions in Cancer Create Vulnerability to Targeting of the MAT2A/PRMT5/RIOK1 Axis. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 574–587, doi:10.1016/j.celrep.2016.03.043.
69. Wu, Q.; Schapira, M.; Arrowsmith, C.H.; Barsyte-Lovejoy, D. Protein Arginine Methylation: From Enigmatic Functions to Therapeutic Targeting. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20*, 509–530, doi:10.1038/s41573-021-00159-8.
70. Silva, A.C. e; Wu, C.Y.-C.; Citadin, C.T.; Clemons, G.A.; Possoit, H.E.; Grames, M.S.; Lien, C.-F.; Minagar, A.; Lee, R.H.-C.; Frankel, A.; et al. Protein Arginine Methyltransferases in Cardiovascular and Neuronal Function. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57*, 1716–1732, doi:10.1007/s12035-019-01850-z.
71. Evich, M.; Stroeve, E.; Zheng, Y.G.; Germann, M.W. Effect of Methylation on the Side-chain PKa Value of Arginine. *Protein Sci.* **2016**, *25*, 479–486, doi:10.1002/pro.2838.
72. Blanc, R.S.; Richard, S. Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol Cell* **2017**, *65*, 8–24, doi:10.1016/j.molcel.2016.11.003.

73. Feng, Y.; Maity, R.; Whitelegge, J.P.; Hadjikyriacou, A.; Li, Z.; Zurita-Lopez, C.; Al-Hadid, Q.; Clark, A.T.; Bedford, M.T.; Masson, J.-Y.; et al. Mammalian Protein Arginine Methyltransferase 7 (PRMT7) Specifically Targets RXR Sites in Lysine- and Arginine-Rich Regions*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 37010–37025, doi:10.1074/jbc.m113.525345.
74. Selenko, P.; Sprangers, R.; Stier, G.; Bühler, D.; Fischer, U.; Sattler, M. SMN Tudor Domain Structure and Its Interaction with the Sm Proteins. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 27–31, doi:10.1038/83014.
75. Gayatri, S.; Bedford, M.T. Readers of Histone Methylarginine Marks. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Gene Regul. Mech.* **2014**, *1839*, 702–710, doi:10.1016/j.bbagr.2014.02.015.
76. Schapira, M.; Freitas, R.F. de Structural Biology and Chemistry of Protein Arginine Methyltransferases. *Medchemcomm* **2014**, *5*, 1779–1788, doi:10.1039/c4md00269e.
77. Hwang, J.W.; Cho, Y.; Bae, G.-U.; Kim, S.-N.; Kim, Y.K. Protein Arginine Methyltransferases: Promising Targets for Cancer Therapy. *Exp Mol Medicine* **2021**, *53*, 788–808, doi:10.1038/s12276-021-00613-y.
78. Dai, W.; Zhang, J.; Li, S.; He, F.; Liu, Q.; Gong, J.; Yang, Z.; Gong, Y.; Tang, F.; Wang, Z.; et al. Protein Arginine Methylation: An Emerging Modification in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front Immunol* **2022**, *13*, 865964, doi:10.3389/fimmu.2022.865964.
79. Yang, Y.; Bedford, M.T. Protein Arginine Methyltransferases and Cancer. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13*, 37–50, doi:10.1038/nrc3409.
80. Thiebaut, C.; Eve, L.; Poulard, C.; Romancer, M.L. Structure, Activity, and Function of PRMT1. *Life* **2021**, *11*, 1147, doi:10.3390/life11111147.
81. Wu, H.; Min, J.; Lunin, V.V.; Antoshenko, T.; Dombrowski, L.; Zeng, H.; Allali-Hassani, A.; Campagna-Slater, V.; Vedadi, M.; Arrowsmith, C.H.; et al. Structural Biology of Human H3K9 Methyltransferases. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e8570, doi:10.1371/journal.pone.0008570.
82. Lee, W.-C.; Lin, W.-L.; Matsui, T.; Chen, E.S.-W.; Wei, T.-Y.W.; Lin, W.-H.; Hu, H.; Zheng, Y.G.; Tsai, M.-D.; Ho, M.-C. Protein Arginine Methyltransferase 8: Tetrameric Structure and Protein Substrate Specificity. *Biochemistry* **2015**, *54*, 7514–7523, doi:10.1021/acs.biochem.5b00995.
83. Zhang, X.; Zhou, L.; Cheng, X. Crystal Structure of the Conserved Core of Protein Arginine Methyltransferase PRMT3. *EMBO J.* **2000**, *19*, 3509–3519, doi:10.1093/emboj/19.14.3509.
84. Frankel, A.; Clarke, S. PRMT3 Is a Distinct Member of the Protein Arginine N-Methyltransferase Family CONFERRAL OF SUBSTRATE SPECIFICITY BY A ZINC-FINGER DOMAIN*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 32974–32982, doi:10.1074/jbc.m006445200.
85. SWIERCZ, R.; PERSON, M.D.; BEDFORD, M.T. Ribosomal Protein S2 Is a Substrate for Mammalian PRMT3 (Protein Arginine Methyltransferase 3). *Biochem. J.* **2005**, *386*, 85–91, doi:10.1042/bj20041466.
86. Gupta, S.; Kadumuri, R.V.; Singh, A.K.; Chavali, S.; Dhayalan, A. Structure, Activity and Function of the Protein Arginine Methyltransferase 6. *Life* **2021**, *11*, 951, doi:10.3390/life11090951.

87. Shishkova, E.; Zeng, H.; Liu, F.; Kwiecien, N.W.; Hebert, A.S.; Coon, J.J.; Xu, W. Global Mapping of CARM1 Substrates Defines Enzyme Specificity and Substrate Recognition. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15571, doi:10.1038/ncomms15571.
88. Teyssier, C.; Chen, D.; Stallcup, M.R. Requirement for Multiple Domains of the Protein Arginine Methyltransferase CARM1 in Its Transcriptional Coactivator Function*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 46066–46072, doi:10.1074/jbc.m207623200.
89. Suresh, S.; Huard, S.; Dubois, T. CARM1/PRMT4: Making Its Mark beyond Its Function as a Transcriptional Coactivator. *Trends Cell Biol.* **2021**, *31*, 402–417, doi:10.1016/j.tcb.2020.12.010.
90. Antonysamy, S.; Bonday, Z.; Campbell, R.M.; Doyle, B.; Druzina, Z.; Gheyi, T.; Han, B.; Jungheim, L.N.; Qian, Y.; Rauch, C.; et al. Crystal Structure of the Human PRMT5:MEP50 Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 17960–17965, doi:10.1073/pnas.1209814109.
91. Sun, L.; Wang, M.; Lv, Z.; Yang, N.; Liu, Y.; Bao, S.; Gong, W.; Xu, R.-M. Structural Insights into Protein Arginine Symmetric Dimethylation by PRMT5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 20538–20543, doi:10.1073/pnas.1106946108.
92. Motolani, A.; Martin, M.; Sun, M.; Lu, T. The Structure and Functions of PRMT5 in Human Diseases. *Life* **2021**, *11*, 1074, doi:10.3390/life11101074.
93. Cura, V.; Troffer-Charlier, N.; Wurtz, J.; Bonnefond, L.; Cavarelli, J. Structural Insight into Arginine Methylation by the Mouse Protein Arginine Methyltransferase 7: A Zinc Finger Freezes the Mimic of the Dimeric State into a Single Active Site. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2014**, *70*, 2401–2412, doi:10.1107/s1399004714014278.
94. Halabelian, L.; Barsyte-Lovejoy, D. Structure and Function of Protein Arginine Methyltransferase PRMT7. *Life* **2021**, *11*, 768, doi:10.3390/life11080768.
95. Hadjikyriacou, A.; Yang, Y.; Espejo, A.; Bedford, M.T.; Clarke, S.G. Unique Features of Human Protein Arginine Methyltransferase 9 (PRMT9) and Its Substrate RNA Splicing Factor SF3B2*. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 16723–16743, doi:10.1074/jbc.m115.659433.
96. Liu, F.; Zhao, X.; Perna, F.; Wang, L.; Koppikar, P.; Abdel-Wahab, O.; Harr, M.W.; Levine, R.L.; Xu, H.; Tefferi, A.; et al. JAK2V617F-Mediated Phosphorylation of PRMT5 Downregulates Its Methyltransferase Activity and Promotes Myeloproliferation. *Cancer Cell* **2011**, *19*, 283–294, doi:10.1016/j.ccr.2010.12.020.
97. Lattouf, H.; Kassem, L.; Jacquemetton, J.; Choucair, A.; Poulard, C.; Trédan, O.; Corbo, L.; Diab-Assaf, M.; Hussein, N.; Treilleux, I.; et al. LKB1 Regulates PRMT5 Activity in Breast Cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 595–606, doi:10.1002/ijc.31909.
98. Sipos, A.; Iván, J.; Bécsi, B.; Darula, Z.; Tamás, I.; Horváth, D.; Medzihradzky, K.F.; Erdódi, F.; Lontay, B. Myosin Phosphatase and RhoA-Activated Kinase Modulate Arginine Methylation by the Regulation of Protein Arginine Methyltransferase 5 in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40590, doi:10.1038/srep40590.
99. Bao, X.; Siprashvili, Z.; Zarnegar, B.J.; Shenoy, R.M.; Rios, E.J.; Nady, N.; Qu, K.; Mah, A.; Webster, D.E.; Rubin, A.J.; et al. CSNK1a1 Regulates PRMT1 to Maintain the Progenitor State in Self-Renewing Somatic Tissue. *Dev. Cell* **2017**, *43*, 227–239.e5, doi:10.1016/j.devcel.2017.08.021.

100. Chang, N.C.; Sincennes, M.-C.; Chevalier, F.P.; Brun, C.E.; Lacaria, M.; Segalés, J.; Muñoz-Cánoves, P.; Ming, H.; Rudnicki, M.A. The Dystrophin Glycoprotein Complex Regulates the Epigenetic Activation of Muscle Stem Cell Commitment. *Cell Stem Cell* **2018**, *22*, 755–768.e6, doi:10.1016/j.stem.2018.03.022.
101. Li, X.; Lai, Y.; Li, J.; Zou, M.; Zou, C. Oxidative Stress Destabilizes Protein Arginine Methyltransferase 4 via Glycogen Synthase Kinase 3 β to Impede Lung Epithelial Cell Migration. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2017**, *313*, C285–C294, doi:10.1152/ajpcell.00073.2017.
102. Zhang, H.-T.; Zeng, L.-F.; He, Q.-Y.; Tao, W.A.; Zha, Z.-G.; Hu, C.-D. The E3 Ubiquitin Ligase CHIP Mediates Ubiquitination and Proteasomal Degradation of PRMT5. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 335–346, doi:10.1016/j.bbamcr.2015.12.001.
103. Li, Z.; Zhang, J.; Liu, X.; Li, S.; Wang, Q.; Chen, D.; Hu, Z.; Yu, T.; Ding, J.; Li, J.; et al. The LINC01138 Drives Malignancies via Activating Arginine Methyltransferase 5 in Hepatocellular Carcinoma. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1572, doi:10.1038/s41467-018-04006-0.
104. Bhuripanyo, K.; Wang, Y.; Liu, X.; Zhou, L.; Liu, R.; Duong, D.; Zhao, B.; Bi, Y.; Zhou, H.; Chen, G.; et al. Identifying the Substrate Proteins of U-Box E3s E4B and CHIP by Orthogonal Ubiquitin Transfer. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, e1701393, doi:10.1126/sciadv.1701393.
105. Shin, H.-J.R.; Kim, H.; Oh, S.; Lee, J.-G.; Kee, M.; Ko, H.-J.; Kweon, M.-N.; Won, K.-J.; Baek, S.H. AMPK–SKP2–CARM1 Signalling Cascade in Transcriptional Regulation of Autophagy. *Nature* **2016**, *534*, 553–557, doi:10.1038/nature18014.
106. Lu, Y.-F.; Cai, X.-L.; Li, Z.-Z.; Lv, J.; Xiang, Y.; Chen, J.-J.; Chen, W.-J.; Sun, W.-Y.; Liu, X.-M.; Chen, J.-B. LncRNA SNHG16 Functions as an Oncogene by Sponging MiR-4518 and Up-Regulating PRMT5 Expression in Glioma. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *45*, 1975–1985, doi:10.1159/000487974.
107. Xu, Z.; Jiang, J.; Xu, C.; Wang, Y.; Sun, L.; Guo, X.; Liu, H. MicroRNA-181 Regulates CARM1 and Histone Arginine Methylation to Promote Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e53146, doi:10.1371/journal.pone.0053146.
108. Vu, L.P.; Perna, F.; Wang, L.; Voza, F.; Figueroa, M.E.; Tempst, P.; Erdjument-Bromage, H.; Gao, R.; Chen, S.; Paietta, E.; et al. PRMT4 Blocks Myeloid Differentiation by Assembling a Methyl-RUNX1-Dependent Repressor Complex. *Cell Reports* **2013**, *5*, 1625–1638, doi:10.1016/j.celrep.2013.11.025.
109. Li, B.; Liu, L.; Li, X.; Wu, L. MiR-503 Suppresses Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cell by Targeting PRMT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *464*, 982–987, doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.169.
110. Zhang, H.; Guo, X.; Feng, X.; Wang, T.; Hu, Z.; Que, X.; Tian, Q.; Zhu, T.; Guo, G.; Huang, W.; et al. MiRNA-543 Promotes Osteosarcoma Cell Proliferation and Glycolysis by Partially Suppressing PRMT9 and Stabilizing HIF-1 α Protein. *Oncotarget* **2016**, *8*, 2342–2355, doi:10.18632/oncotarget.13672.
111. Pak, M.L.; Lakowski, T.M.; Thomas, D.; Vhuyian, M.I.; Hüsecken, K.; Frankel, A. A Protein Arginine N-Methyltransferase 1 (PRMT1) and 2 Heteromeric Interaction Increases PRMT1 Enzymatic Activity. *Biochemistry* **2011**, *50*, 8226–8240, doi:10.1021/bi200644c.

