



**UNIVERSITÉ DE
STRASBOURG**



ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

IGBMC - CNRS UMR 7104 - Inserm U964

THÈSE présentée par :

Justine MAILLIOT

soutenue le : **19 avril 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects cellulaires et moléculaires du Vivant**

**Étude structurale de l'histone-
méthyltransférase « CARM1 » et de ses
complexes biologiquement significatifs
Des structures 3D vers la conception rationnelle
de composés à action pharmacologique**

THÈSE dirigée par :
Pr. CAVARELLI Jean

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Dr. BOURNE Yves
Dr. MOUREY Lionel

Directeur de recherche, AFMB (Marseille)
Directeur de recherche, IPBS (Toulouse)

AUTRES MEMBRES DU JURY :
Pr. CARBON Philippe

Professeur, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier Jean Cavarelli, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour m'avoir encadrée pendant plus de 4 ans, d'abord en stage de Master, puis tout au long de ma thèse. Merci pour votre générosité, pour votre patience, et merci de m'avoir fait découvrir la cristallographie, dans un premier temps à la fac pour la théorie, puis dans votre équipe pour la pratique.

Je souhaiterais ensuite remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse : Yves Bourne, Directeur du laboratoire « Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques » à Marseille ; Lionel Mourey, responsable du département de « Biologie Structurale et de Biophysique » de l'Institut de « Pharmacologie et de Biologie Structurale » à Toulouse ; Philippe Carbon, Professeur de l'Université de Strasbourg.

Merci à l'école doctorale des « Sciences de la Vie et de la Santé » de m'avoir attribué un financement ministériel pour les 3 premières années de ma thèse, et merci à la fondation ARC pour m'avoir permis de prolonger ma thèse de 6 mois pour que je puisse terminer mes travaux.

Merci à l'IGBMC et aux différents services communs pour apporter le cadre et les ressources idéaux pour des travaux de recherche.

Merci à tous nos collaborateurs : Alain Wagner, Samira Ajebbar et Marion Recher pour toute la chimie ; Yves Mely, Hugues de Rocquigny, Guy Duportail et Ludovic Richert pour les expériences de fluorescence ; Sarah Sanglier, Stéphanie Petiot, Jean-Michel Saliou et Johann Stojko pour les analyses en spectrométrie de masse.

Un chaleureux merci à tous les membres de l'équipe. Vincent, tu m'as appris toute la pratique de la cristallographie, de la cristallogenèse au traitement des données, tu es un expert dans ce domaine et ce fut un grand plaisir de partager tous ces runs synchrotron avec toi. Nathalie, merci pour tous les conseils que tu as pu m'apporter à la paillasse pendant ces années, et pour ton naturel au quotidien. Pierrot, à mon arrivée dans l'équipe, c'était toi l'étudiant en thèse, et c'est toi qui m'a fait faire mes premières manip'. Merci pour ta bonne humeur perpétuelle et surtout merci de m'avoir transmis ta passion pour la paillasse. Samira (car pour moi tu as fait partie de l'équipe), tu es très volontaire et enthousiaste et ça a été un réel plaisir de travailler avec toi pendant toutes ces années. Un grand merci à Magdalena, Marie-Annick, Luc et Quentin qui ont aussi participé (ou participent encore) à l'aventure « PRMT ». Et merci aux autres aussi : Arnaud, Christophe, Émeline, Jean-Marie, Marie-Laure, Martin, Morgane, Stéphanie, Thibaut, Yann. Ça a été un réel plaisir de tous vous côtoyer au

quotidien, de papoter, manger et rire avec vous ! Grâce à vous tous j'ai apprécié chaque journée passée au labo'.

Merci à tous les gens du département de Biologie Structurale Intégrative et du CEBGS que j'ai côtoyé au quotidien : Pierre, Isabelle, Al', Morgan, Amélie, Benoît, Florence, Anne, Laure, Martino, Ben', Heena, Sankar, Srividhya, Kareem, Yann, Nada, Alex', Florence, Anna, Carole, Maria, Judit, Tiphaine, Massimo, Virginie, Laura, Wassim, Amandine, Nico', Benoît (M. Maillot sans « i »), Aurélie, Julie, Valérie, Claire, Grigory, Nico', Sergey, Iskander, Simone et tous ceux que je n'ai pas cité.

Merci à mes « camarades » de Licence et de Master : Céd', Lum'Lum', Ben', Ismail, Christelle, Val', Guillaume, Tristan, Morgane, Mireille, Philippe, Antoine, nous formions une promo' de choc et ça n'a été que du bonheur de partager ces quelques années avec vous sur les bancs de la fac.

Merci aux citrons et associés : Jules, Élise et Flo', Jérém' et Val', Ben' et Lydie (et Jeanne !), Sam', Simon, Jean-No', Jackson, P-A, Félix, Noémie, Cha', Marilyn et Mat' (et Maria !), Gilles, c'est toujours un vrai plaisir de vous retrouver pour faire bouger l'univers musical strasbourgeois (ou plus).

Un grand merci à mes belles-sœurs Louise et Lucille, à Laura, à papa Jean et à Sylvie, ainsi qu'à toute la famille Hassenboehler/Martin qui ont fait de moi une alsacienne par adoption.

Une pensée toute particulière aux « Supergirls » : Sarah, Célia, Manue, Marie, Marion, Pauline, c'est difficile d'imaginer la vie sans vous, je suis toujours impatiente d'avoir de vos nouvelles, merci d'être toujours là après toutes ces années !!!

Je ne pourrai jamais assez remercier ma famille. Papa, maman, LiLie, MonMon, vous m'avez toujours encouragée et c'est grâce à vous que je suis ici aujourd'hui. Merci pour tout le soutien que m'avez apporté. Je suis la petite dernière et je suis bien consciente de la chance que j'ai eu de m'épanouir à vos côtés. Sans oublier Erwan et Bastien que je remercie pour la bouffée d'air et d'insouciance qu'ils m'apportent à chaque fois que je les vois.

Je tenais à finir en remerciant une nouvelle fois Pierrot. En plus de me transmettre ta passion pour la paillasse, tu m'as aussi transmis ta passion pour la musique et pour l'art en général. Chaque jour je découvre quelque chose de nouveau à tes côtés. Merci pour tout ce que tu peux m'apporter.

Pour Nicolas et Anne

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS	11
PRÉAMBULE	15
CHAPITRE I - INTRODUCTION	21
A. L'ÉPIGÉNÉTIQUE : « AU-DELÀ DE LA GÉNÉTIQUE »	21
B. CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS ÉTATS DE LA CHROMATINE	23
1. MÉTHYLATION DE L'ADN	23
2. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES	24
C. LA FAMILLE DES PRMT : « PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASES »	25
1. GÉNÉRALITÉS SUR LES PRMT	26
2. PRMT DE TYPE I	29
a. PRMT1	29
b. PRMT2	30
c. PRMT3	30
d. CARM1 : « Coactivator-Associated aRginine Methyltransferase 1 »	31
❖ <i>Coactivateur secondaire des récepteurs nucléaires hormonaux</i>	31
❖ <i>Méthylation de substrats divers</i>	32
e. PRMT6	34
f. PRMT8	35
g. PRMT10	35
3. PRMT DE TYPE II, III ET IV	35
a. PRMT5	35
b. PRMT7	37
c. Rmt2	38
4. PRMT NON-CLASSÉES	39
a. PRMT9	39
b. FBXO11	39
c. FBXO10	40
5. STRUCTURES DES PRMT	40
a. Structure de la protéine CARM1	40
b. Comparaison avec d'autres structures de PRMT connues	44
c. Comparaison avec d'autres structures de méthyltransférases connues	46
6. LES PRMT : DES CIBLES THÉRAPEUTIQUES POTENTIELLES	48
a. Implication des PRMT dans certains cancers	48

b. Inhibiteurs décrits des PRMT	49
D. CONCLUSION.....	54
CHAPITRE II - MATÉRIEL ET MÉTHODES	57
A. EXPRESSIONS ET PURIFICATIONS PROTÉIQUES.....	57
1. EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTÉINE CARM1 DE SOURIS	57
a. Clonage et expression en cellules d'insecte (système baculovirus)	57
b. Purification de la protéine exprimée	57
❖ Chromatographie d'affinité au glutathion	58
❖ Chromatographie échangeuse d'anions.....	58
❖ Chromatographie d'exclusion moléculaire	58
2. EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTÉINE CARM1 DE MOUSTIQUE	59
a. Expression dans E. coli.....	60
b. Purification de la protéine exprimée	60
3. EXPRESSION ET PURIFICATION DU TÉTRAMÈRE D'HISTONES (H3H4) ₂	61
4. EXPRESSION ET PURIFICATION D'UN FRAGMENT DE LA PROTÉINE PABP1	62
B. CARACTÉRISATION BIOPHYSIQUE.....	62
1. THERMOFLUOR®	62
2. MICROCALORIMÉTRIE (ITC)	63
3. ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE	66
4. SPECTROSCOPIE DE CORRÉLATION DE FLUORESCENCE (FCS)	68
C. CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE.....	71
1. CARACTÉRISATION DE « L'EFFICACITÉ » D'UNE ENZYME : DÉTERMINATION DE K _M ET DE K _{CAT}	71
2. CARACTÉRISATION DU POUVOIR INHIBITEUR D'UN LIGAND : DÉTERMINATION D'IC ₅₀	73
D. CARACTÉRISATION STRUCTURALE PAR DIFFRACTION DE CRISTAUX AU RAYONS X	73
CHAPITRE III - ÉTUDES STRUCTURALES DE COMPLEXES CARM1-ANALOGUES DE	
SUBSTRATS	79
A. STRATÉGIE	79
B. ANALOGUES DU SAM	82
1. EXPLORATION DE LA POCHÉ DE FIXATION DU GROUPEMENT SULFONIUM.....	83
2. EXPLORATION DE LA POCHÉ DE FIXATION DU GROUPEMENT GUANIDINIUM DE L'ARGININE SUBSTRAT	85
3. CARACTÉRISATION BIOPHYSIQUE	88
a. Thermofluor®	89
b. Microcalorimétrie (ITC).....	92

4. CARACTÉRISATION STRUCTURALE	94
C. MOLÉCULES MIMANT L'INTERMÉDIAIRE DE RÉACTION SAM/ARGININE.....	98
1. CARACTÉRISATION DE L'AFFINITÉ ET DU POUVOIR INHIBITEUR.....	98
2. CARACTÉRISATION STRUCTURALE	100
D. MOLÉCULES MIMANT L'INTERMÉDIAIRE DE RÉACTION SAM/PEPTIDE.....	103
1. DÉRIVÉS ÉLECTROPHILES DU SAM	103
a. Caractérisation de l'affinité et du pouvoir inhibiteur.....	103
b. Caractérisation structurale.....	106
2. DÉRIVÉS DU SAM À FONCTION AZOTURE.....	111
a. Caractérisation de l'affinité et du pouvoir inhibiteur.....	112
b. Caractérisation structurale.....	115
 CHAPITRE IV - ÉTUDE FONCTIONNELLE DE LA PROTÉINE CARM1 : COMPRENDRE LES MÉCANISMES DE RECONNAISSANCE ET DE MÉTHYLATION DU SUBSTRAT	 121
A. CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION ENTRE CARM1 ET DIFFÉRENTS PEPTIDES SUBSTRATS	121
1. CARACTÉRISATION PAR ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE	121
2. CARACTÉRISATION PAR SPECTROSCOPIE DE CORRÉLATION DE FLUORESCENCE.....	124
B. ÉTUDES DE DIFFÉRENTES CONSTRUCTIONS DE CARM1 ET DE MUTANTS PONCTUELS.....	128
1. CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION AVEC LE PEPTIDE H3 1-41 K18AC	128
2. TESTS D'ACTIVITÉ.....	132
3. CARACTÉRISATION STRUCTURALE	137
 CHAPITRE V - MODÈLE MÉCANISTIQUE DE LA RECONNAISSANCE ET DE LA MÉTHYLATION PAR CARM1	 141
A. ORDRE DE LA FIXATION ET DE LA LIBÉRATION DU COFACTEUR ET DU SUBSTRAT	141
B. MÉCANISME CATALYTIQUE DE LA RÉACTION DE MÉTHYLATION.....	142
 CHAPITRE VI - OUVERTURE AUX AUTRES PRMT	 149
A. PRMT5	149
1. CARACTÉRISATION STRUCTURALE DE LA PROTÉINE PRMT5 D'ARABIDOPSIS THALIANA.....	149
a. Matériel et méthodes.....	149
❖ Clonage, expression et purification.....	149
❖ Cristallisation.....	150
❖ Collecte des données de diffraction aux rayons X et résolution de la structure	150
b. Structure de la protéine PRMT5 d'Arabidopsis thaliana à moyenne résolution.....	151
2. CARACTÉRISATION STRUCTURALE DU COMPLEXE PRMT5/MEP50 HUMAIN	153

a. Matériel et méthodes.....	153
❖ Clonage, expression et purification.....	153
❖ Cristallisation.....	154
❖ Collecte des données de diffraction aux rayons X et résolution de la structure.....	154
b. Structure du complexe PRMT5/MEP50 humain à moyenne résolution.....	155
B. ÉTUDE STRUCTURALE DE LA PROTÉINE PRMT6	159
1. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	159
a. Clonage, expression et purification.....	159
b. Cristallisation.....	159
c. Collecte des données de diffraction aux rayons X et résolution de la structure.....	160
2. STRUCTURE DE LA PROTÉINE PRMT6 DE SOURIS À TRÈS HAUTE RÉOLUTION	160
CHAPITRE VII - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	167
ANNEXES.....	175
BIBLIOGRAPHIE.....	201
LISTE DES FIGURES.....	211
LISTE DES TABLEAUX.....	213
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES	215

ABRÉVIATIONS

Acétyl-CoA ACÉTYL-COenzyme A
ACTR ACTivator of Thyroid and Retinoic acid receptor
AD Activation Domain
ADD ATRX-DNMT3-DNMT3L related domain
ADN Acide DésoxyriboNucléique
ADP Adénosine DiPhosphate
AF-1 Activation Function 1
AF-2 Activation Function 2
AIB1 Amplified In Breast cancer 1
AMP Adénosine MonoPhosphate
AR Androgen Receptor
ARN Acide RiboNucléique
ARNm ARN Messenger
ARNpi ARN « PIWI-Interacting »
ARNsn ARN « Small Nuclear »
ATP Adénosine TriPhosphate
BAF57 Brg1 and hBrg-Associated Factor 57
bFGF Basic Fibroblast Growth Factor
bHLH-PAS Basic Helix Loop Helix-Per Arnt Sims
BRCA1 BRCA1 C Terminus domain
BRCT BRCA1 C Terminus domain
CA150 CoActivator 150 kDa
CARM1 Coactivator-Associated aRginine Methyltransferase 1
CBP CREB-Binding Protein
CoCoA COiled-coil COActivator
COPR5 COoperator of PRMT5
CREB CRE Binding protein
DBD DNA Binding Domain
DIM5 Decrease In DNA Methylation protein 5
DNMT DNA MethylTransferase
Dot1 Disruptor Of Telomeric silencing protein 1
eEF2 Eucaryotic Elongation Factor 2
ER Estrogen Receptor
EWS EWing Sarcoma protein
FAD Flavine Adénine Dinucléotide
FBXO E-Box Only protein
FLC Flowering Locus C
FPR4 FK506-binding Protein Related protein 4
GAMT GuanidinoAcetate N-MethylTransferase
GNAT Gcn5-related N-AcetylTransferases
GR Glucocorticoid Receptor
GRIP1 Glutamate Receptor-Interacting Protein 1
HAT Histone AcetylTransferase
HDAC Histone DeAcetylase
HKMT Histone lysine (K) MethylTransferase
HOXA9 HOmeobox A9
HRE Hormone Response Element
IHGSC International Human Genome Sequencing Consortium
JABP1 JAK Binding Protein 1
Jak2 JAnus Kinase 2
H3R2 Histone H3 aRginine 2
H2AR29 Histone H2A aRginine 29
H4R3 Histone H4 aRginine 3
HIV1 Human Immunodeficiency Virus 1
Hsl7 Histone Synthetic Lethal 7
Jak2 JAnus Kinase 2
JmjC JuMonji C
LBD Ligand Binding Domain
LSD1 Lysine Specific Demethylase 1
MART Mono-ADP-RibosylTransferase
MBD2 Methyl-DNA-Binding Domain protein 2
MBT Malignant Brain Tumor

MDC1 Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1
MeCP MEthylated CpG binding Protein
MEP50 MEthylosome Protein 50
MR Mineralocorticoid Receptor
MYST MOZ, Ybf2/Sas3, SAS2 and Tip60 related domain
NAD Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NCoA Nuclear receptor COActivator
NR Nuclear Receptor
NRID Nuclear Receptor Interaction Domain
Nup NUcleoPorin
O-GlcNAc O-linked β -N-ACétylGLuCosamine
O-GlcNAcase O-linked β -N-ACétylGLuCosaminidASE
p/CAF P300/CBP-Associated Factor
p/CIP P300/CBP coIntegrator associated Protein
PABP1 Poly-A Binding Protein 1
PABC Poly-A Binding protein Carboxy-terminal domain
PADI4 Peptidyl Arginine Delminase 4
PARP Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PHD Plant Homeo Domain
PHRMT10 Plant Histone aRginine MethylTransferase 10
pICln Protein Inducing ChLoride Nucleotide-sensitive current
PIWI P-element Induced Wimpy testis
Poi β ADN POLymérase β
PR Progesterone Receptor
PRMT Protein aRginine MethylTransferase
PWWP Pro-Trp-Trp-Pro motif
RAC3 RAR-Associated Coactivator 3
RAR Retinoic Acid Receptor
RioK1 RIO Kinase 1
Rmt2 ARginine MethylTransferase 2
RNPsn RiboNucléoProtéine « Small Nuclear »
rpS2 Ribosomal Protein S2
RRM RNA Recognition Motif
RXR 9-*cis* Retinoic acid Receptor
SAH S-Adénosyl-Homocystéine
SAM S-Adénosyl-L-Méthionine
Sam68 SRC substrate Associated during Mitosis
SAP49 Spliceosome-Associated Protein 49
SET Su(var)3-9, E(z) and Trx related domain
Sir2 SIRtuin protein 2
SKP1 S-phase Kinase-associated Protein 1
SLM Sam68-Like Mammalian protein
SMN Survival Motor Neuron
SRC Steroid Receptor Coactivator
SPT5 SPaTula protein 5
SUMO Small Ubiquitin-like MOdifier
SWI/SNF SWitch defective/Sucrose Non-Fermenter
TARPP Thymocyte cyclic AMP-Regulated PhosphoProtein
TDRD TuDoR Domain containing protein
TFIID Transcription Factor II D
TIF2 Transcriptional Intermediary Factor 2
TNF- α Tumor Necrosis Factor α
TPR TetratricoPeptide Repeat
TR Thyroid hormone Receptor
TRAM-1 Thyroid Receptor Activator Molecule 1
UDP-GlcNAc Uridine DiPhosphate N-ACétylGLuCosamine
VDR Vitamin D Receptor
VIH Virus d'Immunodéficience Humaine

**Étude structurale de l'histone-méthyltransférase « CARM1 »
et de ses complexes biologiquement significatifs**

Des structures 3D vers la conception rationnelle de
composés à action pharmacologique

PRÉAMBULE

L'une des thématiques de recherche de l'équipe « Biologie structurale des cibles épigénétiques », dirigée par le Professeur Jean Cavarelli, porte sur la compréhension au niveau structural des mécanismes de reconnaissances biologiques impliquant les protéine arginine méthyltransférases (PRMT). Ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la transcription, la traduction, la transduction du signal, la maturation et le transport des ARN, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Les PRMT constituent aussi une des nouvelles cibles potentielles en chimiothérapie car de nombreux travaux ont montré que des dérégulations des processus cellulaires impliquant les PRMT peuvent induire certains cancers. La découverte de modulateurs spécifiques de l'activité des PRMT pourrait donc ouvrir des voies thérapeutiques nouvelles. La compréhension à l'échelle atomique du mode d'action des PRMT s'avère donc cruciale à la fois au niveau fondamental et pour des applications pharmacologiques.