112. Nie, M.; Wang, Y.; Guo, C.; Li, X.; Wang, Y.; Deng, Y.; Yao, B.; Gui, T.; Ma, C.; Liu, M.; et al. CARM1-Mediated Methylation of Protein Arginine Methyltransferase 5 Represses Human γ -Globin Gene Expression in Erythroleukemia Cells. *J Biol Chem* **2018**, *293*, 17454–17463, doi:10.1074/jbc.ra118.004028.
113. Sun, Y.; Teng, Y.; Wang, L.; Zhang, Z.; Chen, C.; Wang, Y.; Zhang, X.; Xiang, P.; Song, X.; Lu, J.; et al. LINC01431 Promotes Histone H4R3 Methylation to Impede HBV Covalently Closed Circular DNA Transcription by Stabilizing PRMT1. *Adv Sci* **2022**, *9*, 2103135, doi:10.1002/adv.202103135.
114. Min, Z.; Xiaomeng, L.; Zheng, L.; Yangge, D.; Xuejiao, L.; Longwei, L.; Xiao, Z.; Yunsong, L.; Ping, Z.; Yongsheng, Z. Asymmetrical Methyltransferase PRMT3 Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis via MiR-3648. *Cell Death Dis* **2019**, *10*, 581, doi:10.1038/s41419-019-1815-7.
115. Cheng, D.; Gao, G.; Lorenzo, A.D.; Jayne, S.; Hottiger, M.O.; Richard, S.; Bedford, M.T. Genetic Evidence for Partial Redundancy between the Arginine Methyltransferases CARM1 and PRMT6. *J Biol Chem* **2020**, *295*, 17060–17070, doi:10.1074/jbc.ra120.014704.
116. Kim, J.K.; Lim, Y.; Lee, J.O.; Lee, Y.-S.; Won, N.H.; Kim, H.; Kim, H.S. PRMT4 Is Involved in Insulin Secretion via the Methylation of Histone H3 in Pancreatic β Cells. *J Mol Endocrinol* **2015**, *54*, 315–324, doi:10.1530/jme-14-0325.
117. Chiang, K.; Zielinska, A.E.; Shaaban, A.M.; Sanchez-Bailon, M.P.; Jarrold, J.; Clarke, T.L.; Zhang, J.; Francis, A.; Jones, L.J.; Smith, S.; et al. PRMT5 Is a Critical Regulator of Breast Cancer Stem Cell Function via Histone Methylation and FOXP1 Expression. *Cell Reports* **2017**, *21*, 3498–3513, doi:10.1016/j.celrep.2017.11.096.
118. Karkhanis, V.; Wang, L.; Tae, S.; Hu, Y.-J.; Imbalzano, A.N.; Sif, S. Protein Arginine Methyltransferase 7 Regulates Cellular Response to DNA Damage by Methylating Promoter Histones H2A and H4 of the Polymerase δ Catalytic Subunit Gene, POLD1. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 29801–29814, doi:10.1074/jbc.m112.378281.
119. Ge, S.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Tian, Y.; Yang, R.; Chen, X.; Li, F.; Zhang, B. Ribavirin Inhibits Colorectal Cancer Growth by Downregulating PRMT5 Expression and H3R8me2s and H4R3me2s Accumulation. *Toxicol Appl Pharm* **2021**, *415*, 115450, doi:10.1016/j.taap.2021.115450.
120. Okuno, K.; Akiyama, Y.; Shimada, S.; Nakagawa, M.; Tanioka, T.; Inokuchi, M.; Yamaoka, S.; Kojima, K.; Tanaka, S. Asymmetric Dimethylation at Histone H3 Arginine 2 by PRMT6 in Gastric Cancer Progression. *Carcinogenesis* **2018**, *40*, 15–26, doi:10.1093/carcin/bgy147.
121. Fulton, M.D.; Brown, T.; Zheng, Y.G. Mechanisms and Inhibitors of Histone Arginine Methylation. *Chem Rec* **2018**, *18*, 1792–1807, doi:10.1002/tcr.201800082.
122. Cai, S.; Wang, P.; Xie, T.; Li, Z.; Li, J.; Lan, R.; Ding, Y.; Lu, J.; Ye, J.; Wang, J.; et al. Histone H4R3 Symmetric Di-Methylation by Prmt5 Protects against Cardiac Hypertrophy via Regulation of Filip1L/ β -Catenin. *Pharmacol Res* **2020**, *161*, 105104, doi:10.1016/j.phrs.2020.105104.
123. Tarighat, S.S.; Santhanam, R.; Frankhouser, D.; Radomska, H.S.; Lai, H.; Anghelina, M.; Wang, H.; Huang, X.; Alinari, L.; Walker, A.; et al. The Dual Epigenetic Role of PRMT5 in Acute Myeloid Leukemia: Gene Activation and Repression via Histone Arginine Methylation. *Leukemia* **2016**, *30*, 789–799, doi:10.1038/leu.2015.308.

124. Dong, F.; Li, Q.; Yang, C.; Huo, D.; Wang, X.; Ai, C.; Kong, Y.; Sun, X.; Wang, W.; Zhou, Y.; et al. PRMT2 Links Histone H3R8 Asymmetric Dimethylation to Oncogenic Activation and Tumorigenesis of Glioblastoma. *Nat Commun* **2018**, *9*, 4552, doi:10.1038/s41467-018-06968-7.
125. Hu, G.; Yan, C.; Xie, P.; Cao, Y.; Shao, J.; Ge, J. PRMT2 Accelerates Tumorigenesis of Hepatocellular Carcinoma by Activating Bcl2 via Histone H3R8 Methylation. *Exp Cell Res* **2020**, *394*, 112152, doi:10.1016/j.yexcr.2020.112152.
126. Li, J.; Pan, X.; Ren, Z.; Li, B.; Liu, H.; Wu, C.; Dong, X.; Vos, P.; Pan, L.; Sun, J. Protein Arginine Methyltransferase 2 (PRMT2) Promotes Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis by Inhibiting the SOCS3 Promoter via Histone H3R8 Asymmetric Dimethylation. *Brit J Pharmacol* **2022**, *179*, 141–158, doi:10.1111/bph.15695.
127. Blythe, S.A.; Cha, S.-W.; Tadjuidje, E.; Heasman, J.; Klein, P.S. β -Catenin Primes Organizer Gene Expression by Recruiting a Histone H3 Arginine 8 Methyltransferase, Prmt2. *Dev Cell* **2010**, *19*, 220–231, doi:10.1016/j.devcel.2010.07.007.
128. Jain, K.; Jin, C.Y.; Clarke, S.G. Epigenetic Control via Allosteric Regulation of Mammalian Protein Arginine Methyltransferases. *Proc National Acad Sci* **2017**, *114*, 10101–10106, doi:10.1073/pnas.1706978114.
129. Sauter, C.; Simonet, J.; Guidez, F.; Dumétier, B.; Pernon, B.; Callanan, M.; Bastie, J.-N.; Aucagne, R.; Delva, L. Protein Arginine Methyltransferases as Therapeutic Targets in Hematological Malignancies. *Cancers* **2022**, *14*, 5443, doi:10.3390/cancers14215443.
130. Wei, H.-H.; Fan, X.-J.; Hu, Y.; Tian, X.-X.; Guo, M.; Mao, M.-W.; Fang, Z.-Y.; Wu, P.; Gao, S.-X.; Peng, C.; et al. A Systematic Survey of PRMT Interactomes Reveals the Key Roles of Arginine Methylation in the Global Control of RNA Splicing and Translation. *Sci. Bull.* **2021**, *66*, 1342–1357, doi:10.1016/j.scib.2021.01.004.
131. Dionne, K.L.; Bergeron, D.; Landry-Voyer, A.-M.; Bachand, F. The 40S Ribosomal Protein US5 (RPS2) Assembles into an Extraribosomal Complex with Human ZNF277 That Competes with the PRMT3–US5 Interaction. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 1944–1955, doi:10.1074/jbc.ra118.004928.
132. Ren, J.; Wang, Y.; Liang, Y.; Zhang, Y.; Bao, S.; Xu, Z. Methylation of Ribosomal Protein S10 by Protein-Arginine Methyltransferase 5 Regulates Ribosome Biogenesis*. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 12695–12705, doi:10.1074/jbc.m110.103911.
133. Gao, G.; Dhar, S.; Bedford, M.T. PRMT5 Regulates IRES-Dependent Translation via Methylation of HnRNP A1. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, gkw1367-, doi:10.1093/nar/gkw1367.
134. Wall, M.L.; Lewis, S.M. Methylarginines within the RGG-Motif Region of HnRNP A1 Affect Its IRES Trans-Acting Factor Activity and Are Required for HnRNP A1 Stress Granule Localization and Formation. *J. Mol. Biol.* **2017**, *429*, 295–307, doi:10.1016/j.jmb.2016.12.011.
135. Nichols, R.C.; Wang, X.W.; Tang, J.; Hamilton, B.J.; High, F.A.; Herschman, H.R.; Rigby, W.F.C. The RGG Domain in HnRNP A2 Affects Subcellular Localization. *Exp. Cell Res.* **2000**, *256*, 522–532, doi:10.1006/excr.2000.4827.

136. Sengupta, S.; West, K.O.; Sanghvi, S.; Laliotis, G.; Agosto, L.M.; Lynch, K.W.; Tschlis, P.N.; Singh, H.; Patrick, K.L.; Guerau-de-Arellano, M. PRMT5 Promotes Symmetric Dimethylation of RNA Processing Proteins and Modulates Activated T Cell Alternative Splicing and Ca²⁺/NFAT Signaling. *ImmunoHorizons* **2021**, *5*, 884–897, doi:10.4049/immunohorizons.2100076.
137. Côté, J.; Boisvert, F.-M.; Boulanger, M.-C.; Bedford, M.T.; Richard, S. Sam68 RNA Binding Protein Is an In Vivo Substrate for Protein Arginine N-Methyltransferase 1. *Mol. Biol. Cell* **2003**, *14*, 274–287, doi:10.1091/mbc.e02-08-0484.
138. Tradewell, M.L.; Yu, Z.; Tibshirani, M.; Boulanger, M.-C.; Durham, H.D.; Richard, S. Arginine Methylation by PRMT1 Regulates Nuclear-Cytoplasmic Localization and Toxicity of FUS/TLS Harboring ALS-Linked Mutations. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 136–149, doi:10.1093/hmg/ddr448.
139. Cheng, D.; Côté, J.; Shaaban, S.; Bedford, M.T. The Arginine Methyltransferase CARM1 Regulates the Coupling of Transcription and mRNA Processing. *Mol. Cell* **2007**, *25*, 71–83, doi:10.1016/j.molcel.2006.11.019.
140. Yang, Y.; Hadjikyriacou, A.; Xia, Z.; Gayatri, S.; Kim, D.; Zurita-Lopez, C.; Kelly, R.; Guo, A.; Li, W.; Clarke, S.G.; et al. PRMT9 Is a Type II Methyltransferase That Methylates the Splicing Factor SAP145. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6428, doi:10.1038/ncomms7428.
141. Meister, G.; Fischer, U. Assisted RNP Assembly: SMN and PRMT5 Complexes Cooperate in the Formation of Spliceosomal UsnRNPs. *EMBO J.* **2002**, *21*, 5853–5863, doi:10.1093/emboj/cdf585.
142. Xu, J.; Wang, A.H.; Oses-Prieto, J.; Makhijani, K.; Katsuno, Y.; Pei, M.; Yan, L.; Zheng, Y.G.; Burlingame, A.; Brückner, K.; et al. Arginine Methylation Initiates BMP-Induced Smad Signaling. *Mol. Cell* **2013**, *51*, 5–19, doi:10.1016/j.molcel.2013.05.004.
143. Katsuno, Y.; Qin, J.; Oses-Prieto, J.; Wang, H.; Jackson-Weaver, O.; Zhang, T.; Lamouille, S.; Wu, J.; Burlingame, A.; Xu, J.; et al. Arginine Methylation of SMAD7 by PRMT1 in TGF- β -Induced Epithelial–Mesenchymal Transition and Epithelial Stem-Cell Generation. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 13059–13072, doi:10.1074/jbc.ra118.002027.
144. Zhang, T.; Wu, J.; Ungvijanpunya, N.; Jackson-Weaver, O.; Gou, Y.; Feng, J.; Ho, T.V.; Shen, Y.; Liu, J.; Richard, S.; et al. Smad6 Methylation Represses NF κ B Activation and Periodontal Inflammation. *J. Dent. Res.* **2018**, *97*, 810–819, doi:10.1177/0022034518755688.
145. Covic, M.; Hassa, P.O.; Sacconi, S.; Buerki, C.; Meier, N.I.; Lombardi, C.; Imhof, R.; Bedford, M.T.; Natoli, G.; Hottiger, M.O. Arginine Methyltransferase CARM1 Is a Promoter-specific Regulator of NF- κ B-dependent Gene Expression. *Embo J* **2005**, *24*, 85–96, doi:10.1038/sj.emboj.7600500.
146. Wei, H.; Wang, B.; Miyagi, M.; She, Y.; Gopalan, B.; Huang, D.-B.; Ghosh, G.; Stark, G.R.; Lu, T. PRMT5 Dimethylates R30 of the P65 Subunit to Activate NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 13516–13521, doi:10.1073/pnas.1311784110.
147. Hassa, P.O.; Covic, M.; Bedford, M.T.; Hottiger, M.O. Protein Arginine Methyltransferase 1 Coactivates NF- κ B-Dependent Gene Expression Synergistically with CARM1 and PARP1. *J. Mol. Biol.* **2008**, *377*, 668–678, doi:10.1016/j.jmb.2008.01.044.

148. Hsu, J.-M.; Chen, C.-T.; Chou, C.-K.; Kuo, H.-P.; Li, L.-Y.; Lin, C.-Y.; Lee, H.-J.; Wang, Y.-N.; Liu, M.; Liao, H.-W.; et al. Crosstalk between Arg 1175 Methylation and Tyr 1173 Phosphorylation Negatively Modulates EGFR-Mediated ERK Activation. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 174–181, doi:10.1038/ncb2158.
149. Calabretta, S.; Vogel, G.; Yu, Z.; Choquet, K.; Darbelli, L.; Nicholson, T.B.; Kleinman, C.L.; Richard, S. Loss of PRMT5 Promotes PDGFR α Degradation during Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *Dev. Cell* **2018**, *46*, 426–440.e5, doi:10.1016/j.devcel.2018.06.025.
150. Dolezal, E.; Infantino, S.; Drepper, F.; Börsig, T.; Singh, A.; Wossning, T.; Fiala, G.J.; Minguet, S.; Warscheid, B.; Tarlinton, D.M.; et al. The BTG2-PRMT1 Module Limits Pre-B Cell Expansion by Regulating the CDK4-Cyclin-D3 Complex. *Nat Immunol* **2017**, *18*, 911–920, doi:10.1038/ni.3774.
151. Wei, T.W.; Juan, C.; Hisa, J.; Su, L.; Lee, Y.G.; Chou, H.; Chen, J.M.; Wu, Y.; Chiu, S.; Hsu, C.; et al. Protein Arginine Methyltransferase 5 Is a Potential Oncoprotein That Upregulates G1 Cyclins/Cyclin-dependent Kinases and the Phosphoinositide 3-kinase/AKT Signaling Cascade. *Cancer Sci.* **2012**, *103*, 1640–1650, doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02367.x.
152. Amici, S.A.; Osman, W.; Guerau-de-Arellano, M. PRMT5 Promotes Cyclin E1 and Cell Cycle Progression in CD4 Th1 Cells and Correlates With EAE Severity. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 695947, doi:10.3389/fimmu.2021.695947.
153. Kleinschmidt, M.A.; Graaf, P. de; Teeffelen, H.A.A.M. van; Timmers, H.Th.M. Cell Cycle Regulation by the PRMT6 Arginine Methyltransferase through Repression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41446, doi:10.1371/journal.pone.0041446.
154. Kim, S.; Kim, N.H.; Park, J.E.; Hwang, J.W.; Myung, N.; Hwang, K.-T.; Kim, Y.A.; Jang, C.-Y.; Kim, Y.K. PRMT6-Mediated H3R2me2a Guides Aurora B to Chromosome Arms for Proper Chromosome Segregation. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 612, doi:10.1038/s41467-020-14511-w.
155. Maeda, M.; Hasegawa, H.; Sugiyama, M.; Hyodo, T.; Ito, S.; Chen, D.; Asano, E.; Masuda, A.; Hasegawa, Y.; Hamaguchi, M.; et al. Arginine Methylation of Ubiquitin-associated Protein 2-like Is Required for the Accurate Distribution of Chromosomes. *FASEB J.* **2016**, *30*, 312–323, doi:10.1096/fj.14-268987.
156. Messaoudi, S.E.; Fabbrizio, E.; Rodriguez, C.; Chuchana, P.; Fauquier, L.; Cheng, D.; Theillet, C.; Vandel, L.; Bedford, M.T.; Sardet, C. Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1 (CARM1) Is a Positive Regulator of the Cyclin E1 Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 13351–13356, doi:10.1073/pnas.0605692103.
157. Boisvert, F.-M.; Déry, U.; Masson, J.-Y.; Richard, S. Arginine Methylation of MRE11 by PRMT1 Is Required for DNA Damage Checkpoint Control. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 671–676, doi:10.1101/gad.1279805.
158. Boisvert, F.-M.; Hendzel, M.J.; Masson, J.-Y.; Richard, S. Methylation of MRE11 Regulates Its Nuclear Compartmentalization. *Cell Cycle* **2005**, *4*, 981–989, doi:10.4161/cc.4.7.1830.
159. Yu, Z.; Vogel, G.; Coulombe, Y.; Dubeau, D.; Spehalski, E.; Hébert, J.; Ferguson, D.O.; Masson, J.Y.; Richard, S. The MRE11 GAR Motif Regulates DNA Double-Strand Break Processing and ATR Activation. *Cell Res.* **2012**, *22*, 305–320, doi:10.1038/cr.2011.128.

160. He, W.; Ma, X.; Yang, X.; Zhao, Y.; Qiu, J.; Hang, H. A Role for the Arginine Methylation of Rad9 in Checkpoint Control and Cellular Sensitivity to DNA Damage. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 4719–4727, doi:10.1093/nar/gkq1264.
161. Clarke, T.L.; Sanchez-Bailon, M.P.; Chiang, K.; Reynolds, J.J.; Herrero-Ruiz, J.; Bandejas, T.M.; Matias, P.M.; Maslen, S.L.; Skehel, J.M.; Stewart, G.S.; et al. PRMT5-Dependent Methylation of the TIP60 Coactivator RUVBL1 Is a Key Regulator of Homologous Recombination. *Mol. Cell* **2017**, *65*, 900–916.e7, doi:10.1016/j.molcel.2017.01.019.
162. Hamard, P.-J.; Santiago, G.E.; Liu, F.; Karl, D.L.; Martinez, C.; Man, N.; Mookhtiar, A.K.; Duffort, S.; Greenblatt, S.; Verdun, R.E.; et al. PRMT5 Regulates DNA Repair by Controlling the Alternative Splicing of Histone-Modifying Enzymes. *Cell Reports* **2018**, *24*, 2643–2657, doi:10.1016/j.celrep.2018.08.002.
163. Boisvert, F.-M.; Rhie, A.; Richard, S.; Doherty, A.J. The GAR Motif of 53BP1 Is Arginine Methylated by PRMT1 and Is Necessary for 53BP1 DNA Binding Activity. *Cell Cycle* **2005**, *4*, 1834–1841, doi:10.4161/cc.4.12.2250.
164. Adams, M.M.; Wang, B.; Xia, Z.; Morales, J.C.; Lu, X.; Donehower, L.A.; Bochar, D.A.; Elledge, S.J.; Carpenter, P.B. 53BP1 Oligomerization Is Independent of Its Methylation by PRMT1. *Cell Cycle* **2005**, *4*, 1854–1861, doi:10.4161/cc.4.12.2282.
165. Hwang, J.W.; Kim, S.-N.; Myung, N.; Song, D.; Han, G.; Bae, G.-U.; Bedford, M.T.; Kim, Y.K. PRMT5 Promotes DNA Repair through Methylation of 53BP1 and Is Regulated by Src-Mediated Phosphorylation. *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 428, doi:10.1038/s42003-020-01157-z.
166. El-Andaloussi, N.; Valovka, T.; Toueille, M.; Hassa, P.O.; Gehrig, P.; Covic, M.; Hübscher, U.; Hottiger, M.O. Methylation of DNA Polymerase β by Protein Arginine Methyltransferase 1 Regulates Its Binding to Proliferating Cell Nuclear Antigen. *FASEB J.* **2007**, *21*, 26–34, doi:10.1096/fj.06-6194com.
167. Guo, Z.; Zheng, L.; Xu, H.; Dai, H.; Zhou, M.; Pascua, M.R.; Chen, Q.M.; Shen, B. Methylation of FEN1 Suppresses Nearby Phosphorylation and Facilitates PCNA Binding. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 766–773, doi:10.1038/nchembio.422.
168. Jansson, M.; Durant, S.T.; Cho, E.-C.; Sheahan, S.; Edelman, M.; Kessler, B.; Thangue, N.B.L. Arginine Methylation Regulates the P53 Response. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1431–1439, doi:10.1038/ncb1802.
169. Scoumanne, A.; Zhang, J.; Chen, X. PRMT5 Is Required for Cell-Cycle Progression and P53 Tumor Suppressor Function. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4965–4976, doi:10.1093/nar/gkp516.
170. Cho, E.; Zheng, S.; Munro, S.; Liu, G.; Carr, S.M.; Moehlenbrink, J.; Lu, Y.; Stimson, L.; Khan, O.; Konietzny, R.; et al. Arginine Methylation Controls Growth Regulation by E2F-1. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1785–1797, doi:10.1038/emboj.2012.17.
171. Karamitros, D.; Stoilova, B.; Aboukhalil, Z.; Hamey, F.; Reinisch, A.; Samitsch, M.; Quek, L.; Otto, G.; Repapi, E.; Doondeea, J.; et al. Single-Cell Analysis Reveals the Continuum of Human Lympho-Myeloid Progenitor Cells. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 85–97, doi:10.1038/s41590-017-0001-2.