Les PRMT utilisent la S-adénosyl-méthionine (SAM) comme donneur de méthyle et sont divisées en quatre classes, selon la nature chimique des arginines modifiées produites. Les deux classes principales sont les PRMT de type I et les PRMT de type II, catalysant respectivement la formation d'arginines diméthylées asymétriques et symétriques. Les PRMT sont des protéines modulaires construites autour d'un domaine catalytique commun auquel des modules additionnels idiosyncratiques à chaque PRMT sont parfois ajoutés. Au moins 9 PRMT (notées de PRMT1 à PRMT9) ont été identifiées chez l'Homme. Bien que plusieurs structures tridimensionnelles de PRMT soient connues et en dépit de nombreux travaux dans un domaine très compétitif à l'échelle internationale, très peu de connaissances structurales sont disponibles pour comprendre le mode de reconnaissance et de fixation d'un peptide substrat. Cela est probablement dû à la faible stabilité de ces complexes ou au comportement oligomérique des PRMT en solution qui complique les études structurales.

La première cible étudiée par l'équipe a été la protéine PRMT4 aussi connue sous le nom de « Coactivator-Associated aRginine Methyltransferase 1 » (CARM1). PRMT4/CARM1 est recrutée par les coactivateurs primaires de la transcription, ceux-ci interagissant directement, de façon ligand-dépendante, avec les récepteurs nucléaires et avec plusieurs autres coactivateurs provoquant ainsi un remodelage de la chromatine nécessaire à l'activation de la transcription. Avant mon arrivée dans l'équipe, plusieurs structures de domaines isolés de CARM1 avaient été déterminées. D'autre part, plusieurs inhibiteurs de PRMT, et en particulier de PRMT1, avaient déjà été abondamment décrits mais leur affinité semble être relativement faible avec CARM1.

Mes travaux de thèses ont porté sur cette thématique avec deux objectifs scientifiques majeurs : (i) révéler à l'échelle atomique les liens de coopérativité liant l'activité de méthylation et les reconnaissances macromoléculaires dans lesquelles la protéine CARM1 est impliquée ; (ii) découvrir des modulateurs de CARM1 pouvant donner lieu aux développements d'inhibiteurs spécifiques. Ces travaux ont comporté deux aspects : des études structurales par diffraction des rayons X sur des monocristaux et des études biophysiques sur les interactions entre les PRMT et leurs substrats (ou analogues de substrat). Les travaux développés sur PRMT4 ont pu être étendus à PRMT5 et PRMT6.

La stratégie utilisée pour résoudre les difficultés actuelles d'identification et de visualisation de complexes peu stables a été de synthétiser des composés covalents analogues de l'état de transition de la réaction de méthylation. Ces travaux s'appuient sur une collaboration étroite avec l'équipe de chimistes dirigée par Alain Wagner, Directeur du laboratoire de « Synthèse bio-organique » de Strasbourg. En utilisant des approches complémentaires, des analogues et des mimes de l'état de transition de la réaction de méthylation, où un substrat/produit est lié à un analogue du cofacteur SAM, ont été conçus et synthétisés. Dans d'autre cas, un pontage covalent d'un substrat à un cofacteur s'est avéré comme une stratégie efficace pour capturer et caractériser des complexes enzyme-substrat peu stables. La stratégie développée dans l'équipe s'est appuyée sur les structures tridimensionnelles de CARM1 pour synthétiser ces analogues et mimes de l'état de transition. Une stratégie induite étant que ces analogues ou mimes pourraient servir de base à la conception de nouveaux inhibiteurs spécifiques ou sélectifs d'une famille de PRMT donnée. Un processus itératif combinant synthèse chimique, modélisation moléculaire et structure 3D de complexes a été utilisé pour améliorer la spécificité et la sélectivité des composés. Les tests de fixation des composés sur les PRMT ont été réalisés par 2 méthodes biophysiques (Thermofluor® et microcalorimétrie), ainsi que par des tests d'inhibition compétitive pour déterminer l' IC_{50} des composés, puisqu'ils entrent en compétition avec le cofacteur. Afin d'analyser la sélectivité de ces composés, ceux-ci ont également été testés sur PRMT1.

Un autre aspect de mon travail de thèse a été de caractériser l'interaction entre CARM1 et certains de ses peptides substrats. Lors de précédents travaux portant sur différentes constructions et différents mutants ponctuels de CARM1 (travaux de thèse de Pierre Hassenboehler), plusieurs résidus essentiels à l'activité catalytique de la protéine ont été identifiés. Des tests d'activités approfondis nous ont permis de déterminer les valeurs des constantes cinétiques (K_m et de K_{cat}) pour chaque mutant, et ainsi de montrer l'implication du résidu muté dans le mécanisme catalytique, dans la fixation du cofacteur, ou dans la reconnaissance du substrat. En parallèle, une collaboration avec l'équipe de « Biophotonique des interactions moléculaires et cellulaires » dirigée par Yves Mély a été mise en place, afin de

développer des méthodes portant sur l'étude des mécanismes de reconnaissance de CARM1 pour ses substrats. Deux méthodes ont été utilisées : l'anisotropie de fluorescence et la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). Ces deux techniques nous ont permis d'étudier et de caractériser l'interaction de différents peptides substrats avec différentes constructions et différents mutants ponctuels de CARM1.

Afin d'appliquer la stratégie développée pour CARM1 à d'autres membres de la famille des PRMT, notre équipe a également travaillé sur PRMT5 et PRMT6. Contrairement à CARM1, PRMT5 est une PRMT de type II, catalysant la formation d'arginine diméthylée symétrique. La résolution de sa structure permettrait donc de mettre en évidence ce qui la différencie des PRMT de type I. PRMT5 fait partie d'un complexe protéique appelé méthylosome. Dans ce complexe, PRMT5 est associée à la protéine MEP50, et à un autre partenaire variable gouvernant la spécificité de substrat de PRMT5. Comme CARM1, PRMT6 est une PRMT de type I. Cependant, ces deux enzymes possèdent des substrats distincts, et ont donc des mécanismes de reconnaissance différents.

Ce manuscrit commence par un chapitre introductif, présentant les PRMT, et plus spécifiquement la protéine CARM1, dans leur contexte biologique. Après une brève présentation portant sur l'épigénétique, la famille des PRMT est décrite fonctionnellement et structuralement. La fin de ce chapitre est consacrée à l'implication des PRMT dans certaines pathologies, ainsi qu'aux inhibiteurs ayant déjà été décrits.

Après un deuxième chapitre décrivant les méthodes et techniques utilisées pour l'étude fonctionnelle et structurale de CARM1, les différents résultats obtenus durant cette thèse sont détaillés en 3 chapitres. Dans un premier temps, l'étude structurale de CARM1 en complexe avec des analogues de substrats est présentée (chapitre III), suivie de la caractérisation en solution des interactions entre CARM1 et différents substrats (chapitre IV). Enfin, le chapitre V est consacré au modèle mécanistique de la reconnaissance et de la méthylation par CARM1 qui peut être déduit des résultats présentés auparavant. Les résultats obtenus pour PRMT5 et PRMT6 sont rapidement présentés dans le chapitre VI, avant de terminer par les conclusions et perspectives ouvertes par ces travaux.

Introduction

CHAPITRE I - INTRODUCTION

A. L'ÉPIGÉNÉTIQUE : « AU-DELÀ DE LA GÉNÉTIQUE »

La fin du siècle dernier a été marquée par le lancement d'un projet d'une grande ampleur et d'une importance considérable pour la communauté scientifique : le séquençage du génome humain. Ce projet avait pour but d'obtenir une séquence très précise de la partie « active » du génome humain, qui pourrait par la suite servir de base solide pour la recherche biomédicale. Au début des années 2000, la collaboration entre les 20 équipes du Consortium International de Séquençage du Génome Humain (IHGSC) porta ses fruits, et la séquence du génome humain fut dévoilée [1, 2]. La connaissance du génome humain est importante pour la recherche fondamentale biomédicale, car elle est à l'origine du développement de nouvelles méthodes de diagnostic et de nouvelles thérapies.

Cependant, au-delà de l'information génétique, codée par l'ADN, il existe un autre type d'information : l'information épigénétique [3]. L'information épigénétique est définie comme étant responsable des changements stables et transmissibles de l'expression génique, et donc du phénotype, sans que la séquence d'ADN génomique ne soit modifiée. Il a été observé que de nombreuses maladies se développent lorsque l'information épigénétique incorporée est erronée [4], montrant que cette dernière est importante pour le bon déroulement du développement. Ainsi, l'épigénétique est devenue l'un des domaines de recherches en expansion ces 10 dernières années (Figure 1).

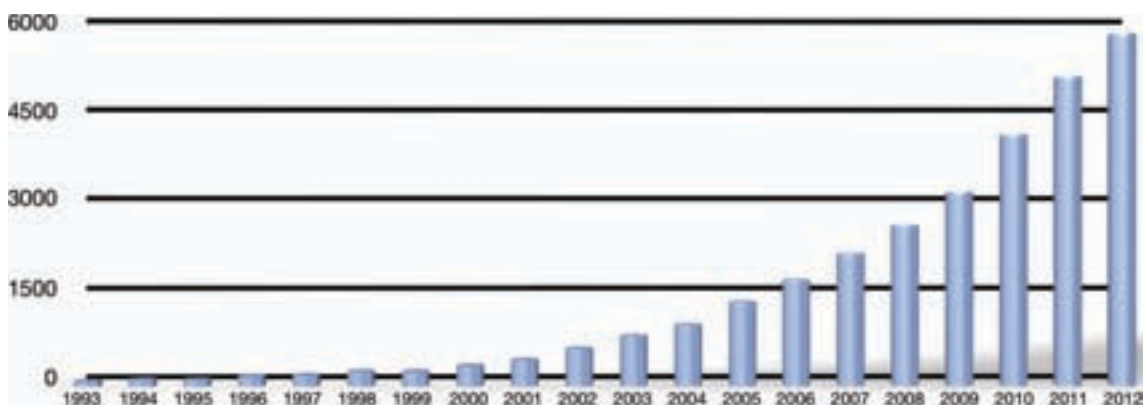


Figure 1 - Évolution du nombre de publications sur l'épigénétique au cours des 20 dernières années.
Pour chaque année, le nombre de publications correspond au résultat d'une recherche PubMed à partir des termes « epigenetic » ou « epigenetics ».

Dans nos cellules, comme dans toute autre cellule eucaryote, les 3 milliards de paires de bases portant l'information génétique sont stockées dans le noyau sous forme de chromosomes, dont l'élément constitutif est la chromatine. Mise en évidence en 1880 par Walther Flemming [5], l'organisation de la chromatine a été décrite de plus en plus précisément

au cours du siècle dernier, grâce à l'évolution des technologies [6]. La chromatine possède différents niveaux de compaction (Figure 2), dont le plus élevé est le chromosome métaphasique. L'élément de base de la chromatine est le nucléosome. Décrit pour la première fois en 1974 [7-9], le nucléosome est composé d'un octamère de protéines, appelées histones, autour desquelles est enroulé l'ADN (en moyenne 147 paires de base), comme le montre la première structure obtenue en 1997 par Luger, Mader et collaborateurs [10], ou celle à plus haute résolution de 2002 [11] (Figure 2). Le nucléosome est une structure globulaire, de laquelle dépassent les queues des histones qui restent accessibles. Une 5^e protéine, l'histone H1, aide à garder la structure du nucléosome fermée, en se plaçant au niveau du point d'entrée/sortie de l'ADN [12, 13], et permet ainsi de garder la structure rigide hélicoïdale de la chromatine, pour former un solénoïde de 30 nm de diamètre [14-16].

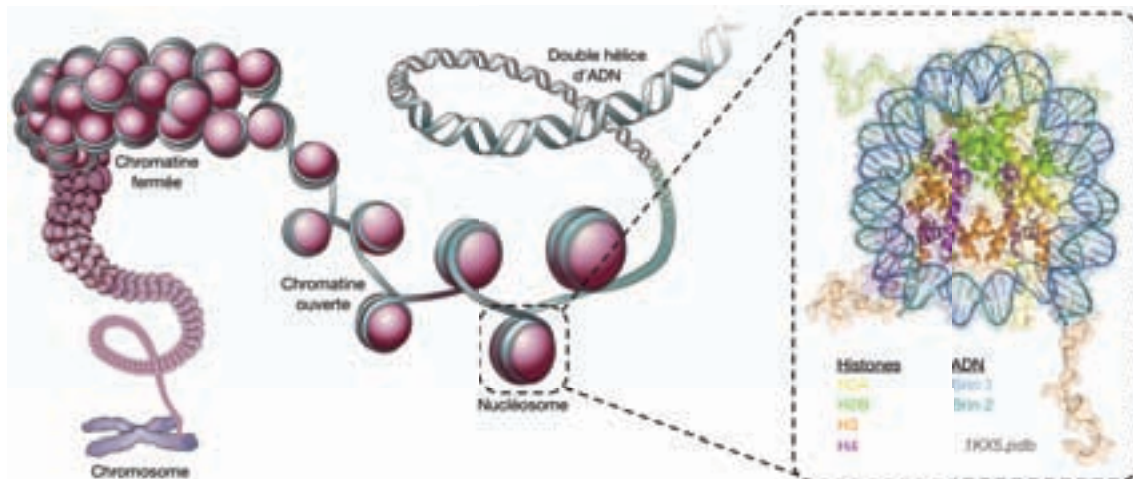


Figure 2 - Organisation structurale de la chromatine.

Adaptation de « Polygamous DNA » [3]. La partie gauche de la figure montre les différents niveaux de compaction de la chromatine, du chromosome au nucléosome. La partie droite correspond à la structure cristallographique du nucléosome à 1,9 Å de résolution [11], où l'on peut voir la double hélice d'ADN enroulée autour de l'octamère d'histones, comportant deux dimères H2A/H2B associés à deux dimères H3/H4, avec les queues des histones dégagées vers l'extérieur.

Les différents niveaux de compaction de la chromatine permettent de réguler l'accessibilité aux gènes. La chromatine est ainsi caractérisée de 2 manières : on distingue l'euchromatine, correspondant à la chromatine dite « active », qui est peu compacte et dont les gènes sont accessibles, et l'hétérochromatine, qui est au contraire très compacte et dont l'ADN n'est pas accessible à la machinerie cellulaire, comme le montrent différentes expériences de digestion de la chromatine à la DNase [17-19]. Depuis les années 1980, il est connu que ces différentes régions de la chromatine possèdent des caractéristiques particulières, comme la présence de l'histone H1 au niveau des nucléosomes de l'hétérochromatine [20], ou encore la forte acétylation des histones H3 et H4 des nucléosomes de l'euchromatine [21]. C'est grâce à ce genre de modifications que les différents états de la chromatine sont modulés, pour que des événements tels que la transcription, la réplication ou

encore la réparation de l'ADN puissent avoir lieu, et ce, de façon organisée. Différents mécanismes participant à la régulation de l'état de compaction de la chromatine ont été mis en évidence : l'action de facteurs de remodelage de la chromatine, l'insertion de variants d'histones, et enfin, la modification covalente de la chromatine.

B. CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS ÉTATS DE LA CHROMATINE

Depuis les travaux d'Allfrey dans les années 1960, il est évident que différentes modifications au niveau de la chromatine permettent de réguler les différents états de compaction, et ainsi de contrôler l'accessibilité à l'ADN [22]. Différents types de modifications covalentes de la chromatine ont été observés, à la fois sur l'ADN et sur les histones. On leur donne le nom de « marques épigénétiques ». Contrairement à l'ADN qui ne peut être « que » méthylé, les histones peuvent être soumises à différentes modifications post-traductionnelles, influençant différemment les mécanismes cellulaires liés à l'ADN, tels que la transcription, la réplication, la réparation ou encore la recombinaison.