172. Comazzetto, S.; Shen, B.; Morrison, S.J. Niches That Regulate Stem Cells and Hematopoiesis in Adult Bone Marrow. *Dev. Cell* **2021**, *56*, 1848–1860, doi:10.1016/j.devcel.2021.05.018.
173. Sanjuan-Pla, A.; Macaulay, I.C.; Jensen, C.T.; Woll, P.S.; Luis, T.C.; Mead, A.; Moore, S.; Carella, C.; Matsuoka, S.; Jones, T.B.; et al. Platelet-Biased Stem Cells Reside at the Apex of the Haematopoietic Stem-Cell Hierarchy. *Nature* **2013**, *502*, 232–236, doi:10.1038/nature12495.
174. Haas, S.; Trumpp, A.; Milsom, M.D. Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. *Cell Stem Cell* **2018**, *22*, 627–638, doi:10.1016/j.stem.2018.04.003.
175. Zhang, Y.; Huang, Y.; Hu, L.; Cheng, T. New Insights into Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells via Single-Cell Omics. *Stem Cell Rev. Rep.* **2022**, *18*, 1322–1336, doi:10.1007/s12015-022-10330-2.
176. Zhao, X.; Jankovic, V.; Gural, A.; Huang, G.; Pardanani, A.; Menendez, S.; Zhang, J.; Dunne, R.; Xiao, A.; Erdjument-Bromage, H.; et al. Methylation of RUNX1 by PRMT1 Abrogates SIN3A Binding and Potentiates Its Transcriptional Activity. *Gene Dev* **2008**, *22*, 640–653, doi:10.1101/gad.1632608.
177. Mizutani, S.; Yoshida, T.; Zhao, X.; Nimer, S.D.; Taniwaki, M.; Okuda, T. Loss of RUNX1/AML1 Arginine-methylation Impairs Peripheral T Cell Homeostasis. *Brit J Haematol* **2015**, *170*, 859–873, doi:10.1111/bjh.13499.
178. Chang, Y.-I.; Hua, W.-K.; Yao, C.-L.; Hwang, S.-M.; Hung, Y.-C.; Kuan, C.-J.; Leou, J.-S.; Lin, W.-J. Protein-Arginine Methyltransferase 1 Suppresses Megakaryocytic Differentiation via Modulation of the P38 MAPK Pathway in K562 Cells. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 20595–20606, doi:10.1074/jbc.m109.092411.
179. Zhang, L.; Tran, N.-T.; Su, H.; Wang, R.; Lu, Y.; Tang, H.; Aoyagi, S.; Guo, A.; Khodadadi-Jamayran, A.; Zhou, D.; et al. Cross-Talk between PRMT1-Mediated Methylation and Ubiquitylation on RBM15 Controls RNA Splicing. *Elife* **2015**, *4*, e07938, doi:10.7554/elife.07938.
180. Liu, F.; Cheng, G.; Hamard, P.-J.; Greenblatt, S.; Wang, L.; Man, N.; Perna, F.; Xu, H.; Tadi, M.; Luciani, L.; et al. Arginine Methyltransferase PRMT5 Is Essential for Sustaining Normal Adult Hematopoiesis. *J Clin Invest* **2015**, *125*, 3532–3544, doi:10.1172/jci81749.
181. Li, S.; Ali, S.; Duan, X.; Liu, S.; Du, J.; Liu, C.; Dai, H.; Zhou, M.; Zhou, L.; Yang, L.; et al. JMJD1B Demethylates H4R3me2s and H3K9me2 to Facilitate Gene Expression for Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Reports* **2018**, *23*, 389–403, doi:10.1016/j.celrep.2018.03.051.
182. Gupta, P.; Singh, A.; Gowda, P.; Ghosh, S.; Chatterjee, A.; Sen, E. Lactate Induced HIF-1 α -PRMT1 Cross Talk Affects MHC I Expression in Monocytes. *Exp Cell Res* **2016**, *347*, 293–300, doi:10.1016/j.yexcr.2016.08.008.
183. Fan, Z.; Li, J.; Li, P.; Ye, Q.; Xu, H.; Wu, X.; Xu, Y. Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) Represses MHC II Transcription in Macrophages by Methylating CIITA. *Sci Rep-uk* **2017**, *7*, 40531, doi:10.1038/srep40531.
184. Cho, J.-H.; Lee, R.; Kim, E.; Choi, Y.E.; Choi, E.-J. PRMT1 Negatively Regulates Activation-Induced Cell Death in Macrophages by Arginine Methylation of GAPDH. *Exp Cell Res* **2018**, *368*, 50–58, doi:10.1016/j.yexcr.2018.04.012.

185. Infantino, S.; Light, A.; O'Donnell, K.; Bryant, V.; Avery, D.T.; Elliott, M.; Tangye, S.G.; Belz, G.; Mackay, F.; Richard, S.; et al. Arginine Methylation Catalyzed by PRMT1 Is Required for B Cell Activation and Differentiation. *Nat Commun* **2017**, *8*, 891, doi:10.1038/s41467-017-01009-1.
186. Hata, K.; Yanase, N.; Sudo, K.; Kiyonari, H.; Mukumoto, Y.; Mizuguchi, J.; Yokosuka, T. Differential Regulation of T-cell Dependent and T-cell Independent Antibody Responses through Arginine Methyltransferase PRMT1 in Vivo. *Febs Lett* **2016**, *590*, 1200–1210, doi:10.1002/1873-3468.12161.
187. Sung, B.-Y.; Lin, Y.-H.; Kong, Q.; Shah, P.D.; Bieler, J.G.; Palmer, S.; Weinhold, K.J.; Chang, H.-R.; Huang, H.; Avery, R.K.; et al. Wnt Activation Promotes Memory T Cell Polyfunctionality via Epigenetic Regulator PRMT1. *J Clin Invest* **2022**, *132*, e140508, doi:10.1172/jci140508.
188. Sen, S.; He, Z.; Ghosh, S.; Dery, K.J.; Yang, L.; Zhang, J.; Sun, Z. PRMT1 Plays a Critical Role in Th17 Differentiation by Regulating Reciprocal Recruitment of STAT3 and STAT5. *J Immunol* **2018**, *201*, 440–450, doi:10.4049/jimmunol.1701654.
189. Kagoya, Y.; Saijo, H.; Matsunaga, Y.; Guo, T.; Saso, K.; Anczurowski, M.; Wang, C.-H.; Sugata, K.; Murata, K.; Butler, M.O.; et al. Arginine Methylation of FOXP3 Is Crucial for the Suppressive Function of Regulatory T Cells. *J Autoimmun* **2019**, *97*, 10–21, doi:10.1016/j.jaut.2018.09.011.
190. Zheng, Y.; Chen, Z.; Zhou, B.; Chen, S.; Han, L.; Chen, N.; Ma, Y.; Xie, G.; Yang, J.; Nie, H.; et al. PRMT5 Deficiency Enforces the Transcriptional and Epigenetic Programs of Klr1+CD8+ Terminal Effector T Cells and Promotes Cancer Development. *J Immunol* **2021**, *208*, ji2100523, doi:10.4049/jimmunol.2100523.
191. Li, J.; Zhao, Z.; Carter, C.; Ehrlich, L.I.R.; Bedford, M.T.; Richie, E.R. Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1 Regulates Fetal Hematopoiesis and Thymocyte Development. *J Immunol* **2013**, *190*, 597–604, doi:10.4049/jimmunol.1102513.
192. Kim, J.; Lee, J.; Yadav, N.; Wu, Q.; Carter, C.; Richard, S.; Richie, E.; Bedford, M.T. Loss of CARM1 Results in Hypomethylation of Thymocyte Cyclic AMP-Regulated Phosphoprotein and Deregulated Early T Cell Development. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 25339–25344, doi:10.1074/jbc.m402544200.
193. Alaggio, R.; Amador, C.; Anagnostopoulos, I.; Attygalle, A.D.; Araujo, I.B. de O.; Berti, E.; Bhagat, G.; Borges, A.M.; Boyer, D.; Calaminici, M.; et al. The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* **2022**, *36*, 1720–1748, doi:10.1038/s41375-022-01620-2.
194. Khoury, J.D.; Solary, E.; Abla, O.; Akkari, Y.; Alaggio, R.; Apperley, J.F.; Bejar, R.; Berti, E.; Busque, L.; Chan, J.K.C.; et al. The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* **2022**, *36*, 1703–1719, doi:10.1038/s41375-022-01613-1.
195. Döhner, H.; Estey, E.; Grimwade, D.; Amadori, S.; Appelbaum, F.R.; Büchner, T.; Dombret, H.; Ebert, B.L.; Fenaux, P.; Larson, R.A.; et al. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel. *Blood* **2017**, *129*, 424–447, doi:10.1182/blood-2016-08-733196.

196. Döhner, H.; Wei, A.H.; Appelbaum, F.R.; Craddock, C.; DiNardo, C.D.; Dombret, H.; Ebert, B.L.; Fenaux, P.; Godley, L.A.; Hasserjian, R.P.; et al. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel. *Blood* **2022**, *140*, 1345–1377, doi:10.1182/blood.2022016867.
197. Loke, J.; Buka, R.; Craddock, C. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Who, When, and How? *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 659595, doi:10.3389/fimmu.2021.659595.
198. Shimony, S.; Stahl, M.; Stone, R.M. Acute Myeloid Leukemia: 2023 Update on Diagnosis, Risk-stratification, and Management. *Am. J. Hematol.* **2023**, *98*, 502–526, doi:10.1002/ajh.26822.
199. Zhu, Y.; He, X.; Lin, Y.-C.; Dong, H.; Zhang, L.; Chen, X.; Wang, Z.; Shen, Y.; Li, M.; Wang, H.; et al. Targeting PRMT1-Mediated FLT3 Methylation Disrupts Maintenance of MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* **2019**, *134*, 1257–1268, doi:10.1182/blood.2019002457.
200. He, X.; Zhu, Y.; Lin, Y.-C.; Li, M.; Du, J.; Dong, H.; Sun, J.; Zhu, L.; Wang, H.; Ding, Z.; et al. PRMT1-Mediated FLT3 Arginine Methylation Promotes Maintenance of FLT3-ITD+ Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2019**, *134*, 548–560, doi:10.1182/blood.2019001282.
201. Siriboonpiputtana, T.; Zeisig, B.B.; Zarowiecki, M.; Fung, T.K.; Mallardo, M.; Tsai, C.; Lau, P.N.I.; Hoang, Q.C.; Veiga, P.; Barnes, J.; et al. Transcriptional Memory of Cells of Origin Overrides B-catenin Requirement of MLL Cancer Stem Cells. *Embo J* **2017**, *36*, 3139–3155, doi:10.15252/emj.201797994.
202. Cheung, N.; Chan, L.C.; Thompson, A.; Cleary, M.L.; So, C.W.E. Protein Arginine-Methyltransferase-Dependent Oncogenesis. *Nat Cell Biol* **2007**, *9*, 1208–1215, doi:10.1038/ncb1642.
203. Cheung, N.; Fung, T.K.; Zeisig, B.B.; Holmes, K.; Rane, J.K.; Mowen, K.A.; Finn, M.G.; Lenhard, B.; Chan, L.C.; So, C.W.E. Targeting Aberrant Epigenetic Networks Mediated by PRMT1 and KDM4C in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 32–48, doi:10.1016/j.ccell.2015.12.007.
204. Shia, W.-J.; Okumura, A.J.; Yan, M.; Sarkeshik, A.; Lo, M.-C.; Matsuura, S.; Komeno, Y.; Zhao, X.; Nimer, S.D.; Yates, J.R.; et al. PRMT1 Interacts with AML1-ETO to Promote Its Transcriptional Activation and Progenitor Cell Proliferative Potential. *Blood* **2012**, *119*, 4953–4962, doi:10.1182/blood-2011-04-347476.
205. Zou, L.; Zhang, H.; Du, C.; Liu, X.; Zhu, S.; Zhang, W.; Li, Z.; Gao, C.; Zhao, X.; Mei, M.; et al. Correlation of SRSF1 and PRMT1 Expression with Clinical Status of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Hematol Oncol* **2012**, *5*, 42, doi:10.1186/1756-8722-5-42.
206. Streubel, G.; Bouchard, C.; Berberich, H.; Zeller, M.S.; Teichmann, S.; Adamkiewicz, J.; Müller, R.; Klempnauer, K.-H.; Bauer, U.-M. PRMT4 Is a Novel Coactivator of C-Myb-Dependent Transcription in Haematopoietic Cell Lines. *Plos Genet* **2013**, *9*, e1003343, doi:10.1371/journal.pgen.1003343.
207. Greenblatt, S.M.; Man, N.; Hamard, P.-J.; Asai, T.; Karl, D.; Martinez, C.; Bilbao, D.; Stathias, V.; Jermakowicz, A.M.; Duffort, S.; et al. CARM1 Is Essential for Myeloid Leukemogenesis but Dispensable for Normal Hematopoiesis. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 1111–1127.e5, doi:10.1016/j.ccell.2018.05.007.