1. MÉTHYLATION DE L'ADN

Pendant les années 1970, la méthylation de l'ADN a été caractérisée comme marque épigénétique [23, 24]. Chez les animaux, elle est restreinte à la modification des cytosines présentes dans les dinucléotides CpG, et chez les mammifères, environ 70 % de l'ensemble de ces CpG sont méthylés. Au niveau de la chromatine, les régions méthylées de l'ADN se situent principalement dans l'hétérochromatine [17], ce qui est en adéquation avec l'implication de la méthylation de l'ADN dans la répression de la transcription [25-27]. Il a été montré que l'inhibition de la transcription n'est pas directement due à la méthylation de l'ADN, mais à l'influence de la méthylation sur l'assemblage de la chromatine [28, 29].

Chez les vertébrés, plus de la moitié des gènes possèdent des séquences de 500 à 2000 paires de bases riches en CpG, appelées îlots CpG, alors que ce motif est quasiment absent dans le reste du génome. La plupart des îlots CpG demeurent non méthylés dans les cellules somatiques [30] et sont dénudés de nucléosomes [31]. On les retrouve principalement au niveau des promoteurs des gènes gardiens (« housekeeping genes ») et de gènes spécifiques de certains tissus. Il y a une corrélation importante entre la présence d'ADN méthylé au niveau des promoteurs des gènes et la répression de la transcription de ces mêmes gènes [32-34]. Un bon exemple est l'inactivation du chromosome X chez les femmes, où l'ensemble des îlots CpG sont méthylés [35].

L'hyperméthylation des régions répétées telles que les centromères est importante pour la stabilité chromosomique, comme lors de la ségrégation des chromosomes, pendant la

mitose [36]. Elle est également susceptible de supprimer l'expression des éléments transposables et ainsi de jouer un rôle dans la stabilité du génome.

La méthylation de l'ADN est une modification dynamique, mise en place par les ADN méthyltransférases (DNMT), et dont la suppression nécessite l'excision de la base modifiée et la réparation de l'ADN [37, 38]. Les DNMTs présentent une partie amino-terminale capable d'interagir avec l'ADN ainsi qu'avec d'autres protéines, et une partie carboxy-terminale portant l'activité catalytique [39]. La S-adénosyl-L-méthionine (SAM) est utilisée comme donneur de méthyle, qui est transféré sur le carbone C5 des cytosines, cette réaction relarguant de la S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) [40].

La méthylation de l'ADN réprime la transcription par l'intermédiaire de protéines reconnaissant les CpG méthylés (MeCP) [41, 42]. Ces protéines sont capables de recruter d'autres facteurs, comme les histones déacétylases, capables de répercuter le signal de répression au niveau du nucléosome [43].

2. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES

La résolution de la structure du nucléosome a permis de montrer que les extrémités amino-terminales des histones dépassent du cœur de la molécule, leur permettant ainsi d'interagir avec les nucléosomes voisins [10]. Des modifications au niveau des queues d'histones seraient alors capables d'affecter ces interactions entre les nucléosomes, et ainsi perturber la structure globale de la chromatine. De plus, de telles modifications peuvent également affecter les interactions avec d'autres protéines, comme des facteurs de la transcription, ou encore des enzymes pouvant apporter de nouvelles modifications aux histones [44].

Plus d'une soixantaine de sites différents sur les histones ont été identifiés comme cibles de modifications spécifiques (Figure 3). Un nouveau terme, le « code histone », a été défini il y a un peu plus d'une dizaine d'année, décrivant l'action séquentielle ou combinatoire de plusieurs modifications distinctes des histones, permettant ainsi de réguler des événements biologiques uniques, par le biais d'autres protéines capables de reconnaître ces modifications [45].

Différents types de modifications post-traductionnelles ont été identifiés au niveau des histones. L'acétylation des lysines est la première modification à avoir été mise en évidence et est réalisée par les histones acétyltransférases (HAT). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement acétyle provenant de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) sur l'amine ϵ de la chaîne latérale des lysines. Les histones déacétylases (HDAC) s'opposent aux effets des HAT et

effacent les marques déposées sur les lysines, rétablissant ainsi leur charge positive. Une autre modification post-traductionnelle courante des histones est la méthylation. Cette modification peut avoir lieu soit sur les lysines, soit sur les arginines. La méthylation des lysines sur les histones est réalisée par les histones lysine méthyltransférases (HKMT) et cette marque peut être effacée par les lysines déméthylases. La méthylation des arginines est quant à elle réalisée par les protéine arginine méthyltransférases (PRMT), et à l'heure actuelle aucune enzyme antagoniste n'a été identifiée. D'autres modifications post-traductionnelles ont également été mise en évidence au niveau des histones, comme la désamination, la phosphorylation, l'ubiquitylation, la sumoylation, l'ADP-ribosylation, l'isomérisation des prolines, ou encore la β -N-acétylglucosamination.

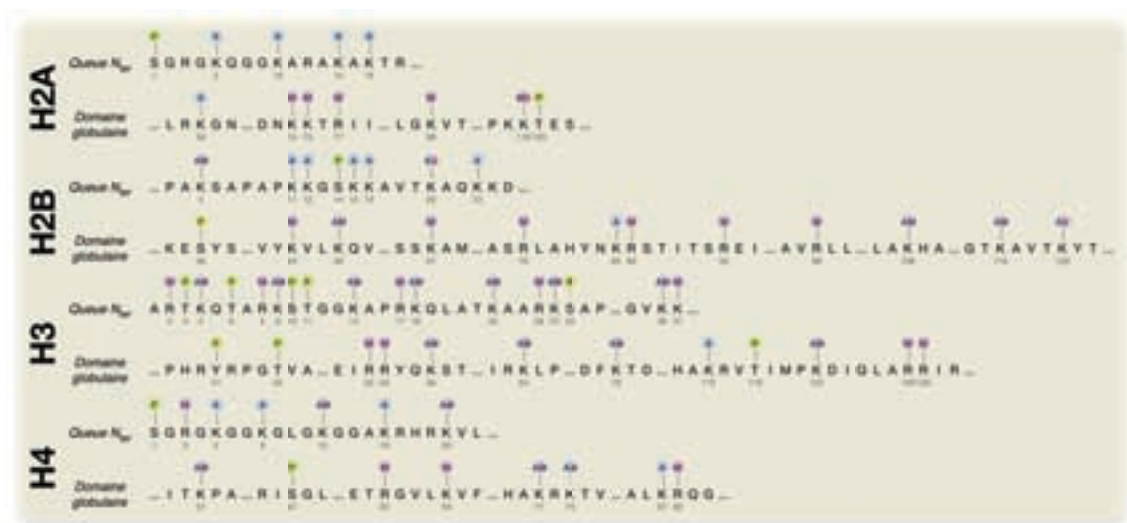


Figure 3 - Vue schématique du nucléosome et des modifications post-traductionnelles des histones [4, 46, 47]
 Les histones sont les cibles de modifications post-traductionnelles, particulièrement aux niveaux de leurs queues amino-terminales qui dépassent du domaine globulaire et qui sont donc plus facilement accessibles. Les modifications les plus courantes sont représentées ainsi pour chaque site : **A** acétylation, **M** méthylation, **P** phosphorylation, **U** ubiquitylation, **AM** acétylation ou méthylation, **AU** acétylation ou ubiquitylation, **MU** méthylation ou ubiquitylation. La position des sites soumis aux modifications est notée en gris sous le résidu concerné.

C. LA FAMILLE DES PRMT : « PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASES »

La méthylation des arginines n'a pas seulement lieu sur les histones, mais aussi au niveau d'autres protéines, impliquées dans différents mécanismes, comme la traduction, la maturation et le transport de l'ARN, la transduction du signal, la réparation de l'ADN et la différenciation cellulaire [48-51]. Cette place centrale qu'occupent les PRMT dans le fonctionnement cellulaire explique pourquoi leur dérégulation provoque des troubles tels que cancers, maladies auto-immunes, maladies pulmonaires ou encore altérations du système nerveux [48, 50]. L'implication des PRMT dans de telles maladies en a fait un sujet de

recherche important, puisqu'une meilleure compréhension de leur fonctionnement aiderait au développement de nouveaux médicaments.

1. GÉNÉRALITÉS SUR LES PRMT

Les PRMT peuvent être séparées en 4 classes, selon le type de méthylarginine qu'elles produisent. En effet, les arginines possèdent 3 atomes d'azote susceptibles d'être méthylés : deux à l'extrémité de leur chaîne latérale, appelés « ω », pouvant être mono- ou diméthylés, et un à l'intérieur de leur chaîne latérale, appelé « δ », qui peut être uniquement monométhylé (Figure 5). Les PRMT de type I, II et III catalysent toutes la formation d' ω -monométhylarginine (ω MMA) (Figure 5), alors que les PRMT de type IV catalysent elles la formation de δ -monométhylarginine (δ MMA) (Figure 5). Les PRMT de type III et IV se limitent à la formation de monométhylarginine, tandis que les PRMT de type I et II catalysent également la formation d' ω -diméthylarginine, asymétrique (ω ADMA) pour les PRMT de type I (Figure 5) et symétrique (ω ADMS) pour les PRMT de type II (Figure 5). La molécule fournissant le groupement méthyle au cours de ces réactions est la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) (Figure 4), qui est transformée en S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) (Figure 4). La majorité des PRMT sont des PRMT de type I (PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4/CARM1, PRMT6, PRMT8 et PRMT10), et seulement quelques-unes sont de type II (PRMT5, PRMT7), de type III (PRMT7) ou de type IV (RMT2 de levure).

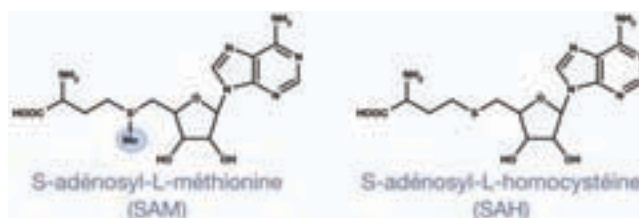


Figure 4 - Représentation développée du SAM et du SAH

La S-adénosyl-L-méthionine (SAM) est le cofacteur donneur de méthyle lors de la réaction de méthylation par les PRMT. La S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) est le produit secondaire obtenu lors de cette réaction. Le groupement méthyle partant du SAM est entouré en bleu.

Les PRMT se caractérisent par une homologie structurale. En effet, toutes les PRMT sont organisées autour d'un domaine central d'environ 300 acides aminés portant l'activité arginine-méthyltransférase. Les alignements de séquences mettent en évidence la présence de 4 motifs conservés (Figures 78 à 81 en annexes) au sein de ce domaine catalytique, impliqués dans la fixation du cofacteur SAM ainsi que dans la réaction de méthylation. Les différentes PRMT peuvent cependant être distinguées par la présence de domaines additionnels à leurs extrémités amino- et/ou carboxy-terminales, responsables de leur spécificité (Figure 6) [52].

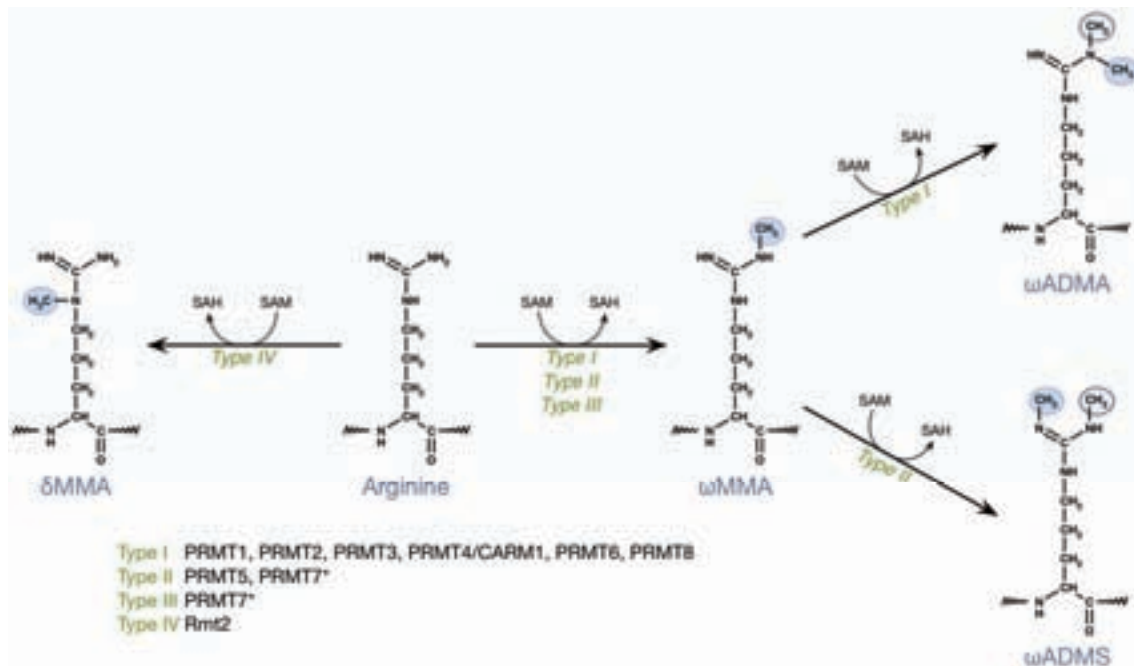


Figure 5 - Réactions de méthylation catalysées par les PRMT

Les PRMT sont séparées en 4 types, en fonction de la réaction de méthylation catalysée et du produit formé. Les PRMT de type IV catalysent la formation de δ -monométhylarginine (δ MMA), les PRMT de type I, II et III la formation de ω -monométhylarginine (ω MMA). Les PRMT de type I et II catalysent une 2^e réaction de méthylation permettant respectivement la formation de ω -diméthylarginine asymétrique (ω ADMA) et de ω -diméthylarginine symétrique (ω ADMS). PRMT7 est marquée d'un astérisque, car elle a été caractérisée à la fois de type II et de type III.

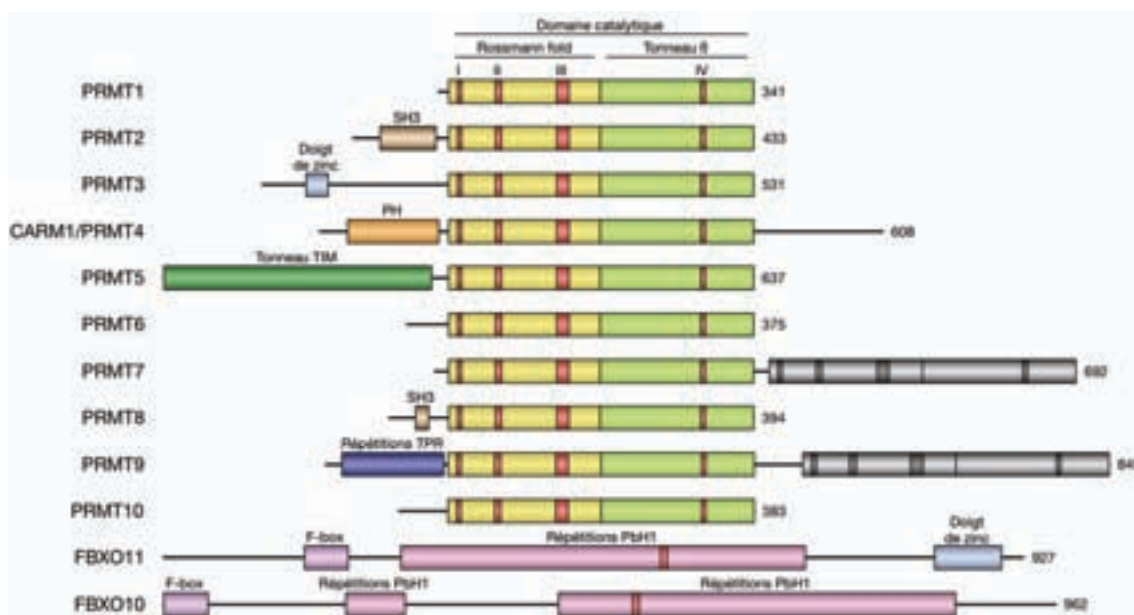


Figure 6 - Organisation structurale des PRMT

Les PRMT sont organisées autour d'un domaine catalytique central, présentant 4 motifs conservés (notés de I à IV). Chaque PRMT est ensuite caractérisée par l'existence (ou non) d'extensions amino- et carboxy-terminales. Les seules exceptions sont les protéines FBXO11 et FBXO10, dont l'organisation est totalement différente et qui ne possèdent que le motif II. Leur appartenance à la famille des PRMT doit encore être confirmée. Toutes les PRMT représentées sont les protéines humaines, à l'exception de PRMT10, spécifique des plantes, et qui est ici la protéine chez *Arabidopsis thaliana*.

Toutes les PRMT ne sont pas présentes chez tous les eucaryotes (Tableau 1). Le génome des mammifères code pour 9 PRMT (PRMT 1 à 9), alors que le génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ne code que pour 3 PRMT (HMT1, HSL7 et RMT2). Le cas des plantes est également particulier : sur ces 9 PRMT, seulement 6 sont présentes (PRMT1 et les PRMT 3 à 7), et il existe parfois deux versions d'une même PRMT, comme par exemple chez *Arabidopsis thaliana*, dont le génome code pour 2 versions de PRMT1 (PRMT1A/B) ainsi que pour 2 versions de PRMT4/CARM1 (CARM1A/B). Chez les plantes, une autre PRMT a également été mise en évidence, qui n'est présente dans aucun autre organisme : PRMT10.

	PRMT1	PRMT2	PRMT3	PRMT4	PRMT5	PRMT6	PRMT7	PRMT8	PRMT9	PRMT10	Rmt2
<i>H. sapiens</i>	100% (100%)	100% (100%)	100% (100%)	100% (100%)	100% (100%)	100% (100%)	100% (100%)	100% (100%)	100% (100%)	-	-
<i>M. musculus</i>	99% (100%)	82% (89%)	89% (93%)	98% (98%)	98% (99%)	89% (92%)	85% (93%)	98% (99%)	86% (93%)	-	-
<i>g. gallus</i>	80% (92%)	-	74% (86%)	-	76% (86%)	-	68% (82%)	94% (96%)	73% (85%)	-	-
<i>A. carolinensis</i>	96% (98%)	-	72% (84%)	93% (96%)	84% (91%)	-	69% (82%)	90% (95%)	70% (82%)	-	-
<i>X. tropicalis</i>	95% (98%)	55% (72%)	65% (79%)	87% (92%)	84% (93%)	58% (75%)	63% (77%)	88% (94%)	60% (76%)	-	-
<i>D. rerio</i>	90% (96%)	55% (73%)	62% (76%)	85% (92%)	78% (87%)	54% (74%)	63% (76%)	82% (89%)	56% (71%)	-	-
<i>C. intestinalis</i>	76% (90%)	-	45% (60%)	63% (78%)	51% (67%)	47% (68%)	43% (60%)	-	29% (47%)	-	-
<i>B. floridae</i>	78% (92%)	47% (64%)	53% (71%)	55% (71%)	61% (76%)	51% (69%)	45% (61%)	-	37% (58%)	-	-
<i>S. purpuratus</i>	73% (85%)	46% (66%)	46% (63%)	58% (71%)	49% (65%)	41% (58%)	46% (67%)	-	-	-	-
<i>D. melanogaster</i>	68% (84%)	-	40% (60%)	59% (76%)	40% (58%)	-	36% (55%)	-	-	-	-
<i>C. elegans</i>	67% (82%)	-	-	-	34% (48%)	-	32% (47%)	-	24% (40%)	-	-
<i>N. vectensis</i>	72% (83%)	47% (63%)	51% (66%)	-	53% (68%)	-	-	-	33% (52%)	-	-
<i>S. pombe</i>	59% (75%)	-	37% (54%)	-	37% (55%)	-	-	-	-	-	29% (45%)
<i>S. cerevisiae</i>	52% (70%)	-	-	-	27% (45%)	-	-	-	-	-	100% (100%)
<i>A. thaliana</i>	58% (76%)	-	32% (51%)	47% (65%)	47% (64%)	45% (59%)	32% (49%)	-	-	100% (100%)	-

Tableau 1 - Homologie de séquence des PRMT chez les eucaryotes.

Données adaptées de Wang et Li 2012 [53]. La première valeur correspond au pourcentage d'identité de séquence par rapport à la protéine de référence (protéine humaine pour les PRMT 1 à 9, protéine d'*Arabidopsis thaliana* pour PRMT10, et la protéine de *Saccharomyces cerevisiae* pour Rmt2). La deuxième valeur entre parenthèse correspond au pourcentage de similarité de séquence par rapport à la protéine de référence. Les alignements correspondants pour PRMT4, PRMT5 et PRMT6 sont disponibles en annexes (Figures 78 à 81).

2. PRMT DE TYPE I

a. PRMT1

PRMT1 est le premier membre de la famille des PRMT à avoir été mis en évidence chez les mammifères en 1996 [54]. C'est la PRMT de type I la plus conservée et la plus exprimée (Tableau 1), puisqu'elle est responsable de plus de 85% de l'activité arginine-méthyltransférase chez la souris [55]. Cette protéine est retrouvée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme [56], et possède une grande diversité de substrats. Une telle palette de substrats peut être expliquée par le fait que la méthylation par PRMT1 a principalement lieu au niveau de séquences riches en glycines et en arginines (motifs GAR) [57].

L'un des principaux substrats de PRMT1 est l'histone H4, qui est méthylée par PRMT1 au niveau de l'arginine 3 (H4R3), permettant l'activation de la transcription, et impliquant ainsi PRMT1 dans la régulation de ce mécanisme [58, 59]. Concernant également la régulation de la transcription, il a été montré que PRMT1 est capable de méthyler la protéine SPT5 (« SPaTula protein 5 »), contrôlant l'élongation de la transcription en modulant la processivité de l'ARN polymérase II. La méthylation par PRMT1 a pour effet d'inhiber son interaction avec l'ARN polymérase II, influençant ainsi de manière négative l'élongation de la transcription [60].

De plus, il a été montré que PRMT1 est impliquée dans l'épissage des ARN, grâce à sa capacité à méthyler la protéine Sam68 (« SRC substrate Associated during Mitosis »), ainsi que ses protéines homologues SLM (« Sam68-Like Mammalian protein »), responsable de l'export des ARN non-épissés du virus d'immunodéficience humaine (VIH) [61]. Ces protéines possèdent des motifs GAR, où a lieu la méthylation par PRMT1. Sans méthylation, Sam68 s'accumule dans le cytoplasme. La méthylation a également pour effet d'inhiber la fixation des ARN, et ainsi d'empêcher leur export [61, 62].

PRMT1 est également responsable de la méthylation d'autres protéines, impliquées dans la réparation de l'ADN. Par exemple, il a été montré que PRMT1 est responsable de la méthylation de p53BP1 (« p53 binding protein 1 »), protéine participant à la réparation des cassures d'ADN double brin et contrôlant la recombinaison homologue spontanée [63]. PRMT1 méthyle p53BP1 au niveau de motifs GAR, impliqués dans la liaison à l'ADN, et empêche donc sûrement cette interaction. De plus, PRMT1 méthyle la protéine MRE11, appartenant au complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) participant à la réponse aux dommages de l'ADN pendant la phase intra-S. La méthylation de MRE11 n'influence pas la formation du complexe, mais régule de façon positive son activité exonucléase [64].

Il a aussi été montré que PRMT1 est impliquée dans la transduction du signal, interagissant avec les récepteurs membranaires, comme les récepteurs des interférons- α , β , ou

encore avec le récepteur de l'insuline [65, 66]. Dans les deux cas, la méthylation de protéines spécifiques par PRMT1 semble compléter la phosphorylation des récepteurs, modulant ainsi leur voie de signalisation.

PRMT1 participe également au transport des protéines, comme dans le cas des protéines Sam68 et SLM [61], ou MRE11 [67], où la méthylation de ces protéines par PRMT1 permet de réguler leur recrutement aux niveaux de sites cibles.

b. PRMT2

La protéine PRMT2 a été identifiée grâce à son homologie de séquence avec PRMT1 [68], et se retrouve aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau des cellules. Dans un premier temps, il a été montré que PRMT2 est un coactivateur des récepteurs aux œstrogènes [68], puis plus tard il a été montré que c'était également un coactivateur des récepteurs aux androgènes [69]. Cette protéine participe donc à la régulation de la transcription, d'autant plus que PRMT2 est responsable de la méthylation de l'arginine 8 de l'histone H3, marque épigénétique caractérisant l'activation de la transcription [70]. Cette protéine n'est pas retrouvée chez tous les organismes eucaryotes (Tableau 1), étant sans doute impliquée dans des fonctions spécifiques des animaux, comme le suggère son expression tissu-spécifique chez ceux-ci [71].

c. PRMT3

La protéine PRMT3 est l'une des PRMT de type I à être fortement exprimée chez l'humain [72]. Elle a initialement été identifiée comme protéine interagissant avec PRMT1 par un crible double-hybride, mais ce dimère ne semble pas significatif, puisque PRMT1 et PRMT3 ne sont pas co-éluées en chromatographie d'exclusion moléculaire [73]. PRMT3 n'est pas aussi bien conservée que PRMT1 au sein des eucaryotes, car on ne la retrouve pas dans tous les organismes, comme chez *Saccharomyces cerevisiae* ou encore *Caenorhabditis elegans* (Tableau 1). PRMT3 est retrouvée dans le cytoplasme, et se distingue des autres PRMT par la présence d'un doigt de zinc en amont du site catalytique. Le premier substrat physiologique de PRMT3 a avoir été identifiée est la protéine ribosomique S2 (rpS2), appartenant à la sous-unité 40S du ribosome. La méthylation de la protéine rpS2 au niveau de plusieurs arginines a un effet positif sur la régulation de l'association de celui-ci. L'implication de PRMT3 dans la méthylation de rpS2 est conservée au cours de l'évolution, ce qui montre l'importance de PRMT3 dans la régulation de la formation du ribosome chez les eucaryotes.

d. CARM1 : « Coactivator-Associated aRginine Methyltransferase 1 »

La protéine PRMT4 a initialement été identifiée par crible double-hybride, comme interagissant avec GRIP1, une protéine de la famille p160, coactivateur primaire de la transcription par les récepteurs nucléaires [74]. Elle fut alors appelée CARM1, pour « Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 », nom associant ses deux fonctions principales : celle de coactivateur secondaire des récepteurs nucléaires hormonaux, et celle de PRMT.

❖ *Coactivateur secondaire des récepteurs nucléaires hormonaux*

La transcription des gènes ayant les récepteurs nucléaires hormonaux (NR) pour médiateurs est un assemblage ordonné et progressif de facteurs de transcription et de coactivateurs (Figure 7) [75]. Les récepteurs nucléaires forment une superfamille d'activateurs de la transcription régulés par des hormones spécifiques comprenant, entre autres, les récepteurs aux œstrogènes (ER), aux progestagènes (PR), aux glucocorticoïdes (GR), aux minéralocorticoïdes (MR), aux androgènes (AR), à la vitamine D (VDR), à l'hormone thyroïde (TR), à l'acide rétinoïque (RAR), et à l'acide rétinoïque 9-*cis* (RXR) [76]. Une fois activés par la fixation d'une hormone spécifique, les récepteurs nucléaires peuvent se lier à une séquence d'ADN appelée élément de réponse hormonale (HRE) sous forme d'homo- ou d'hétérodimères et activer la transcription d'un gène en *cis* [77]. Grâce à leurs fonctions d'activation (AF-1 et AF-2), les récepteurs nucléaires sont capables d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle, mais aussi de recruter des complexes coactivateurs participant à la régulation de la transcription. Ces coactivateurs peuvent servir de pont entre les récepteurs et la machinerie transcriptionnelle, modifier la chromatine au niveau du promoteur et des régions amplificatrices, ou encore recruter des coactivateurs secondaires qui modifieront également la chromatine, afin de favoriser la fixation de protéines activatrices et de facteurs généraux de la transcription. Les coactivateurs recrutés au niveau des récepteurs nucléaires agissent comme médiateurs dans toutes les étapes de la transcription, y compris l'élongation, l'épissage de l'ARN et la terminaison [78].

La famille de coactivateurs primaires p160 comprends 3 membres, SRC1 (NCoA1), SRC2 (GRIP1, TIF2, NCoA2), et SRC3 (p/CIP, RAC3, ACTR, AIB1, TRAM-1), et ont tous une taille d'environ 160 kDa. Ils interagissent avec de nombreux récepteurs nucléaires de manière ligand-dépendante et augmentent significativement la transcription NR-dépendante [79]. Leur domaine AD1 est responsable du recrutement de CBP/p300, qui acétyle les histones dans la région environnante [80], alors que leur domaine AD2 est reconnu par CARM1 et PRMT1, qui méthylent respectivement l'histone H3 et l'histone H4 [45, 59, 74]. Ces différentes modifications des histones fonctionnent en synergie, puisqu'il a été montré que la méthylation de H4R3 par PRMT1 facilite l'acétylation par CBP/p300, et que l'acétylation de H3K18 par

cette même enzyme est pré-requise pour que CARM1 puisse méthyler H3R17 [81, 82]. Le domaine AD3 situé à l'extrémité amino-terminale des protéines SRC permet le recrutement d'une diversité de coactivateurs, comme CoCoA (« COiled-coil COActivator ») qui fait office de pont entre le complexe formé par les récepteurs nucléaires et la machinerie transcriptionnelle via TFIID, ou encore BAF57, une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF [83, 84].

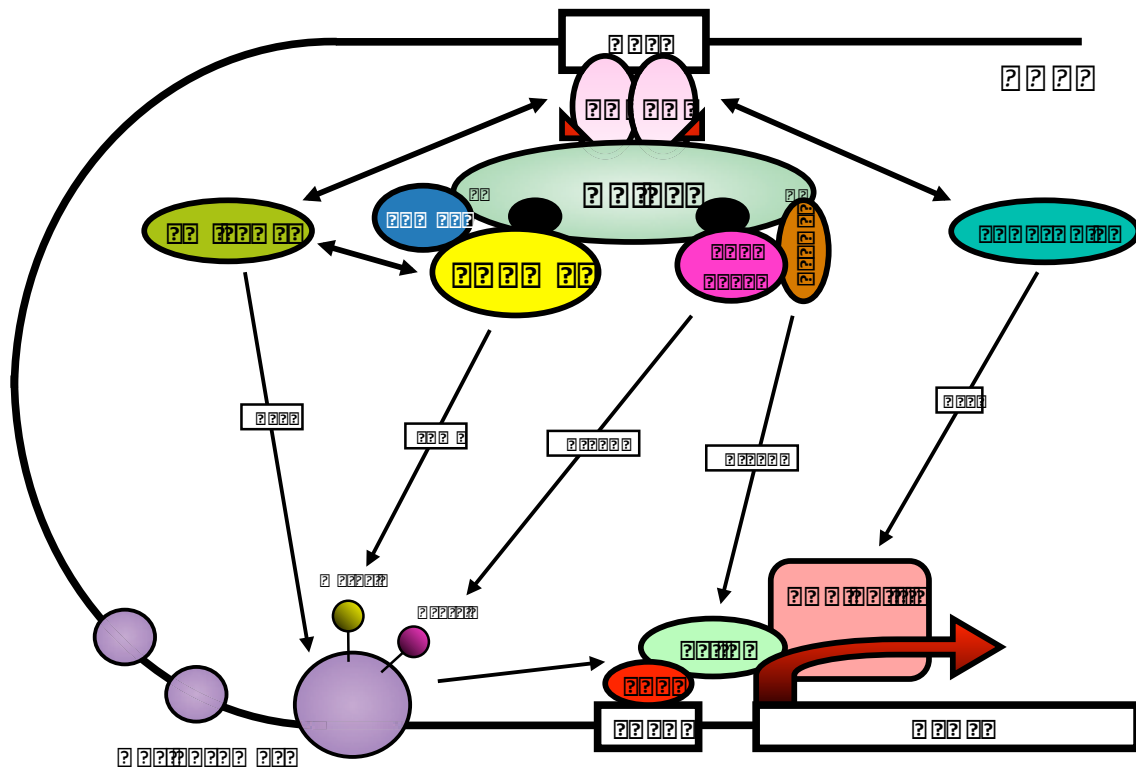


Figure 7 - Mécanisme de coactivation des récepteurs nucléaires par la famille p160

Dans un premier temps, les récepteurs nucléaires (RN), activés par une hormone spécifique, se lie à un élément de réponse hormonale (HRE) au niveau de l'ADN. Par la suite, différents complexes de coactivation sont recrutés afin de remodeler la chromatine et ponter le complexe formé par les récepteurs nucléaires et ses coactivateurs à la machinerie transcriptionnelle générale [75].

❖ *Méthylation de substrats divers*

Outre l'histone H3, que CARM1 est capable de méthyler au niveau de l'arginine 17, mais aussi plus faiblement au niveau des arginines 2 et 26 [85], CARM1 est capable de méthyler un ensemble d'autres protéines, impliquées dans différents mécanismes, plaçant CARM1 au cœur de la vie cellulaire (Figure 8).

Toujours dans le contexte de la transcription, il a été montré que CARM1 est capable de méthyler les coactivateurs secondaires CBP/p300, le coactivateur primaire SRC3, mais aussi, au niveau de la machinerie transcriptionnelle, l'ARN polymérase II. Concernant CBP/p300, CARM1 méthyle ces 2 protéines au niveau de plusieurs arginines situées dans des

domaines différents. Un de ces sites de méthylation se trouve dans le domaine KIX de CBP/p300 (R600 chez CBP, correspondant à R580 chez p300), qui est le domaine d'interaction avec la protéine CREB (« CRE Binding protein »). La méthylation du domaine KIX bloque l'activation de CREB en empêchant l'interaction entre les deux protéines, et réprime ainsi la voie de signalisation de l'adénosine monophosphate (AMP) cyclique [86]. Les autres sites de méthylation de CBP/p300 sont situés en aval du domaine KIX (R714, R742 et R768 chez CBP, correspondant à R705, R728 et R754 chez p300), et influent également sur les interactions de CBP/p300 avec d'autres protéines. Dans le contexte de l'activation de la transcription, la méthylation de ces sites empêche la fixation de CBP/p300 au niveau du domaine AF-1 des protéines SRC, permettant ainsi la modulation de l'activité de ce coactivateur [87]. Cependant, dans le contexte de l'activation des gènes induite par le suppresseur de tumeur p53, la méthylation de CBP/p300 au niveau de l'arginine 754 favorise l'interaction avec le coactivateur BRCA1 (« BReast CAncer 1 »), et permet ainsi l'induction de gènes cibles en réponse aux dommages de l'ADN [88].