208. Radzishauskaya, A.; Shliaha, P.V.; Grinev, V.; Lorenzini, E.; Kovalchuk, S.; Shlyueva, D.; Gorshkov, V.; Hendrickson, R.C.; Jensen, O.N.; Helin, K. PRMT5 Methylome Profiling Uncovers a Direct Link to Splicing Regulation in Acute Myeloid Leukemia. *Nat Struct Mol Biol* **2019**, *26*, 999–1012, doi:10.1038/s41594-019-0313-z.
209. Serio, J.; Ropa, J.; Chen, W.; Mysliwski, M.; Saha, N.; Chen, L.; Wang, J.; Miao, H.; Cierpicki, T.; Grembecka, J.; et al. The PAF Complex Regulation of Prmt5 Facilitates the Progression and Maintenance of MLL Fusion Leukemia. *Oncogene* **2018**, *37*, 450–460, doi:10.1038/onc.2017.337.
210. Zhao, L.; Cheng, B.; Xiong, J.; Ma, D.; Liu, X.; Wang, L.; Zhang, X.; Wang, J. Protein Arginine Methyltransferase 5 Promotes the Migration of AML Cells by Regulating the Expression of Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor B4. *Biomed Res Int* **2021**, *2021*, 7329072, doi:10.1155/2021/7329072.
211. Huang, X.; Yang, Y.; Zhu, D.; Zhao, Y.; Wei, M.; Li, K.; Zhu, H.; Zheng, X. PRMT5-Mediated RNF4 Methylation Promotes Therapeutic Resistance of APL Cells to As2O3 by Stabilizing Oncoprotein PML-RAR α . *Cell Mol Life Sci* **2022**, *79*, 319, doi:10.1007/s00018-022-04358-3.
212. Wang, L.; Pal, S.; Sif, S. Protein Arginine Methyltransferase 5 Suppresses the Transcription of the RB Family of Tumor Suppressors in Leukemia and Lymphoma Cells. *Mol Cell Biol* **2008**, *28*, 6262–6277, doi:10.1128/mcb.00923-08.
213. Pal, S.; Baiocchi, R.A.; Byrd, J.C.; Grever, M.R.; Jacob, S.T.; Sif, S. Low Levels of MiR-92b/96 Induce PRMT5 Translation and H3R8/H4R3 Methylation in Mantle Cell Lymphoma. *Embo J* **2007**, *26*, 3558–3569, doi:10.1038/sj.emboj.7601794.
214. Karkhanis, V.; Alinari, L.; Ozer, H.G.; Chung, J.; Zhang, X.; Sif, S.; Baiocchi, R.A. Protein Arginine Methyltransferase 5 Represses Tumor Suppressor MiRNAs That Down-Regulate CYCLIN D1 and c-MYC Expression in Aggressive B-Cell Lymphoma. *J Biol Chem* **2020**, *295*, 1165–1180, doi:10.1016/s0021-9258(17)49877-2.
215. Li, Y.; Chitnis, N.; Nakagawa, H.; Kita, Y.; Natsugoe, S.; Yang, Y.; Li, Z.; Wasik, M.; Klein-Szanto, A.J.P.; Rustgi, A.K.; et al. PRMT5 Is Required for Lymphomagenesis Triggered by Multiple Oncogenic Drivers. *Cancer Discov* **2015**, *5*, 288–303, doi:10.1158/2159-8290.cd-14-0625.
216. Chung, J.; Karkhanis, V.; Tae, S.; Yan, F.; Smith, P.; Ayers, L.W.; Agostinelli, C.; Pileri, S.; Denis, G.V.; Baiocchi, R.A.; et al. Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5) Inhibition Induces Lymphoma Cell Death through Reactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Pathway and Polycomb Repressor Complex 2 (PRC2) Silencing. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 35534–35547, doi:10.1074/jbc.m113.510669.
217. Chung, J.; Karkhanis, V.; Baiocchi, R.A.; Sif, S. Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5) Promotes Survival of Lymphoma Cells via Activation of WNT/ β -Catenin and AKT/GSK3 β Proliferative Signaling. *J Biol Chem* **2019**, *294*, 7692–7710, doi:10.1074/jbc.ra119.007640.
218. Koh, C.M.; Bezzi, M.; Low, D.H.P.; Ang, W.X.; Teo, S.X.; Gay, F.P.H.; Al-Haddawi, M.; Tan, S.Y.; Osato, M.; Sabò, A.; et al. MYC Regulates the Core Pre-mRNA Splicing Machinery as an Essential Step in Lymphomagenesis. *Nature* **2015**, *523*, 96–100, doi:10.1038/nature14351.
219. Zhu, F.; Guo, H.; Bates, P.D.; Zhang, S.; Zhang, H.; Nomie, K.J.; Li, Y.; Lu, L.; Seibold, K.R.; Wang, F.; et al. PRMT5 Is Upregulated by B-Cell Receptor Signaling and Forms a Positive-Feedback Loop with PI3K/AKT in Lymphoma Cells. *Leukemia* **2019**, *33*, 2898–2911, doi:10.1038/s41375-019-0489-6.

220. Lu, X.; Fernando, T.M.; Lossos, C.; Yusufova, N.; Liu, F.; Fontán, L.; Durant, M.; Geng, H.; Melnick, J.; Luo, Y.; et al. PRMT5 Interacts with the BCL6 Oncoprotein and Is Required for Germinal Center Formation and Lymphoma Cell Survival. *Blood* **2018**, *132*, 2026–2039, doi:10.1182/blood-2018-02-831438.
221. Gullà, A.; Hideshima, T.; Bianchi, G.; Fulciniti, M.; Samur, M.K.; Qi, J.; Tai, Y.-T.; Harada, T.; Morelli, E.; Amodio, N.; et al. Protein Arginine Methyltransferase 5 Has Prognostic Relevance and Is a Druggable Target in Multiple Myeloma. *Leukemia* **2018**, *32*, 996–1002, doi:10.1038/leu.2017.334.
222. Xia, T.; Liu, M.; Zhao, Q.; Ouyang, J.; Xu, P.; Chen, B. PRMT5 Regulates Cell Pyroptosis by Silencing CASP1 in Multiple Myeloma. *Cell Death Dis* **2021**, *12*, 851, doi:10.1038/s41419-021-04125-5.
223. Hyllus, D.; Stein, C.; Schnabel, K.; Schiltz, E.; Imhof, A.; Dou, Y.; Hsieh, J.; Bauer, U.-M. PRMT6-Mediated Methylation of R2 in Histone H3 Antagonizes H3 K4 Trimethylation. *Gene Dev* **2007**, *21*, 3369–3380, doi:10.1101/gad.447007.
224. Guccione, E.; Bassi, C.; Casadio, F.; Martinato, F.; Cesaroni, M.; Schuchlantz, H.; Lüscher, B.; Amati, B. Methylation of Histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL Complex Are Mutually Exclusive. *Nature* **2007**, *449*, 933–937, doi:10.1038/nature06166.
225. Schneider, L.; Herkt, S.; Wang, L.; Feld, C.; Wesely, J.; Kuvardina, O.N.; Meyer, A.; Oellerich, T.; Häupl, B.; Seifried, E.; et al. PRMT6 Activates Cyclin D1 Expression in Conjunction with the Transcription Factor LEF1. *Oncogenesis* **2021**, *10*, 42, doi:10.1038/s41389-021-00332-z.
226. Herglotz, J.; Kuvardina, O.N.; Kolodziej, S.; Kumar, A.; Hussong, H.; Grez, M.; Lausen, J. Histone Arginine Methylation Keeps RUNX1 Target Genes in an Intermediate State. *Oncogene* **2013**, *32*, 2565–2575, doi:10.1038/onc.2012.274.
227. Kolodziej, S.; Kuvardina, O.N.; Oellerich, T.; Herglotz, J.; Backert, I.; Kohrs, N.; Buscató, Estel. I.; Wittmann, S.K.; Salinas-Riester, G.; Bonig, H.; et al. PADI4 Acts as a Coactivator of Tal1 by Counteracting Repressive Histone Arginine Methylation. *Nat Commun* **2014**, *5*, 3995, doi:10.1038/ncomms4995.
228. Oksa, L.; Mäkinen, A.; Nikkilä, A.; Hyvärinen, N.; Laukkanen, S.; Rokka, A.; Haapaniemi, P.; Seki, M.; Takita, J.; Kauko, O.; et al. Arginine Methyltransferase PRMT7 Dereglates Expression of RUNX1 Target Genes in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers* **2022**, *14*, 2169, doi:10.3390/cancers14092169.
229. Morettin, A.; Baldwin, R.M.; Côté, J. Arginine Methyltransferases as Novel Therapeutic Targets for Breast Cancer. *Mutagenesis* **2015**, *30*, 177–189, doi:10.1093/mutage/geu039.
230. Malbeteau, L.; Jacquemetton, J.; Languilaire, C.; Corbo, L.; Romancer, M.L.; Poulard, C. PRMT1, a Key Modulator of Unliganded Progesterone Receptor Signaling in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9509, doi:10.3390/ijms23179509.
231. Wang, S.-C.M.; Dowhan, D.H.; Muscat, G.E.O. Epigenetic Arginine Methylation in Breast Cancer: Emerging Therapeutic Strategies. *J Mol Endocrinol* **2019**, *62*, R223–R237, doi:10.1530/jme-18-0224.

232. Abumustafa, W.; Zamer, B.A.; Khalil, B.A.; Hamad, M.; Maghazachi, A.A.; Muhammad, J.S. Protein Arginine N-Methyltransferase 5 in Colorectal Carcinoma: Insights into Mechanisms of Pathogenesis and Therapeutic Strategies. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *145*, 112368, doi:10.1016/j.biopha.2021.112368.
233. Yin, X.-K.; Wang, Y.-L.; Wang, F.; Feng, W.-X.; Bai, S.-M.; Zhao, W.-W.; Feng, L.-L.; Wei, M.-B.; Qin, C.-L.; Wang, F.; et al. PRMT1 Enhances Oncogenic Arginine Methylation of NONO in Colorectal Cancer. *Oncogene* **2021**, *40*, 1375–1389, doi:10.1038/s41388-020-01617-0.
234. Zhang, M.; Wu, W.; Gao, M.; Zhang, J.; Ding, X.; Zhu, R.; Chen, H.; Fei, Z. Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1 Promotes Cell Growth and Is Targeted by MicroRNA-195-5p in Human Colorectal Cancer. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 1010428317694305, doi:10.1177/1010428317694305.
235. Grypari, I.M.; Pappa, I.; Papastergiou, T.; Zolota, V.; Bravou, V.; Melachrinou, M.; Megalooikonomou, V.; Tzelepi, V. Elucidating the Role of PRMTs in Prostate Cancer Using Open Access Databases and a Patient Cohort Dataset. *Histol. Histopathol.* **2022**, *38*, 287–302, doi:10.14670/hh-18-513.
236. Zakrzewicz, D.; Didiasova, M.; Krüger, M.; Gaiimo, B.D.; Borggreffe, T.; Mieth, M.; Hocke, A.C.; Zakrzewicz, A.; Schaefer, L.; Preissner, K.T.; et al. Protein Arginine Methyltransferase 5 Mediates Enolase-1 Cell Surface Trafficking in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 1816–1827, doi:10.1016/j.bbadis.2018.02.021.
237. Elakoum, R.; Gauchotte, G.; Oussalah, A.; Wissler, M.-P.; Clément-Duchêne, C.; Vignaud, J.-M.; Guéant, J.-L.; Namour, F. CARM1 and PRMT1 Are Dysregulated in Lung Cancer without Hierarchical Features. *Biochimie* **2014**, *97*, 210–218, doi:10.1016/j.biochi.2013.10.021.
238. Xie, V.K.; He, J.; Xie, K. Protein Arginine Methylation Promotes Therapeutic Resistance in Human Pancreatic Cancer. *Cytokine Growth F R* **2020**, *55*, 58–69, doi:10.1016/j.cytogfr.2020.07.011.
239. Bryant, J.-P.; Heiss, J.; Banasavadi-Siddegowda, Y.K. Arginine Methylation in Brain Tumors: Tumor Biology and Therapeutic Strategies. *Cells* **2021**, *10*, 124, doi:10.3390/cells10010124.
240. Jiang, H.; Zhou, Z.; Jin, S.; Xu, K.; Zhang, H.; Xu, J.; Sun, Q.; Wang, J.; Xu, J. PRMT9 Promotes Hepatocellular Carcinoma Invasion and Metastasis via Activating PI3K/Akt/GSK-3 β /Snail Signaling. *Cancer Sci.* **2018**, *109*, 1414–1427, doi:10.1111/cas.13598.
241. Zhang, B.; Dong, S.; Li, Z.; Lu, L.; Zhang, S.; Chen, X.; Cen, X.; Wu, Y. Targeting Protein Arginine Methyltransferase 5 Inhibits Human Hepatocellular Carcinoma Growth via the Downregulation of Beta-Catenin. *J. Transl. Med.* **2015**, *13*, 349, doi:10.1186/s12967-015-0721-8.
242. Wang, B.; Ding, D.; Zhang, X.; Zhang, J.; Zhang, H.; Liu, X.; Chang, H.; Gao, Z.; Yu, Z. The Role of Protein Arginine Methyltransferases in Pathogenesis and Treatment of Digestive System Carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **2023**, *22*, 926–935, doi:10.1158/1535-7163.mct-22-0746.
243. Kim, H.; Kim, H.; Feng, Y.; Li, Y.; Tamiya, H.; Tocci, S.; Ronai, Z.A. PRMT5 Control of CGAS/STING and NLRC5 Pathways Defines Melanoma Response to Antitumor Immunity. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, doi:10.1126/scitranslmed.aaz5683.