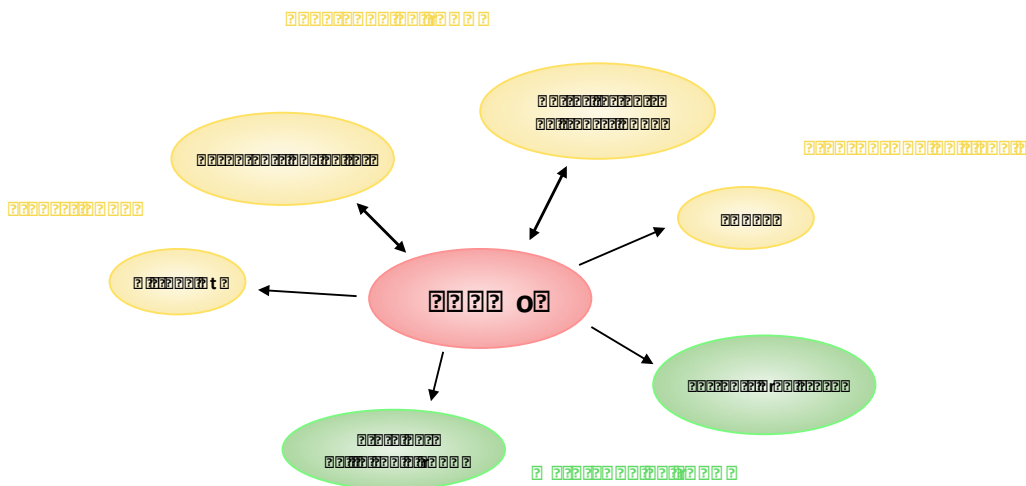


Figure 8 - Implication de CARM1 dans de nombreux mécanismes essentiels à la vie cellulaire

En outre, CARM1 méthyle également le coactivateur primaire SRC3 (R1171, R1177 et R1225), au niveau de leur région d'interaction, provoquant la dissociation du complexe [89]. CARM1 est donc un coactivateur avec 2 fonctions opposées : elle permet l'activation de la transcription en méthylant l'histone H3, mais elle est aussi responsable de mettre fin à la signalisation hormonale en déclenchant le désassemblage du complexe de coactivation. CARM1 est aussi responsable de la méthylation de l'arginine 1810 de l'ARN polymérase II, favorisant l'expression de petits ARN nucléaires et nucléolaires [90]. La méthylation de l'ARN polymérase II serait donc un moyen de sélectionner la machinerie transcriptionnelle devant être recrutée au niveau de types de gènes distincts.

Au-delà du contexte de la transcription, il a été montré que CARM1 méthyle un certain nombre de protéines stabilisant les ARNm, ainsi que des facteurs d'épissage, impliquant CARM1 dans les mécanismes de maturation de l'ARN [91-93]. En effet, CARM1 méthyle les protéines de liaisons à l'ARN HuD et HuR, qui stabilisent les ARNm labiles portant des éléments instables riches en dinucléotides AU [91, 92]. La méthylation de ces 2 protéines semblerait fragiliser leur interaction avec ces ARNm, et ainsi favoriser la dégradation de ceux-ci, impliquant CARM1 dans la régulation post-transcriptionnelle de la régulation des gènes. CARM1 méthyle également plusieurs facteurs d'épissage : CA150, SAP49, SmB et U1C. Cette méthylation leur permet d'être reconnues par le domaine Tudor de certaines protéines, comme la protéine SMN.

CARM1 méthyle également une autre protéine se liant à l'ARN : la « Poly-A Binding Protein 1 » (PABP1) [94]. PABP1 est un médiateur de circularisation des ARNm, qui interagit à la fois avec la queue poly-A de l'ARNm grâce à ses motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM), et avec le facteur eIF4F du complexe d'initiation de la traduction via son domaine PABC (« Poly-A Binding protein Carboxy-terminal domain »). CARM1 méthyle les arginines 455 et 460 de PABP1, situées entre les domaines RRM et PABC. Bien que l'effet de la méthylation soit encore inconnue, elle pourrait influencer les capacités de transport de PABP1, ou encore jouer sur son efficacité de liaison avec ses partenaires. La diversité de substrats de CARM1 lui permet d'être impliquée dans la régulation de l'expression des gènes à différentes étapes, de l'activation de la transcription à l'initiation de la traduction.

Un autre substrat de CARM1 est la protéine TARPP (« Thymocyte cyclic AMP-Regulated PhosphoProtein »), que CARM1 méthyle au niveau de l'arginine 650 [95]. TARPP est exclusivement retrouvée dans les thymocytes immatures et, bien que sa fonction exacte n'ait pas encore été caractérisée, la méthylation de cette protéine par CARM1 est nécessaire à la différenciation de ces cellules.

D'un point de vue général, CARM1 se distingue des autres PRMT par la diversité de ses substrats, qui ne possèdent pas de motifs GAR, et dont le mode de reconnaissance reste pour l'instant inconnu.

e. PRMT6

La protéine PRMT6 a été identifiée lors de la recherche de nouvelles PRMT lorsque le génome humain a été séquencé et assemblé [96]. Elle se distingue des autres PRMT par l'absence d'introns au sein de son gène. PRMT6 est retrouvée principalement dans le noyau cellulaire, et est impliquée dans les mécanismes liés à l'ADN. Il est intéressant de noter qu'elle est à la fois impliquée dans l'activation ainsi que dans la répression de la transcription. En

effet, il a été montré que PRMT6 est responsable de la méthylation de l'arginine 2 de l'histone H3 (H3R2), qui est une marque de l'activation de la transcription [97, 98], mais également l'arginine 29 de l'histone H2A (H2AR29), qui est une marque de la répression de la transcription [99]. En plus d'être impliquée dans la régulation de la transcription, PRMT6 est également impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN, capable de stimuler l'ADN polymérase β (Pol β) en la méthylant aux arginines 83 et 152 [100], mais également dans l'immunité contre l'infection du virus d'immunodéficience humaine 1 (HIV1), puisqu'il a été montré que PRMT6 méthyle les protéines virales Tat, Rev, ainsi que la protéine de la nucléocapside, limitant ainsi la production et la réplication virale [101-103].

f. PRMT8

La protéine PRMT8 a été identifiée dans le génome humain en 2005, par homologie aux autres PRMT [104]. Elle est particulièrement proche de PRMT1, mais diffère par son domaine amino-terminal, qui contient un motif de myristoylation. Lorsque la glycine à l'extrémité amino-terminale de PRMT8 est associée à un acide myristique, PRMT8 est incorporée à la membrane plasmique [104]. Ceci est une caractéristique unique au sein des PRMT. De même que l'expression tissu-spécifique de PRMT8, qui est principalement retrouvée dans le cerveau [104]. L'extrémité amino-terminale de PRMT8 semble réguler son activité, et contient un site de reconnaissance par les protéines SH3 [105]. À l'heure actuelle, le seul substrat connu de la protéine PRMT8 est la proto-oncoprotéine EWS (« Ewing sarcoma protein »), responsable du sarcome d'Ewing.

g. PRMT10

La protéine PRMT10 a été mise en évidence en 2007 chez le chou-fleur lors de la recherche de protéines méthylant spécifiquement l'histone H4 [106]. La particularité de cette PRMT est qu'elle n'est retrouvée que chez les plantes, d'où le nom qui lui a été initialement donné, PHRMT10, pour « Plant Histone arginine MethylTransferase 10 ». PRMT10 a ensuite été étudiée chez *Arabidopsis thaliana*, où il a été montré qu'elle méthyle l'arginine 3 de l'histone H4, et participe au mécanisme de floraison des plantes, via la régulation de l'expression du locus de floraison C (FLC).

3. PRMT DE TYPE II, III ET IV

a. PRMT5

La protéine PRMT5 est l'une des PRMT les plus conservées et les plus largement exprimées chez les eucaryotes pluricellulaires [53, 72]. Elle a été identifiée par crible double-hybride comme protéine interagissant avec la tyrosine kinase Jak2 (« JAnus Kinase 2 »), d'où le

nom qui lui a initialement été donné : « JAk Binding Protein 1 » (JABP1) [107]. Sa caractérisation en tant que PRMT a été faite grâce à son homologie de séquence avec la protéine Hsl7 de *Saccharomyces cerevisiae*, et c'est la première PRMT de type II à avoir été mise en évidence [108]. PRMT5 est principalement présente dans le cytoplasme, mais elle est également retrouvée dans le noyau [109]. Elle est capable de méthyle une grande variété de substrats, ceux-ci présentant généralement des motifs GAR.

PRMT5 fait partie d'un complexe appelé méthylosome, dans lequel elle est associée à la protéine MEP50 (« MEthylosome Protein 50 ») qui régule son activité méthyltransférase [110]. Dans les cas du néoplasme myéloprolifératif, cette interaction est inhibée par phosphorylation du domaine amino-terminal de PRMT5 par la protéine Jak2 mutante [111]. À la particule cœur formée par PRMT5 et MEP50 vient s'associer une 3^e protéine, dont le rôle est de moduler la spécificité de substrat de PRMT5. Deux partenaires différents ont été mis en évidence à ce jour : pICln (« Protein Inducing ChLoride Nucleotide-sensitive current ») et RioK1 (« RIO Kinase 1 »). De son côté, la protéine pICln recrute les protéines SmD1 et SmD3, impliquées dans l'épissage des ARNm, et les apportent au méthylosome où elles peuvent être méthylées par PRMT5 [112]. Une fois méthylées, ces protéines sont reconnues par la protéine SMN (« Survival Motor Neuron »), qui facilite l'assemblage de 7 protéines Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F et G) en anneau autour de 4 ARNsn (pour « Small Nuclear »), de manière à former la particule ribonucléoprotéique (RNPs) centrale du spliceosome [113, 114]. Par contre, la protéine RioK1 recrute elle la nucléoline, impliquée dans la synthèse et la maturation des ribosomes, pour qu'elle soit méthylée par PRMT5 [115]. Cette modification module son interaction avec l'ARN et influe sur la biogenèse du ribosome [116].

PRMT5 a également été retrouvée associée à MEP50 dans le cadre de la méthylation des histones libres au cours des étapes du développement précoce. En effet, à ce stade, la chromatine embryonnaire pluripotente est établie, et les histones sont synthétisées pêle-mêle et associées à des protéines chaperonnes, comme la nucléoplasmine, en attente d'être déposés sur la chromatine. Il a été montré qu'un motif GAR de la nucléoplasmine est méthylé par PRMT5, cette modification permettant à la nucléoplasmine de stimuler la méthylation de l'arginine 3 des histones H2A et H4 (H2AR3 et H4R3) [117]. La méthylation de H4R3 avait déjà été mise en évidence auparavant dans différentes études [118-120]. Dans le noyau, PRMT5 est associée à la protéine COPR5 (« COoperator of PRMT5 ») qui la mobilise au niveau de gènes cibles, et module son activité envers l'arginine 3 de l'histone H4 appartenant au nucléosome [121]. La diméthylation symétrique de H4R3 est une marque répressive, reconnue par l'ADN-méthyltransférase DNMT3A, via son motif PHD (« Plant Homeo Domain »), qui peut à son tour méthyle l'ADN environnant afin de contrôler la structure de la chromatine [122].

Appuyant le rôle de répresseur de PRMT5 dans le contexte de la transcription, tout comme PRMT1, PRMT5 est capable de méthyler la protéine SPT5, impliquant ainsi PRMT5 dans la répression de l'élongation de la transcription. [60]. Cependant, PRMT5 participe parfois à l'activation de la transcription, comme lorsqu'elle méthyle la protéine MBD2 (« Methyl-DNA-Binding Domain protein 2 ») ou encore HOXA9 (« HOmeoboX A9 »). La protéine MBD2 reconnaît l'ADN méthylé et recrute des histones déacétylases (HDAC) ainsi que d'autres facteurs de répression de la transcription sur la chromatine. La méthylation par PRMT5 des motifs GAR situés à l'extrémité amino-terminale de MBD2 a pour effet de diminuer la fixation de l'ADN méthylé, ainsi que les HDAC, et compromet ainsi son rôle de répresseur [123]. La protéine HOXA9 est un facteur de transcription important pour l'induction de la sélectine E dans le contexte de la réponse inflammatoire. La méthylation de l'arginine 140 de HOXA9 par PRMT5, dépendante du facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), est essentielle à cette fonction, et PRMT5 a donc un rôle critique dans la coactivation de la transcription par le complexe HOXA9 [124].

PRMT5 possède également d'autres substrats dans des contextes cellulaires différents, comme les protéines PIWI (« P-element Induced Wimpy testis ») [125]. Dans les cellules germinales, les protéines PIWI interagissent avec une classe spécifique d'ARN non-codants, les ARNpi (pour « PWI-Interacting »). Ensemble, ils ouvrent une voie permettant l'inactivation des éléments transposables et sécurisant ainsi le génome des cellules germinales. La méthylation des protéines PIWI permet le recrutement d'une protéine à domaine Tudor (chez la souris, la protéine TDRD1, pour « TuDoR Domain containing protein 1 »), dont le rôle est de contrôler la conformité des ARNpi s'associant aux protéines PIWI [126, 127]. Parmi les substrats de PRMT5, il faut aussi compter la protéine ribosomale S10 (RPS10), dont la méthylation est nécessaire à l'assemblage du ribosome, et la protéine de Golgi GM130, dont la méthylation est critique pour la structuration de l'appareil de Golgi. Une telle implication de PRMT5 dans tant de mécanismes explique sa conservation au cours de l'évolution.

b. PRMT7

La protéine PRMT7 a été mise en évidence en 2003 lors d'une étude visant à identifier les gènes contrôlant la réponse aux agents cytotoxiques [128]. Il y a toujours une polémique quant au type de PRMT auquel PRMT7 appartient : certaines données soutiennent le fait que ce serait une PRMT de type II, catalysant la formation de diméthylarginine symétrique [128], alors que d'autres données sont en faveur du fait que PRMT7 serait une PRMT de type III, ne permettant que la catalyse d'arginine monométhylée [129, 130]. La nature de PRMT7 reste donc à être confirmée. L'autre caractéristique de PRMT7 est qu'elle semble provenir d'une duplication de gène, puisqu'elle possède 2 domaines catalytiques potentiels. Pris séparément,

ces deux domaines seraient inactifs, et semblent donc tous deux nécessaires à l'activité catalytique [129].

PRMT7 semblerait fonctionner de manière complémentaire à PRMT5. En effet, il a été montré que, comme PRMT5, PRMT7 méthyle certaines protéines Sm, mais ce, de façon non-redondante [131, 132]. Tout comme PRMT5, PRMT7 est capable de diméthyle l'arginine 3 de l'histone H4 (H4R3), et ainsi de réprimer l'expression de gènes cibles [133, 134]. La méthylation de H4R3 par PRMT7 a été observée au niveau des cellules germinales, ainsi que des cellules embryonnaires, montrant que PRMT7 est impliquée dans la transmission du patrimoine épigénétique, ainsi que dans le maintien de la pluripotence des cellules [134, 135]. Dès sa découverte, l'implication de PRMT7 dans la cytotoxicité a été reconnue [128, 136, 137], et plus récemment il a été montré que PRMT7 était responsable de la méthylation de H4R3 au niveau de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, induisant ainsi leur répression [138]. Tout comme PRMT5, PRMT7 méthyle également l'arginine 2 de l'histone H3 (H3R2), marque de l'activation de la transcription [139]. PRMT7 est également capable de méthyle le facteur d'élongation de la traduction eucaryotique eEF2, et ce mécanisme serait réguler par coordination avec PRMT5 et la protéine bFGF (« Basic Fibroblast Growth Factor ») [140].

c. Rmt2

La protéine Rmt2 est la seule PRMT de type IV identifiée à ce jour. Elle a d'abord été mise en évidence chez la levure [141], et semblerait exister uniquement chez les champignons et les plantes [142]. Rmt2 catalyse la δ -N-monométhylation d'arginines situées dans des chaînes polypeptidiques naissantes, et tous les substrats de Rmt2 existeraient donc dans les cellules comme des espèces entièrement méthylées. Il est intéressant de noter que Rmt2 possède une identité de séquence de 27% avec la guanidinoacétate N-méthyltransférase (GAMT) de mammifère au niveau d'une région de 138 acides aminés [141]. La protéine GAMT est responsable de la méthylation de l'azote δ des petites molécules de guanidinoacétate, ou glycoyamine, métabolite de nombreux acides aminés, dont l'arginine. Il semblerait donc que la fonction portée par Rmt2 chez les champignons et les plantes soit compensée par celle de GAMT chez les animaux.

Au niveau de la cellule, Rmt2 est située à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau [143]. Dans le cytoplasme, il a été montré que Rmt2 méthyle l'arginine 67 de la protéine ribosomale L12, impliquant ainsi Rmt2 dans la biogenèse du ribosome [144]. Dans le noyau, Rmt2 est associée à des nucléoporines (Nup49, Nup57 et Nup100), mêlant Rmt2 à la formation des pores nucléaires [143].

4. PRMT NON-CLASSÉES

a. PRMT9

La protéine PRMT9 a été identifiée au locus 4q31 du génome humain, grâce à son homologie aux PRMT, en même temps que PRMT8 [104]. Comme PRMT7, PRMT9 possède deux domaines catalytiques potentiels, le second paraissant inactif. En effet, au sein du 2^e domaine catalytique, les résidus formant le site actif ainsi que le site de fixation de la SAM sont très peu conservés, et les résidus de l'extrémité carboxy-terminale du 2^e tonneau β manquent [145]. PRMT9 possède également un domaine amino-terminal additionnel de 141 acides aminés, comportant 2 répétitions tétratricopeptide (TPR), motif généralement impliqué dans des interactions protéine-protéine [146, 147]. Aucune activité catalytique n'a pour le moment été détectée [145], mais il semblerait pourtant que PRMT9 soit relativement bien exprimée [104].

b. FBXO11

La protéine FBXO11 a été caractérisée comme membre potentiel de la famille des PRMT par analyse de séquence à partir du motif II des PRMT (GxGxG) [148]. À l'issue de cette découverte, elle fut nommée PRMT9, mais pour éviter toute confusion avec la protéine PRMT9 décrite précédemment, son nom initial FBXO11 (« F-Box Only protein 11 ») sera utilisé dans ce manuscrit. FBXO11 est retrouvée à la fois dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau, et serait capable de méthylater symétriquement les histones H2A, H4 [148]. Contrairement à PRMT5 et à PRMT7, la méthylation par FBXO11 ne semble pas efficace au niveau des motifs GAR, ce qui ferait d'elle un nouveau genre de PRMT de type II [148].

Quatre variants d'épissage ont été décrits pour FBXO11. Le plus long, l'isoforme 1, comprend 843 acides aminés, avec un domaine F-box à son extrémité amino-terminale, un domaine central composé de 8 répétitions en tandem d'environ 45 acides aminés où se situe le motif GxGxG, et un doigt de zinc à son extrémité carboxy-terminale [145, 148]. Les protéines F-box s'associent à SKP1 (« S-phase Kinase-associated Protein 1 ») ainsi qu'au complexe ubiquitine ligase, lui permettant ainsi de recruter des protéines substrats spécifiques [149]. Le doigt de zinc de la protéine FBXO11 pourrait servir de médiateur dans les interactions protéine-protéine nécessaires à ce recrutement, impliquant ainsi FBXO11 dans la régulation de la dégradation protéique par le complexe d'ubiquitination.

FBXO11 est unique parmi les PRMT, puisque sa séquence ne ressemble pas à celle des autres membres de la famille. Malgré cette faible homologie, FBXO11 aurait acquis des motifs ainsi qu'une activité caractéristique des PRMT, suggérant un événement d'évolution

convergente [148]. Mais cette activité doit encore être confirmée, puisque d'autres études ont montré l'absence d'activité arginine méthyltransférase chez FBXO11 *in vitro* [150].

c. FBXO10

La protéine FBXO10 a été identifiée lors de la recherche d'homologues de la protéine FBXO11 [145, 148]. FBXO10 est une protéine de 962 acides aminés, possédant un motif F-box à son extrémité amino-terminale, un domaine central composé de 8 répétitions en tandem d'environ 45 acides aminés avec un motif GxGxG, et une extrémité carboxy-terminale de 100 acides aminés sans homologie avec aucune protéine connue [145]. Peu d'études ont été réalisées sur cette protéine, et l'existence d'une activité arginine méthyltransférase doit encore être déterminée.

5. STRUCTURES DES PRMT

À l'heure actuelle, cinq structures de PRMT ont été résolues : celles de PRMT1 [151], PRMT3 [152], CARM1 (qui fut résolue par l'équipe) [153, 154], PRMT5 [155, 156] et PRMT10 [157]. Chacune de ces structures met bien en évidence le domaine conservé des PRMT portant l'activité arginine méthyltransférase.

a. Structure de la protéine CARM1

CARM1 est une protéine de 608 acides aminés (chez l'Homme et la souris), organisée en 3 domaines distincts (Figure 9) : un domaine catalytique central (résidus 130 à 497 chez la souris), entourée par deux domaines additionnels à ses extrémités amino- et carboxy-terminales. Les 4 motifs caractéristiques des PRMT impliqués dans la formation du site catalytique sont retrouvés au niveau du domaine central : le motif I YFxxY, le motif II DVGxGxG, le motif III SExMGxxLxxExM, et enfin le motif IV situé dans le tonneau β THWxQ (Figure 9).

La structure du domaine catalytique a été résolue en présence et en absence de cofacteur à partir de la construction 140-480 de la protéine de souris (mCARM1₁₄₀₋₄₈₀). Le domaine catalytique de CARM1 est composé de 2 structures distinctes : un repliement de type Rossmann fold du côté amino-terminal, et un tonneau β du côté carboxy-terminal (Figure 10A). Ces deux domaines sont connectés par un résidu *cis*-proline conservé (P288). Le repliement de type Rossmann fold est classique des domaines de fixations de nucléotides [158], et correspond à la région du domaine catalytique responsable de la fixation du cofacteur SAM. Deux hélices α amino-terminales y sont associées : l'hélice α X et l'hélice α Y (Figure 10A). Un bras de quatre hélices α est quant à lui ajouté au repliement de type tonneau β , et a été caractérisé comme étant impliqué dans la dimérisation des PRMT (Figure 10B). Le domaine

catalytique est retrouvé sous forme de dimère, stabilisé par des interactions entre le bras de dimérisation d'un monomère, et les hélices αY , αZ , αA et αB au niveau du repliement de type Rossmann fold de l'autre (Figure 10B). Ces interactions induisent une possible communication entre l'interface de dimérisation et le site actif.

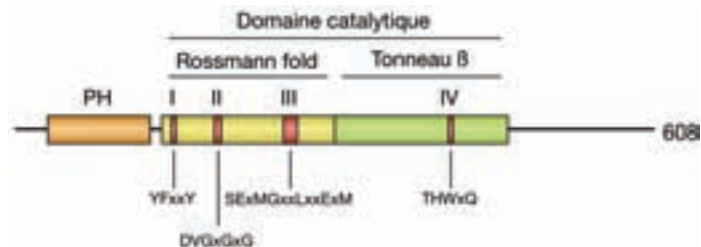


Figure 9 - Représentation schématique de l'organisation structurale de la protéine CARM1 (de souris)
 La protéine CARM1 est divisée en 3 domaines : (i) un domaine amino-terminal adoptant un repliement de type « Plextrin homology » (PH) (en orange), (ii) un domaine catalytique central (en jaune et vert) portant les 4 motifs caractéristiques des PRMT (en rouge), (iii) un domaine carboxy-terminal de fonction inconnue (en bleu).

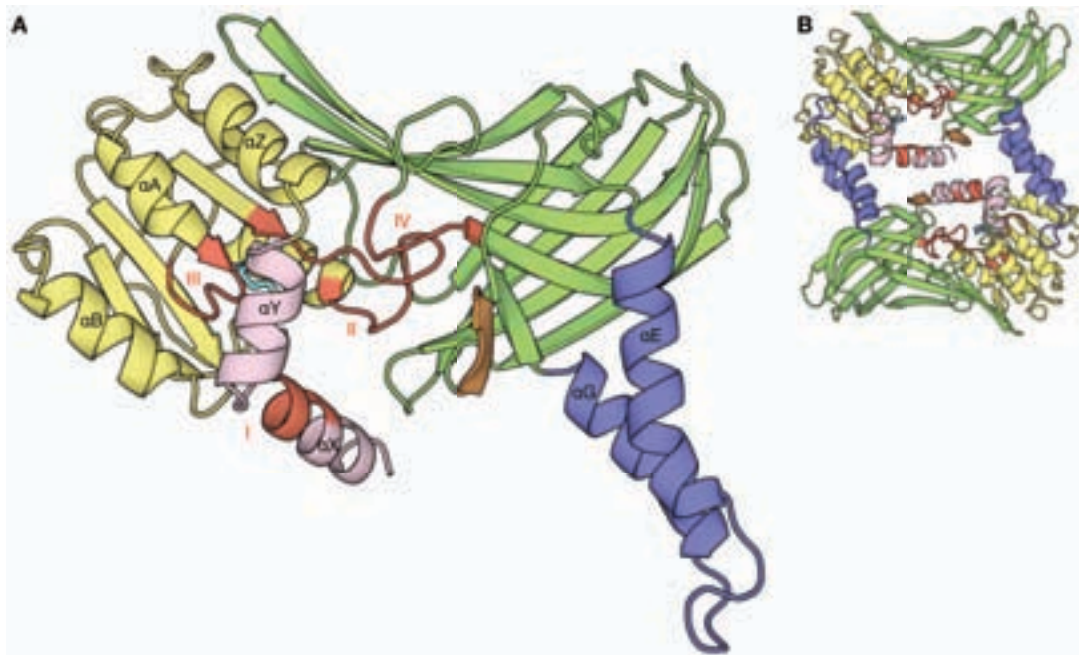


Figure 10 - Structure du domaine catalytique de la protéine CARM1 de souris (PDB : 3B3F) [153]
 (A) Le domaine catalytique de CARM1 de souris est divisé en 4 régions : (i) un repliement de type Rossmann fold (résidus 166 à 287) (en jaune) constitué de 4 hélices α (αA , αB , αD , αZ et $\alpha Z'$) et de 5 brins β ($\beta 1$ à $\beta 5$), (ii) un repliement en tonneau β (résidus 290 à 299, et 339 à 478) (en vert) composé de 11 brins β ($\beta 6$ à $\beta 16$) et de 6 hélices α (αE , αF , αG , $\alpha G'$, αH et αI), (iii) 2 hélices αX (résidus 144 à 154) et αY (résidus 157 à 164) (en rose) associées à l'extrémité aminotermine du repliement de type Rossmann fold, (iv) un bras de dimérisation (résidus 300 à 338) (en bleu) greffé sur le tonneau β . Les 4 motifs caractéristiques des PRMT (en rouge) sont répartis entre les deux régions principales du domaine catalytique. Le brin $\beta 16$ du tonneau β (en orange) est spécifique de CARM1 et n'est pas retrouvé chez les autres PRMT.
 (B) Les interactions entre le bras de dimérisation du 1^{er} monomère et les hélices αY , αZ , αA et αB du 2^e monomère mettent en évidence une voie de communication potentielle permettant la transmission de modifications du site actif (délimité par les hélices αX et αY d'un côté, l'hélice αZ et la boucle du motif IV sur le dessus, et par le brin $\beta 16$ de l'autre côté) à l'interface du dimère.

Les études fonctionnelles menées sur CARM1 pendant la thèse de Pierre Hassenboehler [159] ont montré que les extrémités du domaine catalytique sont cruciales pour

avoir une activité de méthylation maximale. La conception et la résolution de la structure de deux nouvelles constructions ont permis d'identifier de nouvelles zones ordonnées structuralement. La résolution de la structure de la construction 130-490 de la protéine de souris (mCARM1₁₃₀₋₄₉₀) a permis de mettre en évidence une hélice α supplémentaire ($\alpha X'$) à l'extrémité amino-terminale du domaine catalytique, refermant le site actif (Figure 11A). Cette hélice α supplémentaire a également été montrée par Sack et collaborateurs [160]. Du côté carboxy-terminal, la résolution de la structure de la construction 130-507 de la protéine de souris (mCARM1₁₃₀₋₅₀₇) a permis de mettre en évidence la structuration des résidus 478 à 497. Alors que les résidus 478 à 485 sont repliés sur le tonneau β , les résidus 486 à 497 eux s'éloignent du domaine catalytique et vont interagir avec un monomère du dimère voisin dans le cristal (Figure 11B).

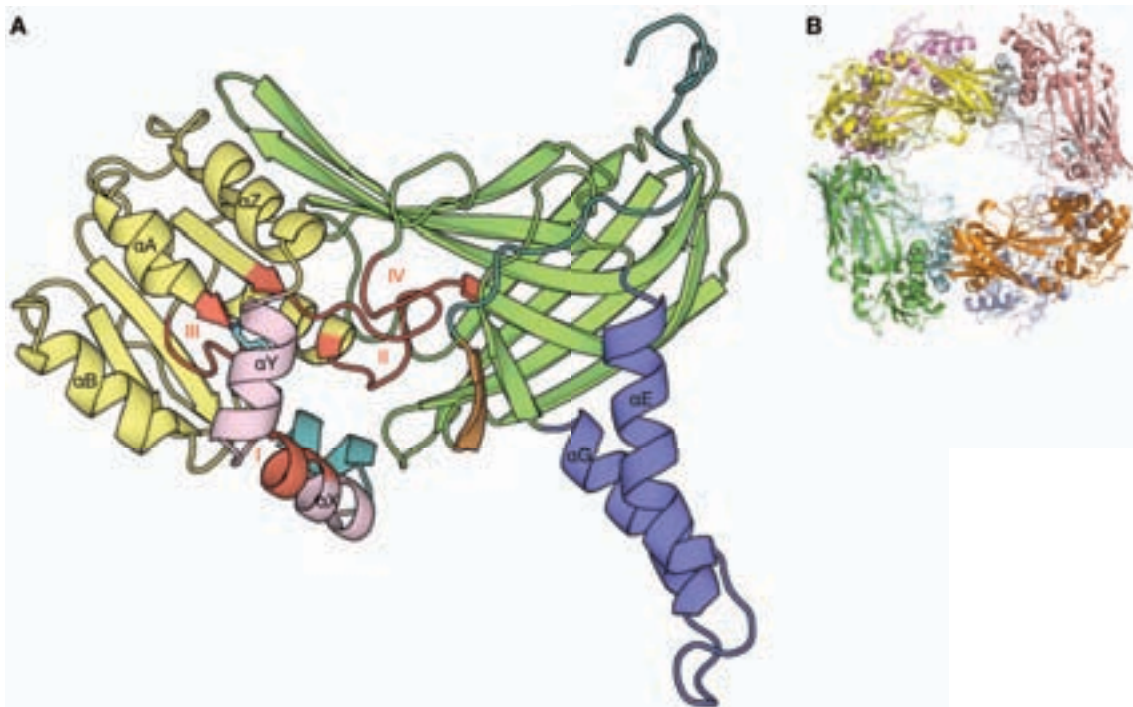


Figure 11 - Modèle « chimère » du domaine catalytique étendu de la protéine CARM1 de souris

Le modèle « chimère » du domaine catalytique de la protéine CARM1 de souris a été obtenu par combinaison de deux structures précédemment obtenues à partir des constructions mCARM1₁₃₀₋₄₉₀ et mCARM1₁₃₀₋₅₀₇.

(A) Mise en évidence des nouvelles zones ordonnées structuralement (en bleu-gris) au niveau du monomère.

(B) Mise en évidence de l'interaction entre l'extension carboxy-terminale du domaine catalytique avec un monomère du dimère voisin au sein de l'octamère observé dans le cristal.

Dans le domaine catalytique, le cofacteur est enfoui dans une poche formée par l'extrémité carboxy-terminale des brins $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 4$ du repliement de type Rossmann fold, et les hélices αX et αY de l'extrémité amino-terminale du domaine catalytique (Figure 12A). Le cofacteur est entouré des 4 motifs caractéristiques des PRMT et les résidus impliqués peuvent être classés en fonction de la partie du cofacteur avec laquelle ils interagissent : (i) la partie

méthionine, (ii) la partie ribose, (iii) la partie adénine (Figure 12B). Le cofacteur est maintenu enfoui par 3 des 4 cycles aromatiques du motif I.

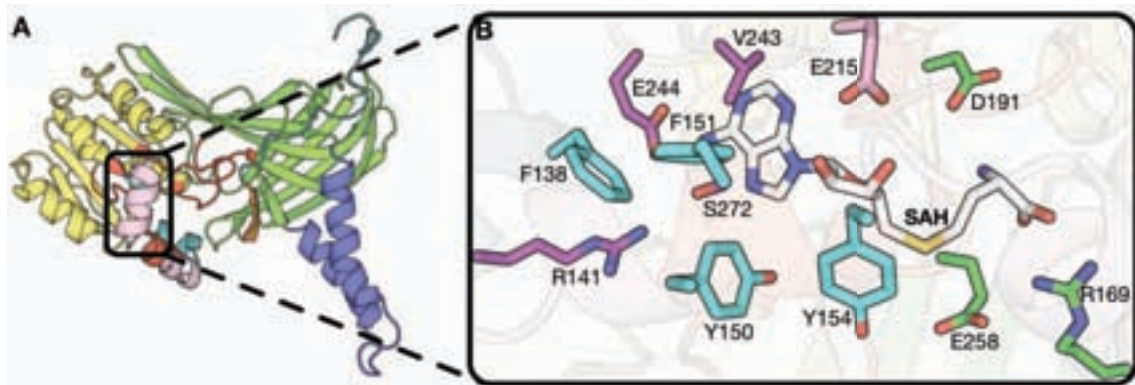


Figure 12 - Structure du site de fixation du SAH de la protéine CARM1 de souris

(A) Le site de fixation du SAH de la protéine CARM1 de souris est formé par l'extrémité carboxy-terminale des brins $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 4$ du repliement de type Rossmann fold, et les hélices αX et αY de l'extrémité amino-terminale du domaine catalytique.

(B) Différents résidus participent à la stabilisation des 3 parties du SAH (en blanc) : (i) les résidus R169, E258, G193 et D191 (en vert) interagissent avec la partie méthionine, (ii) le résidu E215 (en rose) interagit avec la partie ribose, (iii) les résidus R141, E244, S272 et V243 (en violet) interagissent avec la partie adénine. Le SAH est également fermement maintenu enfoui par un certain nombre de résidus hydrophobes (en cyan) : F138, Y150, F151, Y154.

En absence de cofacteur, les résidus 144 à 154 de l'hélice αX n'apparaissent pas dans la carte de densité électronique, indiquant que ceux-ci sont probablement désordonnés. La fixation du cofacteur induit une transition désordre-ordre, permettant le repliement de l'hélice αX et la formation du site catalytique. D'autres changements structuraux sont aussi induits par la fixation du cofacteur : le changement de conformation de certains résidus du motif II (G195 et S196) et de la boucle entre les hélices αF et $\alpha G'$ du bras de dimérisation, ainsi que le réarrangement des chaînes latérales de résidus impliqués dans la reconnaissance de la partie méthionine du cofacteur (R169, E258, Q160 et M269).

La structure du domaine amino-terminal de CARM1 a été résolue à partir de la construction 28-140 de la protéine de souris (mCARM1₂₈₋₁₄₀) [153]. Ce domaine est très similaire à la famille de domaine EVH1 (« *Drosophila-Enabled/Vasodilator-stimulated phosphoprotein Homology 1* »), qui appartient à la superfamille de repliements de type « *Plextrin Homology domain* » (PH). Ce repliement est caractérisé par la formation d'un tonneau β ouvert par deux feuillets β antiparallèles perpendiculaires, et recouvert par une hélice α amphipatique à l'extrémité carboxy-terminale (Figure 13A). Ces domaines sont impliqués dans des interactions protéine-protéine, se liant spécifiquement à des séquences riches en résidus proline avec une faible affinité mais une grande spécificité [161]. Il n'est pas surprenant de retrouver un tel domaine chez CARM1, puisqu'il a été montré que CARM1 interagit avec un ensemble de protéines, et qu'elle est impliquée dans de nombreux complexes protéiques contrôlant l'expression des gènes. Cependant, dans la structure, ce

domaine est retrouvé sous forme dimérique (Figure 13B). Si le dimère formé par le domaine amino-terminal de CARM1 n'est pas biologiquement significatif, alors il se peut qu'il interagisse avec un partenaire qui, à l'heure actuelle, n'est pas connu. La résolution de la structure de la construction 28-507 de la protéine de souris (mCARM1₂₈₋₅₀₇) comprenant les deux domaines amino-terminal et catalytique, n'a permis de visualiser que le domaine catalytique, montrant que ces deux domaines sont connectés par un lien flexible et agissent indépendamment. Cependant, ils coopèrent peut-être lors de la fixation de protéines, comme lors de la coactivation de la transcription.