244. Chuang, C.-Y.; Chang, C.-P.; Lee, Y.-J.; Lin, W.-L.; Chang, W.-W.; Wu, J.-S.; Cheng, Y.-W.; Lee, H.; Li, C. PRMT1 Expression Is Elevated in Head and Neck Cancer and Inhibition of Protein Arginine Methylation by Adenosine Dialdehyde or PRMT1 Knockdown Downregulates Proliferation and Migration of Oral Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 1115–1123, doi:10.3892/or.2017.5737.
245. Karakashev, S.; Zhu, H.; Wu, S.; Yokoyama, Y.; Bitler, B.G.; Park, P.-H.; Lee, J.-H.; Kossenkov, A.V.; Gaonkar, K.S.; Yan, H.; et al. CARM1-Expressing Ovarian Cancer Depends on the Histone Methyltransferase EZH2 Activity. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 631, doi:10.1038/s41467-018-03031-3.
246. Hu, G.; Wang, X.; Han, Y.; Wang, P. Protein Arginine Methyltransferase 5 Promotes Bladder Cancer Growth through Inhibiting NF-KB Dependent Apoptosis. *EXCLI J.* **2018**, *17*, 1157–1166, doi:10.17179/excli2018-1719.
247. Fong, J.Y.; Pignata, L.; Goy, P.-A.; Kawabata, K.C.; Lee, S.C.-W.; Koh, C.M.; Musiani, D.; Massignani, E.; Kotini, A.G.; Penson, A.; et al. Therapeutic Targeting of RNA Splicing Catalysis through Inhibition of Protein Arginine Methylation. *Cancer Cell* **2019**, *36*, 194-209.e9, doi:10.1016/j.ccell.2019.07.003.
248. Wang, C.; Jiang, H.; Jin, J.; Xie, Y.; Chen, Z.; Zhang, H.; Lian, F.; Liu, Y.-C.; Zhang, C.; Ding, H.; et al. Development of Potent Type I Protein Arginine Methyltransferase (PRMT) Inhibitors of Leukemia Cell Proliferation. *J Med Chem* **2017**, *60*, 8888–8905, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01134.
249. Yan, L.; Yan, C.; Qian, K.; Su, H.; Kofsky-Wofford, S.A.; Lee, W.-C.; Zhao, X.; Ho, M.-C.; Ivanov, I.; Zheng, Y.G. Diamidine Compounds for Selective Inhibition of Protein Arginine Methyltransferase 1. *J Med Chem* **2014**, *57*, 2611–2622, doi:10.1021/jm401884z.
250. Zhu, L.; He, X.; Dong, H.; Sun, J.; Wang, H.; Zhu, Y.; Huang, F.; Zou, J.; Chen, Z.; Zhao, X.; et al. Protein Arginine Methyltransferase 1 Is Required for Maintenance of Normal Adult Hematopoiesis. *Int J Biol Sci* **2019**, *15*, 2763–2773, doi:10.7150/ijbs.38859.
251. Eram, M.S.; Shen, Y.; Szewczyk, M.M.; Wu, H.; Senisterra, G.; Li, F.; Butler, K.V.; Kaniskan, H.U.; Speed, B.A.; Seña, C. dela; et al. A Potent, Selective, and Cell-Active Inhibitor of Human Type I Protein Arginine Methyltransferases. *Acs Chem Biol* **2016**, *11*, 772–781, doi:10.1021/acscchembio.5b00839.
252. Bonham, K.; Hemmers, S.; Lim, Y.; Hill, D.M.; Finn, M.G.; Mowen, K.A. Effects of a Novel Arginine Methyltransferase Inhibitor on T-helper Cell Cytokine Production. *Febs J* **2010**, *277*, 2096–2108, doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07623.x.
253. Bissinger, E.-M.; Heinke, R.; Spannhoff, A.; Eberlin, A.; Metzger, E.; Cura, V.; Hassenboehler, P.; Cavarelli, J.; Schüle, R.; Bedford, M.T.; et al. Acyl Derivatives of P-Aminosulfonamides and Dapsone as New Inhibitors of the Arginine Methyltransferase HPRMT1. *Bioorgan Med Chem* **2011**, *19*, 3717–3731, doi:10.1016/j.bmc.2011.02.032.
254. Spannhoff, A.; Machmur, R.; Heinke, R.; Trojer, P.; Bauer, I.; Brosch, G.; Schüle, R.; Hanefeld, W.; Sippl, W.; Jung, M. A Novel Arginine Methyltransferase Inhibitor with Cellular Activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, 4150–4153, doi:10.1016/j.bmcl.2007.05.088.
255. Drew, A.E.; Moradei, O.; Jacques, S.L.; Rioux, N.; Boriack-Sjodin, A.P.; Allain, C.; Scott, M.P.; Jin, L.; Raimondi, A.; Handler, J.L.; et al. Identification of a CARM1 Inhibitor with Potent In Vitro and In Vivo Activity in Preclinical Models of Multiple Myeloma. *Sci Rep-uk* **2017**, *7*, 17993, doi:10.1038/s41598-017-18446-z.

256. Nakayama, K.; Szewczyk, M.M.; Sena, C. dela; Wu, H.; Dong, A.; Zeng, H.; Li, F.; Freitas, R.F. de; Eram, M.S.; Schapira, M.; et al. TP-064, a Potent and Selective Small Molecule Inhibitor of PRMT4 for Multiple Myeloma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 18480–18493, doi:10.18632/oncotarget.24883.
257. Veazey, K.J.; Cheng, D.; Lin, K.; Villarreal, O.D.; Gao, G.; Perez-Oquendo, M.; Van, H.T.; Stratton, S.A.; Green, M.; Xu, H.; et al. CARM1 Inhibition Reduces Histone Acetyltransferase Activity Causing Synthetic Lethality in CREBBP/EP300-Mutated Lymphomas. *Leukemia* **2020**, *34*, 3269–3285, doi:10.1038/s41375-020-0908-8.
258. Chan-Penebre, E.; Kuplast, K.G.; Majer, C.R.; Boriack-Sjodin, P.A.; Wigle, T.J.; Johnston, L.D.; Rioux, N.; Munchhof, M.J.; Jin, L.; Jacques, S.L.; et al. A Selective Inhibitor of PRMT5 with in Vivo and in Vitro Potency in MCL Models. *Nat Chem Biol* **2015**, *11*, 432–437, doi:10.1038/nchembio.1810.
259. Secker, K.-A.; Keppeler, H.; Duerr-Stoerzer, S.; Schmid, H.; Schneidawind, D.; Hentrich, T.; Schulze-Hentrich, J.M.; Mankel, B.; Fend, F.; Schneidawind, C. Inhibition of DOT1L and PRMT5 Promote Synergistic Anti-Tumor Activity in a Human MLL Leukemia Model Induced by CRISPR/Cas9. *Oncogene* **2019**, *38*, 7181–7195, doi:10.1038/s41388-019-0937-9.
260. Schnormeier, A.-K.; Pommerenke, C.; Kaufmann, M.; Drexler, H.G.; Koeppel, M. Genomic Deregulation of PRMT5 Supports Growth and Stress Tolerance in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Sci Rep-uk* **2020**, *10*, 9775, doi:10.1038/s41598-020-66224-1.
261. Duncan, K.W.; Rioux, N.; Boriack-Sjodin, P.A.; Munchhof, M.J.; Reiter, L.A.; Majer, C.R.; Jin, L.; Johnston, L.D.; Chan-Penebre, E.; Kuplast, K.G.; et al. Structure and Property Guided Design in the Identification of PRMT5 Tool Compound EPZ015666. *Acs Med Chem Lett* **2016**, *7*, 162–166, doi:10.1021/acsmedchemlett.5b00380.
262. Gerhart, S.V.; Kellner, W.A.; Thompson, C.; Pappalardi, M.B.; Zhang, X.-P.; Oca, R.M. de; Penebre, E.; Duncan, K.; Boriack-Sjodin, A.; Le, B.; et al. Activation of the P53-MDM4 Regulatory Axis Defines the Anti-Tumour Response to PRMT5 Inhibition through Its Role in Regulating Cellular Splicing. *Sci Rep-uk* **2018**, *8*, 9711, doi:10.1038/s41598-018-28002-y.
263. Szewczyk, M.M.; Luciani, G.M.; Vu, V.; Murison, A.; Dilworth, D.; Barghout, S.H.; Lupien, M.; Arrowsmith, C.H.; Minden, M.D.; Baryshte-Lovejoy, D. PRMT5 Regulates ATF4 Transcript Splicing and Oxidative Stress Response. *Redox Biol* **2022**, *51*, 102282, doi:10.1016/j.redox.2022.102282.
264. Liu, F.; Xu, Y.; Lu, X.; Hamard, P.-J.; Karl, D.L.; Man, N.; Mookhtiar, A.K.; Martinez, C.; Lossos, I.S.; Sun, J.; et al. PRMT5-Mediated Histone Arginine Methylation Antagonizes Transcriptional Repression by Polycomb Complex PRC2. *Nucleic Acids Res* **2020**, *48*, 2956–2968, doi:10.1093/nar/gkaa065.
265. Jin, Y.; Zhou, J.; Xu, F.; Jin, B.; Cui, L.; Wang, Y.; Du, X.; Li, J.; Li, P.; Ren, R.; et al. Targeting Methyltransferase PRMT5 Eliminates Leukemia Stem Cells in Chronic Myelogenous Leukemia. *J Clin Invest* **2016**, *126*, 3961–3980, doi:10.1172/jci85239.
266. Bonday, Z.Q.; Cortez, G.S.; Grogan, M.J.; Antonysamy, S.; Weichert, K.; Bocchinfuso, W.P.; Li, F.; Kennedy, S.; Li, B.; Mader, M.M.; et al. LLY-283, a Potent and Selective Inhibitor of Arginine Methyltransferase 5, PRMT5, with Antitumor Activity. *Acs Med Chem Lett* **2018**, *9*, 612–617, doi:10.1021/acsmedchemlett.8b00014.

267. Alinari, L.; Mahasenani, K.V.; Yan, F.; Karkhanis, V.; Chung, J.-H.; Smith, E.M.; Quinion, C.; Smith, P.L.; Kim, L.; Patton, J.T.; et al. Selective Inhibition of Protein Arginine Methyltransferase 5 Blocks Initiation and Maintenance of B-Cell Transformation. *Blood* **2015**, *125*, 2530–2543, doi:10.1182/blood-2014-12-619783.
268. Pastore, F.; Bhagwat, N.; Pastore, A.; Radzsheuskaya, A.; Karzai, A.; Krishnan, A.; Li, B.; Bowman, R.L.; Xiao, W.; Viny, A.D.; et al. PRMT5 Inhibition Modulates E2F1 Methylation and Gene-Regulatory Networks Leading to Therapeutic Efficacy in JAK2V617F-Mutant MPN. *Cancer Discov* **2020**, *10*, 1742–1757, doi:10.1158/2159-8290.cd-20-0026.
269. Liu, C.; Zou, W.; Nie, D.; Li, S.; Duan, C.; Zhou, M.; Lai, P.; Yang, S.; Ji, S.; Li, Y.; et al. Loss of PRMT7 Reprograms Glycine Metabolism to Selectively Eradicate Leukemia Stem Cells in CML. *Cell Metab* **2022**, *34*, 818–835.e7, doi:10.1016/j.cmet.2022.04.004.
270. Siu, L.L.; Rasco, D.W.; Vinay, S.P.; Romano, P.M.; Menis, J.; Opdam, F.L.; Heinhuis, K.M.; Egger, J.L.; Gorman, S.A.; Parasrampur, R.; et al. 438OMETEOR-1: A Phase I Study of GSK3326595, a First-in-Class Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5) Inhibitor, in Advanced Solid Tumours. *Ann Oncol* **2019**, *30*, v159, doi:10.1093/annonc/mdz244.
271. Scott, H.S.; Antonarakis, S.E.; Lalioti, M.D.; Rossier, C.; Silver, P.A.; Henry, M.F. Identification and Characterization of Two Putative Human Arginine Methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2). *Genomics* **1998**, *48*, 330–340, doi:10.1006/geno.1997.5190.
272. Wang, Y.; Li, C. Evolutionarily Conserved Protein Arginine Methyltransferases in Non-mammalian Animal Systems. *FEBS J.* **2012**, *279*, 932–945, doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08490.x.
273. Carducci, M.; Perfetto, L.; Briganti, L.; Paoluzi, S.; Costa, S.; Zerweck, J.; Schutkowski, M.; Castagnoli, L.; Cesareni, G. The Protein Interaction Network Mediated by Human SH3 Domains. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 4–15, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.012.
274. Cura, V.; Marechal, N.; Troffer-Charlier, N.; Strub, J.; Haren, M.J.; Martin, N.I.; Cianféroni, S.; Bonnefond, L.; Cavarelli, J. Structural Studies of Protein Arginine Methyltransferase 2 Reveal Its Interactions with Potential Substrates and Inhibitors. *FEBS J* **2017**, *284*, 77–96, doi:10.1111/febs.13953.
275. Zhong, J.; Cao, R.; Zu, X.; Hong, T.; Yang, J.; Liu, L.; Xiao, X.; Ding, W.; Zhao, Q.; Liu, J.; et al. Identification and Characterization of Novel Spliced Variants of PRMT2 in Breast Carcinoma. *FEBS J.* **2012**, *279*, 316–335, doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08426.x.
276. Zhong, J.; Cao, R.-X.; Hong, T.; Yang, J.; Zu, X.-Y.; Xiao, X.-H.; Liu, J.-H.; Wen, G.-B. Identification and Expression Analysis of a Novel Transcript of the Human PRMT2 Gene Resulted from Alternative Polyadenylation in Breast Cancer. *Gene* **2011**, *487*, 1–9, doi:10.1016/j.gene.2011.06.022.
277. Cura, V.; Cavarelli, J. Structure, Activity and Function of the PRMT2 Protein Arginine Methyltransferase. *Life* **2021**, *11*, 1263, doi:10.3390/life11111263.
278. Zhong, J.; Chen, Y.-J.; Chen, L.; Shen, Y.-Y.; Zhang, Q.-H.; Yang, J.; Cao, R.-X.; Zu, X.-Y.; Wen, G.-B. PRMT2 β , a C-Terminal Splice Variant of PRMT2, Inhibits the Growth of Breast Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 1303–1311, doi:10.3892/or.2017.5786.