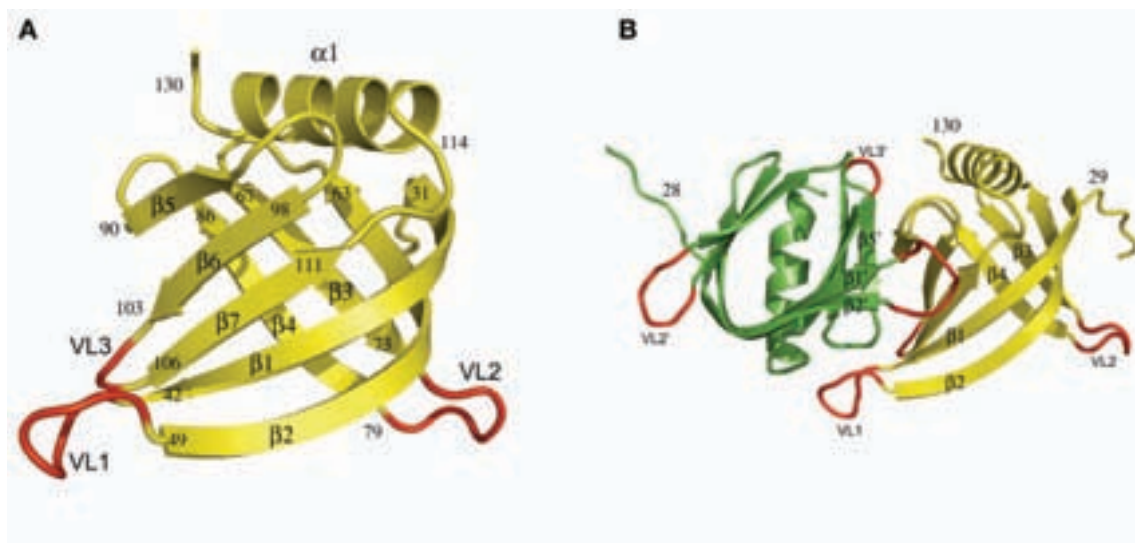


Figure 13 - Structure du domaine amino-terminal de la protéine CARM1 de souris

(A) Le domaine amino-terminal de la protéine CARM1 de souris adopte un repliement en sandwich β comprenant 2 feuillets β orthogonaux formés par 7 brins β antiparallèles ($\beta 1$ à $\beta 7$), recouvert par une hélice α amphipatique ($\alpha 1$, résidus 115 à 128) à l'extrémité carboxy-terminale. Le premier feuillet β est composé des brins $\beta 1$ (résidus 31 à 42), $\beta 2$ (résidus 46 à 63), $\beta 3$ (résidus 67 à 73) et $\beta 4$ (79 à 86), tandis que le deuxième feuillet β est composé des brins $\beta 5$ (résidus 90 à 94), $\beta 6$ (résidus 98 à 103) et $\beta 7$ (résidus 106 à 111). Les brins $\beta 1$ et $\beta 2$ sont à cheval sur les deux feuillets, ce qui donne une allure de tonneau ouvert à la structure.

(B) Dans la structure, le domaine amino-terminal de la protéine CARM1 de souris est retrouvé sous forme dimérique, dont l'interface est formé par les brins $\beta 5$ à $\beta 7$ du deuxième feuillet β .

Concernant le domaine carboxy-terminal de CARM1, les analyses de séquences et le fait que celui-ci soit sujet à la protéolyse conforte l'idée qu'il est principalement désordonné sous sa forme libre. Une transition désordre-ordre doit sans doute avoir lieu lors de la fixation de partenaires.

b. Comparaison avec d'autres structures de PRMT connues

De manière générale, le domaine catalytique central des PRMT est très bien conservé en séquence [145, 162], et il n'est donc pas surprenant que leurs structures soient très similaires. Cependant, à ce domaine catalytique central s'ajoutent éventuellement des domaines additionnels aux extrémités amino- et carboxy-terminales (Figure 6), souvent impliqués dans la fonction spécifique et responsables de la spécificité de substrat de la PRMT

concernée. Par exemple, PRMT3 possède un doigt de zinc dans son domaine amino-terminal nécessaire à la reconnaissance de cibles associées à l'ARN [163], et le domaine PH de CARM1 est très certainement impliqué dans des interactions avec des partenaires protéiques.

Le domaine catalytique de CARM1 diffère des autres structures de PRMT connues en 3 points : (i) son extrémité amino-terminale, (ii) son extrémité carboxy-terminale, (iii) son bras de dimérisation. En effet, il y a une transition désordre-ordre de l'extrémité amino-terminale du domaine catalytique de CARM1 lors de la fixation du cofacteur qui n'a pas été observée pour les autres PRMT. Concernant l'extrémité carboxy-terminale, le brin β 16 du tonneau β est spécifique à la protéine CARM1 et n'est retrouvée chez aucune autre PRMT.

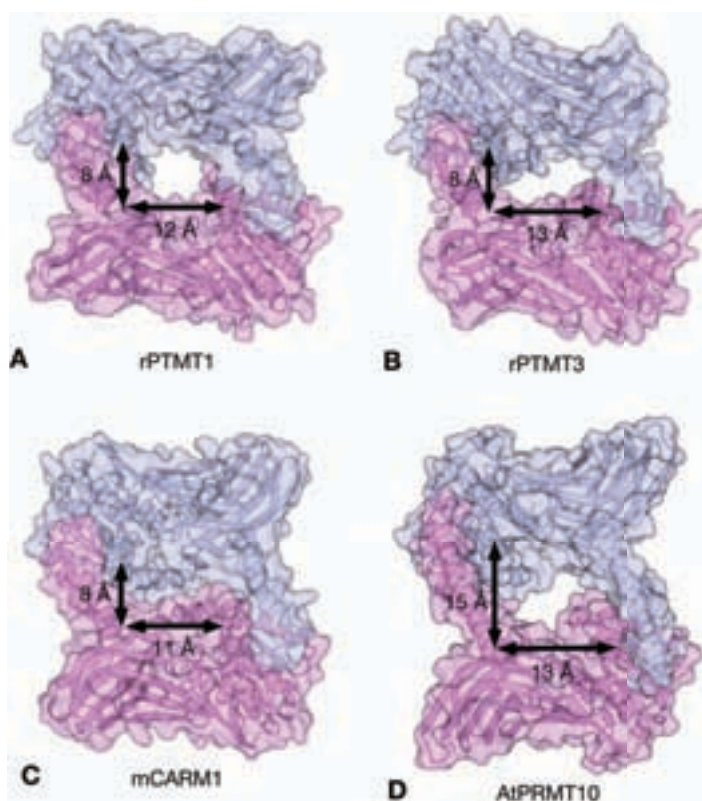


Figure 14 - Comparaison des différents dimères de PRMT connus

Pour chaque PRMT, le dimère correspondant à l'association de 2 domaines catalytiques (le premier en bleu clair et le second en rose) est représenté.

(A) Organisation générale du dimère de la protéine PRMT1 de rat, reconstitué par symétrie. Figure issue de la structure 1ORI (PDB).

(B) Organisation générale du dimère de la protéine PRMT3 de rat, reconstitué par symétrie. Figure issue de la structure 1F3L (PDB).

(C) Organisation générale du dimère de la protéine CARM1 de souris, retrouvé dans l'unité asymétrique. Figure issue de la structure 3B3F (PDB).

(D) Organisation générale du dimère de la protéine PRMT10 d'*A. thaliana*, retrouvé dans l'unité asymétrique. Figure issue de la structure 3R0Q (PDB).

La dimérisation est une caractéristique conservée des PRMT. Il a été montré qu'elle est essentielle à l'activité de méthylation des PRMT, puisqu'elle faciliterait la fixation du SAH [151, 152, 157]. Un point de variabilité important du domaine catalytique des PRMT se situe au

niveau de leur bras de dimérisation. En effet, la longueur du bras de dimérisation et la taille de la boucle au bout de ce bras varient d'une PRMT à l'autre. Par exemple, chez la protéine PRMT10 d'*Arabidopsis thaliana* (AtPRMT10), il est très long (41 Å), alors qu'il est beaucoup plus court chez les autres PRMT dont la structure est connue : 22 Å pour PRMT1 et PRMT3 de rat (respectivement rPRMT1 et rPRMT3), 34 Å pour CARM1 de souris (mCARM1) (Figure 14) [157]. La taille de la boucle au bout du bras de dimérisation varie également, ce qui influe sur la taille de la cavité entre les deux monomères. Par exemple, la cavité d'AtPRMT10 (15 Å x 13 Å) est significativement plus grande que celle des autres PRMT : 8 Å x 12 Å pour rPRMT1, 8 Å x 13 Å pour rPRMT3 et 8 Å x 11 Å pour mCARM1 (Figure 14). Malgré un bras de dimérisation plus long, mCARM1 possède une cavité de taille comparable à rPRMT1 et rPRMT3 puisque la boucle terminale de son bras comporte une dizaine de résidus en plus. L'orientation relative des deux monomères au sein du dimère et la taille de la cavité centrale influent sur l'accessibilité du substrat au site actif des PRMT. mCARM1 possède donc un site beaucoup moins accessible que rPRMT3 et rPRMT1, et encore moins que AtPRMT10 (Figure 14) [157].

c. Comparaison avec d'autres structures de méthyltransférases connues

La méthylation est une réaction au centre de la biochimie cellulaire. Bien que plusieurs classes de méthyltransférases soient connues, la majorité des réactions de méthylation est catalysée par des enzymes utilisant le SAM comme molécule donneuse de méthyle. Le groupement méthyle du SAM est lié à un atome de soufre chargé, qui déstabilise thermodynamiquement la molécule et rend le groupement méthylthiol de la partie méthionine très actif envers les nucléophiles polarisables, comme les atomes d'azote, d'oxygène et de soufre, mais aussi envers les atomes de carbone activés, comme les carbanions. Les méthyltransférases SAM-dépendantes (SAM-MT) agissent sur une grande variété de molécules cibles, comme l'ADN, ARN, les protéines, les poly-saccharides, les lipides, et des petites molécules. À l'heure actuelle, plus de 300 membres de la famille des SAM-MT ont pu être identifiés et classés en fonction de leur spécificité de substrat et de l'atome ciblé pour la méthylation [164, 165].

À ce jour, 5 classes (I à V) de SAM-MT caractérisées par des repliements structuraux spécifiques ont été identifiées, bien que la majorité des SAM-MT connues soient des SAM-MT de classe I [166]. Les SAM-MT de classe I sont organisées autour d'un module central de type Rossmann fold. En plus de cette structure centrale, la plupart des SAM-MT possèdent des domaines additionnels participant à la reconnaissance du substrat ou à une fonction séparée spécifique de l'enzyme [164]. Le module central des SAM-MT est formé d'un feuillet β mixte à 7 brins ($\beta 3 \uparrow \beta 2 \uparrow \beta 1 \uparrow \beta 4 \uparrow \beta 5 \uparrow \beta 7 \downarrow \beta 6 \uparrow$) bordé par 3 hélices α d'un côté (αZ , αA et αB), et 3 hélices α de l'autre (αC , αD et αE) (Figure 15). Ce module peut-être séparé en 2 régions de fonctions distinctes : la région de fixation du cofacteur SAM, et la région de reconnaissance du

substrat. Le SAM est reconnu par la partie amino-terminale du feuillet β , plus particulièrement par les résidus des boucles suivant les brins β_1 , β_2 et β_3 (Figure 15). La région de fixation du substrat, qui est responsable de la sélectivité des différentes SAM-MT, est située dans la partie carboxy-terminale du feuillet β (Figure 15).

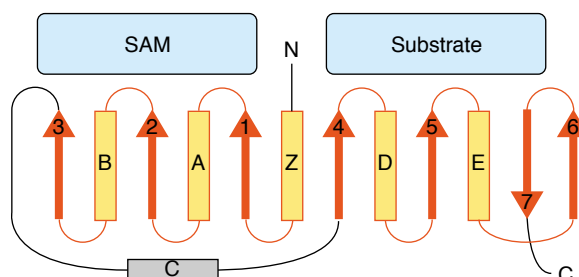


Figure 15 - Organisation structurale des méthyltransférases SAM-dépendantes de classe I
Figure tirée de Martin et McMillan 2002 [165].

Ce module central peut cependant varier d'une sous-classe de SAM-MT à une autre. En effet, certaines modifications sont particulières d'un type de SAM-MT. Par exemple, les SAM-MT ciblant des protéines, dont les PRMT, ne possèdent pas d'hélice α C et sont caractérisées par des extensions à l'extrémité amino-terminales, comme les hélices α X et α Y qui sont retrouvées chez les PRMT [152, 165]. En plus de ces modifications de l'extrémité amino-terminale du module central, les SAM-MT ciblant les protéines possèdent également des modifications au niveau de l'extrémité carboxy-terminale, probablement nécessaires à leur spécificité de substrat. Par exemple, les PRMT sont dépourvues de l'épingle à cheveux formée par les 2 brins antiparallèles β_6 et β_7 [152].

Bien que le SAM soit fixé par les SAM-MT à partir de la même région du repliement, les résidus impliqués dans la liaison du cofacteur ne sont pas conservés, et la chimie de l'interaction SAM-enzyme varie énormément [165]. Seuls quelques résidus sont conservés d'une sous-famille de SAM-MT à l'autre, mais d'autres conservations peuvent être retrouvées spécifiquement au sein d'une même sous-famille. De manière générale, les seuls résidus conservés chez les SAM-MT sont retrouvés au niveau d'une séquence riche en résidus glycine E/DxGxGxG, appelée motif I, située entre le brin β_1 et l'hélice α A interagissant avec la partie méthionine du SAM (correspondant au motif II des PRMT), ainsi qu'une boucle acide entre le brin β_2 et l'hélice α B appelée motif II qui interagit avec les groupements hydroxyle de la partie ribose du SAM. Ces deux régions doivent être essentielles pour la fixation du cofacteur, puisque ce sont les 2 seules régions du repliement qui ne tolèrent pas d'insertions [165].

Cependant, ce repliement de type Rossmann fold est présent uniquement chez les SAM-MT de classe I. Les SAM-MT de classe II à V possèdent des domaines différents. Par exemple, l'activité catalytique des lysines méthyltransférases à domaine SET est portée par un

module en feuillet β de topologie très différente du repliement des SAM-MT de classe I [167]. De plus, certaines ARN-méthyltransférases possèdent également un repliement qui diverge de celui des SAM-MT de classe I [168, 169]. De manière intéressante, ces 2 repliements possèdent un « nœud » participant à la formation du site actif.

6. LES PRMT : DES CIBLES THÉRAPEUTIQUES POTENTIELLES

a. Implication des PRMT dans certains cancers

L'altération des modifications post-traductionnelles de certaines protéines, comme les protéines histones ou encore les protéines issues d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur, peuvent contribuer à l'apparition de cancers. Certains cancers sont caractérisés par une expression aberrante des PRMT, responsables de la méthylation d'un ensemble de substrats, dont les protéines histones, mais aussi des protéines issues d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur [170].

Différentes preuves de l'implication de PRMT1 dans certains cancers ont déjà été mises en évidence. Par exemple, le niveau de diméthylation de H4R3, marque déposée par PRMT1, est corrélé au grade du cancer de la prostate, montrant une implication de PRMT1 dans cette maladie [171]. De plus, une expression inhabituelle de PRMT1 est également observée dans le cancer du colon [172], le cancer de la vessie et le cancer du poumon [173]. Il a également été montré que PRMT1 est responsable de la méthylation du récepteur aux œstrogènes α (ER α), lui donnant de nouvelles fonctions extra-nucléaires, et bien que cette modification ait lieu dans les cellules normales, ER α est méthylé de manière aberrante dans certains cancers du sein [174]. PRMT1 est également un composant essentiel du complexe de transcription oncogénique MLL (« Mixed Lineage Leukaemia »), montrant le rôle de cette protéine dans le développement des leucémies myéloïdes et lymphoïdes [175].

Le rôle de CARM1 dans le développement de cancers reste un sujet à controverse. La majorité des études montre que CARM1 est surexprimée dans un certain nombre de cancers hormono-dépendants, comme le cancer de la prostate [176, 177] et le cancer du sein [178], mais aussi dans d'autres cancers, comme le cancer du colon [179]. Selon une étude de Frieze et collaborateurs, CARM1 est responsable de la coactivation du facteur de transcription E2F1, un régulateur positif du cycle cellulaire participant à la prolifération des cellules cancéreuses œstrogène-dépendantes [180]. Cependant, dans une étude précédente, il a été montré que la surexpression de CARM1 inhibe la croissance cellulaire œstrogène-dépendante par stimulation de l'expression de p21^{cip1} et p21^{kip}, qui sont eux des régulateurs négatifs du cycle cellulaires [181]. Le rôle de CARM1 dans le développement de cancers doit donc encore être élucidé.

L'implication d'une autre PRMT, PRMT5, dans le développement de cancers a également bien été étudiée. PRMT5 étant surexprimée dans la leucémie lymphoïde [182], il a été proposé que PRMT5 participe à la carcinogenèse. En effet, des études antérieures ont montré que la diméthylation symétrique de H3R8, marque répressive déposée par PRMT5, était retrouvée au niveau des promoteurs de ST7 et NM23, des gènes suppresseurs de tumeurs [120]. H3R8 étant hyperméthylée chez les patients atteints de leucémie lymphoïde, et la délétion de PRMT5 conduisant à une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses lymphoïdes [182], il semblerait bien que PRMT5 soit impliquée dans le développement de cancers.