279. Chen, Y.; Dai, X.; Yao, Y.; Wang, J.; Yang, X.; Zhang, Y.; Yang, J.; Cao, R.; Wen, G.; Zhong, J. PRMT2 β ; Suppresses Autophagy and Glycolysis Pathway in Human Breast Cancer MCF-7 Cell Lines. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2019**, *51*, 335–337, doi:10.1093/abbs/gmz006.
280. Qi, C.; Chang, J.; Zhu, Y.; Yeldandi, A.V.; Rao, S.M.; Zhu, Y.-J. Identification of Protein Arginine Methyltransferase 2 as a Coactivator for Estrogen Receptor A*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 28624–28630, doi:10.1074/jbc.m201053200.
281. Shen, Y.; Zhong, J.; Liu, J.; Liu, K.; Zhao, J.; Xu, T.; Zeng, T.; Li, Z.; Chen, Y.; Ding, W.; et al. Protein Arginine N-Methyltransferase 2 Reverses Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Cells through Suppression of ER-A36. *Oncol. Rep.* **2018**, *39*, 2604–2612, doi:10.3892/or.2018.6350.
282. Zhong, J.; Cao, R.-X.; Liu, J.-H.; Liu, Y.-B.; Wang, J.; Liu, L.-P.; Chen, Y.-J.; Yang, J.; Zhang, Q.-H.; Wu, Y.; et al. Nuclear Loss of Protein Arginine N-Methyltransferase 2 in Breast Carcinoma Is Associated with Tumor Grade and Overexpression of Cyclin D1 Protein. *Oncogene* **2014**, *33*, 5546–5558, doi:10.1038/onc.2013.500.
283. Meyer, R.; Wolf, S.S.; Obendorf, M. PRMT2, a Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family, Is a Coactivator of the Androgen Receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *107*, 1–14, doi:10.1016/j.jsbmb.2007.05.006.
284. Yoshimoto, T.; Boehm, M.; Olive, M.; Crook, M.F.; San, H.; Langenickel, T.; Nabel, E.G. The Arginine Methyltransferase PRMT2 Binds RB and Regulates E2F Function. *Exp Cell Res* **2006**, *312*, 2040–2053, doi:10.1016/j.yexcr.2006.03.001.
285. Li, Y.; Zhou, S.; Chen, S.; Zhong, J.; Wen, G. PRMT2 Inhibits the Formation of Foam Cell Induced by Ox-LDL in RAW 264.7 Macrophage Involving ABCA1 Mediated Cholesterol Efflux. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *524*, 77–82, doi:10.1016/j.bbrc.2020.01.040.
286. Hussein, M.A.; Shrestha, E.; Ouimet, M.; Barrett, T.J.; Leone, S.; Moore, K.J.; Héroult, Y.; Fisher, E.A.; Garabedian, M.J. LXR-Mediated ABCA1 Expression and Function Are Modulated by High Glucose and PRMT2. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135218, doi:10.1371/journal.pone.0135218.
287. Liu, L.; Lin, B.; Yin, S.; Ball, L.E.; Delaney, J.R.; Long, D.T.; Gan, W. Arginine Methylation of BRD4 by PRMT2/4 Governs Transcription and DNA Repair. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eadd8928, doi:10.1126/sciadv.add8928.
288. Li, Z.; Chen, C.; Yong, H.; Jiang, L.; Wang, P.; Meng, S.; Chu, S.; Li, Z.; Guo, Q.; Zheng, J.; et al. PRMT2 Promotes RCC Tumorigenesis and Metastasis via Enhancing WNT5A Transcriptional Expression. *Cell Death Dis.* **2023**, *14*, 322, doi:10.1038/s41419-023-05837-6.
289. Wang, J.; Hua, H.; Wang, F.; Yang, S.; Zhou, Q.; Wu, X.; Feng, D.; Peng, H. Arginine Methylation by PRMT2 Promotes IFN- β Production through TLR4/IRF3 Signaling Pathway. *Mol Immunol* **2021**, *139*, 202–210, doi:10.1016/j.molimm.2021.08.014.
290. Iwasaki, H.; Kovacic, J.C.; Olive, M.; Beers, J.K.; Yoshimoto, T.; Crook, M.F.; Tonelli, L.H.; Nabel, E.G. Disruption of Protein Arginine N-Methyltransferase 2 Regulates Leptin Signaling and Produces Leanness In Vivo Through Loss of STAT3 Methylation. *Circ Res* **2010**, *107*, 992–1001, doi:10.1161/circresaha.110.225326.

291. Hou, W.; Nemitz, S.; Schopper, S.; Nielsen, M.L.; Kessels, M.M.; Qualmann, B. Arginine Methylation by PRMT2 Controls the Functions of the Actin Nucleator Cobl. *Dev. Cell* **2018**, *45*, 262–275.e8, doi:10.1016/j.devcel.2018.03.007.
292. Yang, Y.; Liu, Y.; He, X.; Yang, F.; Han, S.; Qin, A.; Wu, G.; Liu, M.; Li, Z.; Wang, J.; et al. ING4 Alleviated Lipopolysaccharide-induced Inflammation by Regulating the NF- κ B Pathway via a Direct Interaction with SIRT1. *Immunol. Cell Biol.* **2020**, *98*, 127–137, doi:10.1111/imcb.12308.
293. Shatnawi, A.; Rabe, D.I.A.; Frigo, D.E. Roles of the Tumor Suppressor Inhibitor of Growth Family Member 4 (ING4) in Cancer. *Adv. Cancer Res.* **2021**, *152*, 225–262, doi:10.1016/bs.acr.2021.05.004.
294. Qian, F.; Hu, Q.; Tian, Y.; Wu, J.; Li, D.; Tao, M.; Qin, L.; Shen, B.; Xie, Y. ING4 Suppresses Hepatocellular Carcinoma via a NF-KB/MiR-155/FOXO3a Signaling Axis. *Int. J. Biol. Sci.* **2019**, *15*, 369–385, doi:10.7150/ijbs.28422.
295. Tyner, J.W.; Tognon, C.E.; Bottomly, D.; Wilmot, B.; Kurtz, S.E.; Savage, S.L.; Long, N.; Schultz, A.R.; Traer, E.; Abel, M.; et al. Functional Genomic Landscape of Acute Myeloid Leukaemia. *Nature* **2018**, *562*, 526–531, doi:10.1038/s41586-018-0623-z.
296. Gianni, T.; Leoni, V.; Sanapo, M.; Parenti, F.; Bressanin, D.; Barboni, C.; Zaghini, A.; Campadelli-Fiume, G.; Vannini, A. Genotype of Immunologically Hot or Cold Tumors Determines the Antitumor Immune Response and Efficacy by Fully Virulent Retargeted OHSV. *Viruses* **2021**, *13*, 1747, doi:10.3390/v13091747.
297. Galon, J.; Bruni, D. Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. *Immunity* **2020**, *52*, 55–81, doi:10.1016/j.immuni.2019.12.018.
298. Barreyro, L.; Chlon, T.M.; Starczynowski, D.T. Chronic Immune Response Dysregulation in MDS Pathogenesis. *Blood* **2018**, *132*, 1553–1560, doi:10.1182/blood-2018-03-784116.
299. Lasry, A.; Nadorp, B.; Fornerod, M.; Nicolet, D.; Wu, H.; Walker, C.J.; Sun, Z.; Witkowski, M.T.; Tikhonova, A.N.; Guillaumot-Ruano, M.; et al. An Inflammatory State Remodels the Immune Microenvironment and Improves Risk Stratification in Acute Myeloid Leukemia. *Nat. Cancer* **2023**, *4*, 27–42, doi:10.1038/s43018-022-00480-0.
300. Bertoli, S.; Paubelle, E.; Bérard, E.; Saland, E.; Thomas, X.; Tavitian, S.; Larcher, M.; Vergez, F.; Delabesse, E.; Sarry, A.; et al. Ferritin Heavy/Light Chain (FTH1/FTL) Expression, Serum Ferritin Levels, and Their Functional as Well as Prognostic Roles in Acute Myeloid Leukemia. *Eur. J. Haematol.* **2019**, *102*, 131–142, doi:10.1111/ejh.13183.
301. Etten, R.A.V. Aberrant Cytokine Signaling in Leukemia. *Oncogene* **2007**, *26*, 6738–6749, doi:10.1038/sj.onc.1210758.
302. Carey, A.; Edwards, D.K.; Eide, C.A.; Newell, L.; Traer, E.; Medeiros, B.C.; Pollyea, D.A.; Deininger, M.W.; Collins, R.H.; Tyner, J.W.; et al. Identification of Interleukin-1 by Functional Screening as a Key Mediator of Cellular Expansion and Disease Progression in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 3204–3218, doi:10.1016/j.celrep.2017.03.018.
303. Montfort, A.; Colacios, C.; Levade, T.; Andrieu-Abadie, N.; Meyer, N.; Ségui, B. The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1818, doi:10.3389/fimmu.2019.01818.

304. Tsimberidou, A.M.; Estey, E.; Wen, S.; Pierce, S.; Kantarjian, H.; Albitar, M.; Kurzrock, R. The Prognostic Significance of Cytokine Levels in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia and High-risk Myelodysplastic Syndromes. *Cancer* **2008**, *113*, 1605–1613, doi:10.1002/cncr.23785.
305. Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Csh Perspect Biol* **2014**, *6*, a016295, doi:10.1101/cshperspect.a016295.
306. Hodge, D.R.; Hurt, E.M.; Farrar, W.L. The Role of IL-6 and STAT3 in Inflammation and Cancer. *Eur J Cancer* **2005**, *41*, 2502–2512, doi:10.1016/j.ejca.2005.08.016.
307. Mauer, J.; Denson, J.L.; Brüning, J.C. Versatile Functions for IL-6 in Metabolism and Cancer. *Trends Immunol* **2015**, *36*, 92–101, doi:10.1016/j.it.2014.12.008.
308. Sanchez-Correa, B.; Bergua, J.M.; Campos, C.; Gayoso, I.; Arcos, M.J.; Bañas, H.; Morgado, S.; Casado, J.G.; Solana, R.; Tarazona, R. Cytokine Profiles in Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis: Survival Is Inversely Correlated with IL-6 and Directly Correlated with IL-10 Levels. *Cytokine* **2013**, *61*, 885–891, doi:10.1016/j.cyto.2012.12.023.
309. Stevens, A.M.; Miller, J.M.; Munoz, J.O.; Gaikwad, A.S.; Redell, M.S. Interleukin-6 Levels Predict Event-Free Survival in Pediatric AML and Suggest a Mechanism of Chemotherapy Resistance. *Blood Adv* **2017**, *1*, 1387–1397, doi:10.1182/bloodadvances.2017007856.
310. Saadi, M.I.; Ramzi, M.; Hosseinzadeh, M.; Ebrahimi, N.; Owjifard, M.; Abdolyousefi, E.N.; Hesami, Z.; Valibeigi, B.; Zareei, N.; Tavasolian, F.; et al. Expression Levels of IL-6 and IL-18 in Acute Myeloid Leukemia and Its Relation with Response to Therapy and Acute GvHD After Bone Marrow Transplantation. *Indian J Surg Oncol* **2021**, *12*, 465–471, doi:10.1007/s13193-021-01358-w.
311. Peterlin, P.; Gaschet, J.; Guillaume, T.; Garnier, A.; Eveillard, M.; Bourgeois, A.L.; Cherel, M.; Debord, C.; Bris, Y.L.; Theisen, O.; et al. A New Cytokine-based Dynamic Stratification during Induction Is Highly Predictive of Survivals in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Med-us* **2021**, *10*, 642–648, doi:10.1002/cam4.3648.
312. Hirano, T. Interleukin 6 in Inflammation, Autoimmunity and Cancer. *Int. Immunol.* **2020**, *33*, dxaa078-, doi:10.1093/intimm/dxaa078.
313. Hou, D.; Wang, B.; You, R.; Wang, X.; Liu, J.; Zhan, W.; Chen, P.; Qin, T.; Zhang, X.; Huang, H. Stromal Cells Promote Chemoresistance of Acute Myeloid Leukemia Cells via Activation of the IL-6/STAT3/OXPPOS Axis. *Ann Transl Medicine* **2020**, *8*, 1346–1346, doi:10.21037/atm-20-3191.
314. Bertoli, S.; Picard, M.; Bérard, E.; Griessinger, E.; Larrue, C.; Mouchel, P.L.; Vergez, F.; Tavitian, S.; Yon, E.; Ruiz, J.; et al. Dexamethasone in Hyperleukocytic Acute Myeloid Leukemia. *Haematologica* **2018**, *103*, 988–998, doi:10.3324/haematol.2017.184267.
315. Récher, C. Clinical Implications of Inflammation in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers Oncol* **2021**, *11*, 623952, doi:10.3389/fonc.2021.623952.
316. Ganesh, L.; Yoshimoto, T.; Moorthy, N.C.; Akahata, W.; Boehm, M.; Nabel, E.G.; Nabel, G.J. Protein Methyltransferase 2 Inhibits NF-KB Function and Promotes Apoptosis. *Mol Cell Biol* **2006**, *26*, 3864–3874, doi:10.1128/mcb.26.10.3864-3874.2006.

317. Dalloneau, E.; Pereira, P.L.; Brault, V.; Nabel, E.G.; Héroult, Y. Prmt2 Regulates the Lipopolysaccharide-Induced Responses in Lungs and Macrophages. *J Immunol* **2011**, *187*, 4826–4834, doi:10.4049/jimmunol.1101087.
318. Vhuyian, M.I.; Pak, M.L.; Park, M.A.; Thomas, D.; Lakowski, T.M.; Chalfant, C.E.; Frankel, A. PRMT2 Interacts with Splicing Factors and Regulates the Alternative Splicing of BCL-X. *J Biochem* **2017**, *162*, mvw102, doi:10.1093/jb/mvw102.
319. Vurusaner, B.; Thevkar-Nages, P.; Kaur, R.; Giannarelli, C.; Garabedian, M.J.; Fisher, E.A. Loss of PRMT2 in Myeloid Cells in Normoglycemic Mice Phenocopies Impaired Regression of Atherosclerosis in Diabetic Mice. *Sci Rep-uk* **2022**, *12*, 12031, doi:10.1038/s41598-022-15349-6.
320. Zeng, S.; Luo, J.; Quan, H.; Xiao, Y.; Liu, Y.; Lu, H.; Qin, X. Protein Arginine Methyltransferase 2 Inhibits Angiotensin II-Induced Proliferation and Inflammation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Biomed Res Int* **2018**, *2018*, 1547452, doi:10.1155/2018/1547452.
321. Reintjes, A.; Fuchs, J.E.; Kremser, L.; Lindner, H.H.; Liedl, K.R.; Huber, L.A.; Valovka, T. Asymmetric Arginine Dimethylation of RelA Provides a Repressive Mark to Modulate TNF α /NF-KB Response. *Proc National Acad Sci* **2016**, *113*, 4326–4331, doi:10.1073/pnas.1522372113.
322. Harris, D.P.; Bandyopadhyay, S.; Maxwell, T.J.; Willard, B.; DiCorleto, P.E. Tumor Necrosis Factor (TNF)- α Induction of CXCL10 in Endothelial Cells Requires Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5)-Mediated Nuclear Factor (NF)-KB P65 Methylation*. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 15328–15339, doi:10.1074/jbc.m114.547349.
323. Miao, F.; Li, S.; Chavez, V.; Lanting, L.; Natarajan, R. Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase-1 Enhances Nuclear Factor-KB-Mediated Gene Transcription through Methylation of Histone H3 at Arginine 17. *Mol Endocrinol* **2006**, *20*, 1562–1573, doi:10.1210/me.2005-0365.
324. Lorenzo, A.D.; Yang, Y.; Macaluso, M.; Bedford, M.T. A Gain-of-Function Mouse Model Identifies PRMT6 as a NF-KB Coactivator. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, 8297–8309, doi:10.1093/nar/gku530.
325. Yuan, B.; Zhou, X.; Suzuki, K.; Ramos-Mandujano, G.; Wang, M.; Tehseen, M.; Cortés-Medina, L.V.; Moresco, J.J.; Dunn, S.; Hernandez-Benitez, R.; et al. Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Forms Nuclear Condensates and Regulates Alternative Splicing. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 3646, doi:10.1038/s41467-022-31220-8.
326. Rivers, E.; Thrasher, A.J. Wiskott-Aldrich Syndrome Protein: Emerging Mechanisms in Immunity. *Eur. J. Immunol.* **2017**, *47*, 1857–1866, doi:10.1002/eji.201646715.
327. Senthil, S.; Thrasher, A.J.; Gilmour, K.C.; Wright, T.; Wynn, R.F. Wiskott Aldrich Syndrome-2 Caused by Novel Wiskott Aldrich Syndrome Protein-Interacting Protein (WIP) Deficiency Is Associated with Juvenile Myelomonocytic Leukaemia — a Case Report. *J. Clin. Immunol.* **2023**, *43*, 82–84, doi:10.1007/s10875-022-01367-6.
328. Li, X.; Lopez-Guisa, J.M.; Ninan, N.; Weiner, E.J.; Rauscher, F.J.; Marmorstein, R. Overexpression, Purification, Characterization, and Crystallization of the BTB/POZ Domain from the PLZF Oncoprotein*. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 27324–27329, doi:10.1074/jbc.272.43.27324.

329. Chauchereau, A.; Mathieu, M.; Saintignon, J. de; Ferreira, R.; Pritchard, L.L.; Mishal, Z.; Dejean, A.; Harel-Bellan, A. HDAC4 Mediates Transcriptional Repression by the Acute Promyelocytic Leukaemia-Associated Protein PLZF. *Oncogene* **2004**, *23*, 8777–8784, doi:10.1038/sj.onc.1208128.
330. Guidez, F.; Howell, L.; Isalan, M.; Cebrat, M.; Alani, R.M.; Ivins, S.; Hormaeche, I.; McConnell, M.J.; Pierce, S.; Cole, P.A.; et al. Histone Acetyltransferase Activity of P300 Is Required for Transcriptional Repression by the Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 5552–5566, doi:10.1128/mcb.25.13.5552-5566.2005.
331. Klibi, J.; Joseph, C.; Delord, M.; Teissandier, A.; Lucas, B.; Chomienne, C.; Toubert, A.; Bourc'his, D.; Guidez, F.; Benlagha, K. PLZF Acetylation Levels Regulate NKT Cell Differentiation. *J. Immunol.* **2021**, *207*, 809–823, doi:10.4049/jimmunol.2001444.
332. McConnell, M.J.; Durand, L.; Langley, E.; Coste-Sarguet, L.; Zelent, A.; Chomienne, C.; Kouzarides, T.; Licht, J.D.; Guidez, F. Post Transcriptional Control of the Epigenetic Stem Cell Regulator PLZF by Sirtuin and HDAC Deacetylases. *Epigenetics Chromatin* **2015**, *8*, 38, doi:10.1186/s13072-015-0030-8.
333. Guidez, F.; Parks, S.; Wong, H.; Jovanovic, J.V.; Mays, A.; Gilkes, A.F.; Mills, K.I.; Guillemin, M.-C.; Hobbs, R.M.; Pandolfi, P.P.; et al. RAR α -PLZF Overcomes PLZF-Mediated Repression of CRABPI, Contributing to Retinoid Resistance in t(11;17) Acute Promyelocytic Leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 18694–18699, doi:10.1073/pnas.0704433104.
334. Ramirez, R.N.; El-Ali, N.C.; Mager, M.A.; Wyman, D.; Conesa, A.; Mortazavi, A. Dynamic Gene Regulatory Networks of Human Myeloid Differentiation. *Cell Syst* **2017**, *4*, 416-429.e3, doi:10.1016/j.cels.2017.03.005.

Étude du rôle de PRMT2 dans le développement leucémique et l'inflammation

Un lien direct entre l'inflammation chronique et le développement de la leucémie aiguë myéloblastique (LAM) a été mis en évidence ces dernières années, démontrant une interconnexion entre un phénotype inflammatoire marqué et une myéloprolifération aberrante chez les patients atteints d'une LAM. Un traitement utilisant des molécules anti-inflammatoires en combinaison avec les thérapeutiques classiques chez des patients présentant une signature inflammatoire accentuée a entraîné une augmentation significative de la survie globale. Les protéines arginine méthyltransférases (PRMT), des facteurs épigénétiques connus pour agir sur l'expression des gènes *via* la méthylation des queues d'histones, sont également capables de méthyler d'autres protéines, cytoplasmiques comme nucléaires. Il a déjà été rapporté que l'inhibition des PRMT1, -4 et -5 avaient des effets anti-proliférants dans des modèles de LAM. Le projet de thèse a consisté à étudier le rôle d'un autre membre de cette famille, PRMT2, dans le développement des LAM par le biais de ses fonctions régulatrices dans les voies inflammatoires. Nous nous sommes focalisés sur le rôle de PRMT2 dans la réponse inflammatoire après avoir déterminé, à partir d'une cohorte de LAM, que les patients ayant une faible expression de *PRMT2* présentaient un enrichissement génique des voies pro-inflammatoires par rapport aux patients avec une forte expression de *PRMT2*. Nous avons donc émis l'hypothèse que PRMT2 pouvait être un régulateur clé des processus inflammatoires dans les LAM. Afin d'étayer notre hypothèse, nous avons utilisé un modèle de souris invalidées pour *Prmt2* (*Prmt2*^{-/-}) et une lignée cellulaire humaine de LAM déplétée pour *PRMT2* (*PRMT2*^{KO}). Bien que nous n'ayons observé aucune différence au niveau de la distribution des progéniteurs de la moelle osseuse ou des populations de cellules matures des souris *Prmt2*^{-/-} par rapport au contrôle, nous avons mis en évidence que les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris *Prmt2*^{-/-} étaient plus sensibles à une stimulation par du LPS et exprimaient des niveaux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires, ce qui confirme nos présomptions issues de nos analyses obtenues sur la cohorte LAM quant au rôle de PRMT2 dans la régulation négative des processus inflammatoires. Les cellules de LAM humaines *PRMT2*^{KO} affichent une signature pro-inflammatoire amplifiée résultant d'une suractivation de STAT3, causée par une activation accrue de la voie de signalisation NF-κB, conduisant à une surproduction d'IL6. L'ensemble de ces résultats démontre que PRMT2 est un régulateur clé du contrôle de l'inflammation dans les LAM.

Mots-clés : PRMT2 ; Leucémie aiguë myéloblastique ; Inflammation ; NF-κB

Role of PRMT2 in leukemogenesis and inflammation

A direct link between chronic inflammation and the development of acute myeloid leukemia (AML) has been highlighted in recent years, demonstrating an interconnection between a marked inflammatory phenotype and aberrant myeloproliferation in AML patients. Treatment of AML patients exhibiting high inflammatory signatures with anti-inflammatory molecules associated with classical chemotherapy has led to a significant increase in overall survival. Protein arginine methyltransferases (PRMTs), which are epigenetic factors known to regulate gene expression through histone tail methylation, are also able to catalyze methylation of other proteins, both cytoplasmic and nuclear. Inhibition of PRMT1, -4, and -5 has been reported to have anti-proliferative effects in various AML models. In this study, we investigated the role of another member of this family, called PRMT2, in AML development through its regulatory roles in inflammatory pathways after having determined from an AML cohort, that patients with low *PRMT2* expression showed an enrichment of pro-inflammatory pathways compared to patients harboring high *PRMT2* expression. We thus hypothesized that PRMT2 might be a key regulator of inflammatory processes in AML. To support this hypothesis, we used a knockout (KO) mouse model and a human AML PRMT2-depleted cell line. Although we did not observe any differences in bone marrow progenitors and mature cell populations of KO mice compared to control, we highlighted that bone marrow-derived macrophages from KO mice were more sensitive to LPS stimulation and expressed higher levels of pro-inflammatory cytokines, confirming our previous findings in AML patients on the role of PRMT2 in the downregulation of inflammatory processes. Human AML cells lacking PRMT2 display an amplified pro-inflammatory gene signature due to STAT3 overactivation, which is caused by increased activation of the NF-κB signaling pathway, leading to IL6 overproduction. Taken together, these results demonstrate that PRMT2 is a key regulator of inflammation control in AML.

Keywords: PRMT2; Acute myeloid leukemia; Inflammation; NF-κB