Concernant PRMT6, il a été montré qu'elle était surexprimée dans plusieurs cancers, comme le cancer de la vessie, du poumon, du sein, ou encore de la prostate [173]. La même étude a montré que la répression de PRMT6 diminuait la croissance de certaines cellules cancéreuses, probablement dû à l'effet répressif d'un grand nombre d'autres gènes, normalement régulés positivement par PRMT6.

De manière générale, la méthylation aberrante de protéines histones ou non-histones due à une dérégulation de l'activité méthyltransférase des PRMT conduit à une altération des modifications épigénétiques de la chromatine. Comme ces modifications contrôlent notamment l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes, leur perturbation favorise le développement de cancers [170]. Les PRMT sont donc devenues des cibles thérapeutiques émergentes.

b. Inhibiteurs décrits des PRMT

Les premiers inhibiteurs de méthyltransférases à avoir été utilisés sont des analogues du SAM, tels que le SAH, produit secondaire de la réaction de méthylation [183], la 5'-méthylthioadénosine (MTA), produit de la dégradation du SAM [184], et la sinéfungine (SFG), antibiotique antifongique nucléosidique inhibiteur naturel des méthyltransférases [185, 186]. Bien que ces inhibiteurs soient efficaces, ils ciblent toutes les enzymes ayant le SAM comme cofacteur et ne sont donc pas sélectifs (Tableau 2).

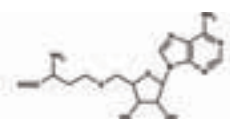
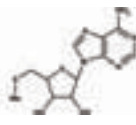
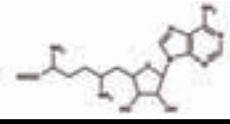
Composé	IC ₅₀ <i>in vitro</i>			IC ₅₀ <i>in vivo</i>	Propriétés pharmacocinétiques	Références
	PRMT1	CARM1	SET7			
SAH 	[a]	[a]	[a]	[a]	Bonnes	[183]
MTA 	[a]	[a]	[a]	[a]	Bonnes	[184]
SFG 	[a]	[a]	[a]	[a]	Bonnes	[185, 186]

Tableau 2 - Inhibiteurs naturels et non sélectifs des PRMT.

[a] Inhibition.

Ce n'est qu'en 2004 que les premiers inhibiteurs des PRMT non-analogues du SAM firent leur apparition. Le criblage à haut débit d'une banque de composés chimiques (ChemBridge) a permis de mettre en évidence 9 inhibiteurs de PRMT1 (AMI, pour « Arginine Methyltransferase Inhibitor »), ainsi que 2 activateurs (AMA, pour « Arginine Methyltransferase Activator ») [187]. Les AMI ont des IC₅₀ pour PRMT1 variant entre 0,19 µM et 16,29 µM, alors que les AMA stimulent l'activité méthyltransférase jusqu'à 3 fois. Cependant, la plupart des AMI ne sont pas sélectifs des PRMT et inhibe également les lysines méthyltransférases. Seules 2 molécules ciblent spécifiquement les PRMT : AMI1 et AMI6 (Tableau 3). L'existence de composés similaires aux xénoestrogènes au sein des AMI poussa Bedford et collaborateurs à tester l'efficacité de ces molécules sur les PRMT. Il a ainsi été montré que les xénoestrogènes inhibent modérément les PRMT, tout particulièrement CARM1, *in vitro* et *in vivo* (Tableau 3) [188]. Plusieurs groupes identifièrent de nouveaux inhibiteurs dérivés des AMI1, AMI5 et AMI6. Ces composés montrent une efficacité inférieure ou similaire aux AMI originaux, et leur structure suppose de mauvaises propriétés pharmacocinétiques (Tableau 3) [189-191].

Afin de trouver de nouveaux composés, mieux disposés au développement de médicaments, différentes études de criblage virtuel de banques de molécules ont permis d'identifier de nouveaux inhibiteurs des PRMT se distinguant des AMI [192, 193]. 2 composés intéressants ressortir de ces études : la stilbamidine et l'allantodapsone, dont l'IC₅₀ envers PRMT1 est respectivement de 56,9 µM et 1,7 µM (Tableau 4). Bien que la structure de ces composés soit plus prometteuse quant aux propriétés pharmacocinétiques, un dérivé, le composé 2e montre une importante cytotoxicité (Tableau 4) [194].

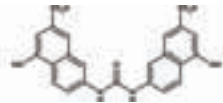
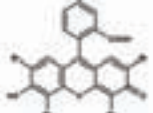
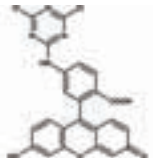
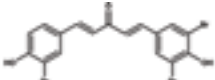
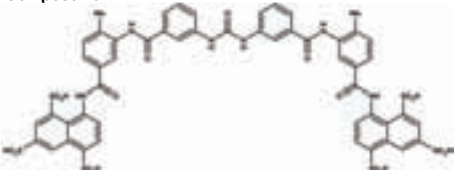
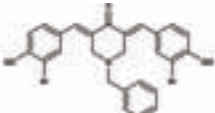
Composé	IC ₅₀ <i>in vitro</i>			IC ₅₀ <i>in vivo</i>	Propriétés pharmacocinétiques	Références
	PRMT1	CARM1	SET7			
AMI1 	8,81 µM	I ^[a]	P ^[c]	ND ^[d]	Supposées mauvaises	[187]
AMI5 	1,41 µM	I ^[a]	I ^[a]	ND ^[d]	Supposées mauvaises	[187]
AMI6 	5,11 µM	I ^[a]	M ^[b]	ND ^[d]	Supposées mauvaises	[187]
Composé 9 	3,0 µM	34,6 µM	100,1 µM	ND ^[d]	Supposées mauvaises	[189]
Composé 15 	18,1 µM	ND ^[d]	ND ^[d]	ND ^[d]	Supposées mauvaises	[190]
Composé 7g 	> 667 µM	8,6 µM	> 667 µM	3 µM	Cytotoxique à partir de 8 µM	[191]

Tableau 3 - Inhibiteurs de la famille des AMI.

[a] Inhibition.

[b] Moyenne inhibition.

[c] Pas d'inhibition.

[d] Non défini.

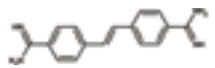
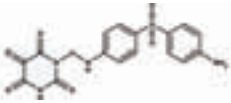
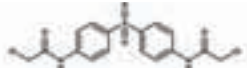
Composé	IC ₅₀ <i>in vitro</i>			IC ₅₀ <i>in vivo</i>	Propriétés pharmacocinétiques	Références
	PRMT1	CARM1	SET7			
Stilbamidine 	56,9 µM	ND ^[c]	F ^[a]	ND ^[c]	«Drug-like»	[192]
Allantodapsone 	1,7 µM	ND ^[c]	F ^[a]	ND ^[c]	«Drug-like»	[192]
Composé 2e 	1,5 µM	P ^[b]	P ^[b]	ND ^[c]	Activité cytotoxique importante	[194]

Tableau 4 - Inhibiteurs issus de criblages virtuels.

[a] Faible inhibition.

[b] Pas d'inhibition.

[c] Non défini.

Des composés dérivés du pyrazole et de l'imidazole furent également développés afin de définir des inhibiteurs spécifiques de CARM1 [195-199]. Dans l'ensemble ces composés montrent une bonne spécificité pour CARM1, comme par exemple le composé 7f dont l'IC₅₀ est 600 fois supérieur pour PRMT1 (0,04 µM pour CARM1 et > 25 µM pour PRMT1) (Tableau 5) [196]. Cependant, bien que ces composés montrent une bonne perméabilité, l'inhibition *in vivo*, est beaucoup plus faible que l'inhibition *in vitro*, comme le montre les tests d'inhibition du composé 12, qui malgré un IC₅₀ de 0,2 µM *in vitro* ne montre pas d'inhibition *in vivo* (Tableau 5) [198]. Les structures cristallographiques de 2 composés (CMPD1 et CMPD2) en complexe avec la protéine CARM1 ont été résolues, montrant qu'en présence de SAH ces composés occupent la poche de fixation du substrat [160].

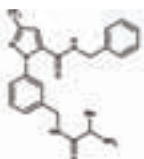
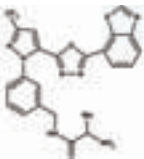
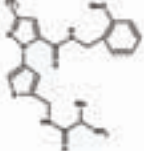
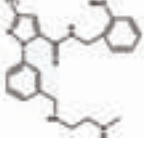
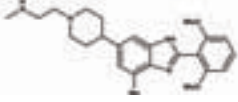
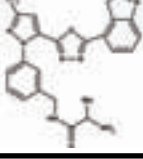
Composé	IC ₅₀ <i>in vitro</i>			IC ₅₀ <i>in vivo</i>	Propriétés pharmacocinétiques	Références
	PRMT1	CARM1	SET7			
Composé 7b 	> 25 µM	0,08 µM	ND ^[b]	> 100 µM	Perméabilité moyenne	[195]
Composé 7f 	> 25 µM	0,04 µM	ND ^[b]	ND ^[b]	Bonne perméabilité	[196]
Composé 7a 	> 100 µM	0,06 µM	> 100 µM	ND ^[b]	ND ^[b]	[197]
Composé 12 	ND ^[b]	0,2 µM	ND ^[b]	P ^[a]	ND ^[b]	[198]
Composé 17b 	> 25 µM	0,07 µM	ND ^[b]	ND ^[b]	ND ^[b]	[199]
CMPD2 	> 10 µM	0,027 µM	ND ^[b]	ND ^[b]	ND ^[b]	[160]

Tableau 5 - Inhibiteurs dérivés du pyrazole et de l'imidazole.

[a] Pas d'inhibition.

[b] Non défini.

Plus récemment, des inhibiteurs analogues du SAM spécifiques de PRMT1 furent publiés [200, 201]. Bien que ces composés inhibent correctement PRMT1 (IC_{50} entre 2,9 μ M et 14,5 μ M) et que cette inhibition soit spécifique (pas d'inhibition observé pour CARM1 et SET7), aucune information sur leur activité *in vivo* ne permet de définir l'applicabilité de ces composés (Tableau 6).

Globalement, bien que de nombreuses petites molécules spécifiques des PRMT avec un grand potentiel *in vitro* aient été identifiées, aucune molécule régulant l'activité des PRMT *in vivo* n'est encore disponible. L'implication des PRMT dans le cancer étant de plus en plus notoire, le développement de molécules spécifiques des PRMT actives *in vivo* devrait s'accélérer [170].

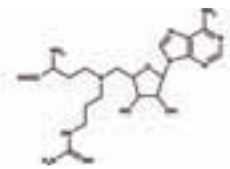
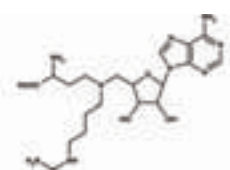
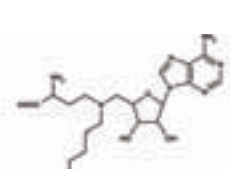
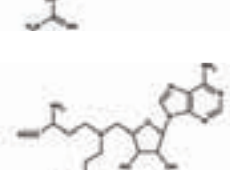
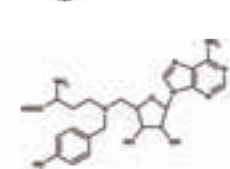
Composé	IC_{50} <i>in vitro</i>			IC_{50} <i>in vivo</i>	Propriétés pharmacocinétiques	Références
	PRMT1	CARM1	SET7			
Analogue 15 	6,2 μ M	ND ^[b]	> 100 μ M	ND ^[b]	ND ^[b]	[200]
Analogue 16 	2,9 μ M	ND ^[b]	> 50 μ M	ND ^[b]	ND ^[b]	[200]
Analogue 17 	5,6 μ M	ND ^[b]	> 100 μ M	ND ^[b]	ND ^[b]	[200]
Analogue 19 	3,9 μ M	PI ^[a]	PI ^[a]	ND ^[b]	ND ^[b]	[201]
Analogue 20 	14,5 μ M	PI ^[a]	PI ^[a]	ND ^[b]	ND ^[b]	[201]

Tableau 6 - Inhibiteurs analogues du cofacteur SAM.

[a] Pas d'inhibition.

[b] Non défini.

D. CONCLUSION

CARM1 est impliquée dans de nombreux mécanismes biologiques, à différents niveaux de la vie cellulaire. Son implication indéniable dans certains cancers font d'elle une cible thérapeutique importante. Cependant, afin de développer des composés à action pharmacologique ciblant spécifiquement CARM1, ses mécanismes, tels que la méthylation et la reconnaissance de ses substrats, doivent être mieux compris.

Matériel et méthodes

CHAPITRE II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. EXPRESSIONS ET PURIFICATIONS PROTÉIQUES

1. EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTÉINE CARM1 DE SOURIS

Les travaux qui vont être présentés par la suite ont généralement été réalisés sur la protéine CARM1 de souris (mCARM1), dont le clone original a été donné par le laboratoire du Pr. Michael R. Stallcup (University of Southern California, Los Angeles) [74]. La protéine mCARM1 est très proche de son homologue humain (hCARM1) : elles possèdent toutes deux 608 acides aminés et montrent une identité de séquence de plus de 98% (Figure 79 en annexes). La différence principale entre mCARM1 et hCARM1 est l'insertion d'un résidu thréonine à l'extrémité amino-terminale chez la souris, provoquant un décalage de la numérotation entre les deux protéines. Ce décalage est rattrapé au niveau du domaine carboxy-terminal, où il y a cette fois-ci une insertion chez la protéine humaine. Les résidus 7 à 569 de hCARM1 correspondent ainsi aux résidus 8 à 570 de mCARM1 (alignements en annexes).

a. Clonage et expression en cellules d'insecte (système baculovirus)

À mon arrivée dans l'équipe, l'expression et la purification de la protéine CARM1 de souris étaient déjà maîtrisées. Les différentes constructions ainsi que les différents mutants du domaine catalytique de mCARM1 ont été amplifiées par PCR depuis la construction originale GST-CARM1 [74]. Elles ont ensuite été clonées dans les vecteurs d'expression pDEST™20 (Invitrogen™) ou pGGWA [202] en utilisant la technologie Gateway® (Invitrogen™). Ces vecteurs permettent l'expression de la protéine d'intérêt en fusion avec la glutathion S-transférase (GST) à son extrémité amino-terminale. Les deux protéines sont séparées par un site de coupure à la TEV, permettant d'éliminer la partie GST au cours de la purification. Des baculovirus recombinants ont ensuite été obtenus par la technique Bac-to-Bac® (Invitrogen™), et ont servi à infecter des cellules d'insectes Sf9. Celles-ci ont été cultivées en suspension dans du milieu de Grace (Sigma®) complémenté avec 10% de sérum bovin fœtal et $28 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de gentamycine. 48 heures après infection, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 350 g pendant 20 minutes et les culots stockés à -80°C ou utilisés directement.

b. Purification de la protéine exprimée

Le même protocole de purification a été appliqué pour toutes les constructions et tous les mutants de mCARM1 utilisés dans les études décrites ici. Celui-ci est séparé en 3 étapes :

(i) une chromatographie d'affinité au glutathion, (ii) une chromatographie échangeuse d'anions et enfin (iii) une chromatographie d'exclusion moléculaire (GF).

❖ *Chromatographie d'affinité au glutathion*

Pour chaque litre de culture, les culots cellulaires ont été remis en suspension dans 40 ml de tampon de lyse, contenant 50 mM TrisHCl pH8,5, 300 mM NaCl, 5% (v/v) Glycérol, et 5 mM β -mercaptoéthanol. Après lyse des cellules par sonication, l'extrait total a été centrifugé à 30 000 g pendant 45 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires et les éléments insolubles. Afin d'isoler la protéine de fusion GST-mCARM1, l'extrait brut a ensuite été incubé avec 1,5 ml de billes glutathion-sépharose (« Glutathion Sepharose 4B » de GE Healthcare®) sous agitation douce pendant 1 heure à 4°C. Après centrifugation de la suspension à 500 g pendant 2 minutes à 4°C, les billes ont été réservées et le surnageant incubé une nouvelle fois avec 1,5 ml de billes glutathion-sépharose sous agitation douce pendant 1 heure à 4°C. Après centrifugation, les billes des deux incubations ont été rassemblées et déposées sur colonne. Elles ont ensuite été lavées à deux reprises avec 10 ml de tampon de lyse. Après re-suspension dans 1,5 ml de ce même tampon, les billes ont été incubées avec 2500 unités de TEV pendant 3 heures à 30°C afin de couper l'étiquette GST. Le surnageant contenant la protéine mCARM1 coupée a ensuite été élué, et 5 éluions supplémentaires ont été réalisées avec du tampon de lyse afin de récupérer la protéine coupée ayant pu rester collée sur la résine. Afin de déterminer les fractions dans lesquelles la protéine mCARM1 est présente et de vérifier que l'étiquette GST est bien coupée, les différentes fractions ont été analysées par migration sur gel d'acrylamide 10% en conditions dénaturantes (SDS-PAGE 10%) et l'absorbance mesurée à 280 nm (Figure 16A).

❖ *Chromatographie échangeuse d'anions*

Les fractions d'éluion contenant la protéine CARM1 ont été rassemblées et la concentration en NaCl ajustée à 40 mM avec un tampon sans sels (50 mM TrisHCl pH 8,5, 5 mM β -mercaptoéthanol). L'échantillon ainsi dilué a été chargé sur une colonne échangeuse d'anions (HiTrap Q-HP 5 ml de GE Healthcare®) équilibrée avec du tampon A à faible concentration saline (50 mM TrisHCl pH 8,5, 40 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol). L'éluion a été faite par gradient de sels, en augmentant la proportion de tampon B (50 mM TrisHCl pH 8,5, 1 M NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol) à raison de 1%.ml⁻¹ et 5 ml.minute⁻¹ (Figure 16B). Les fractions d'éluion ont été analysées par SDS-PAGE 10% afin de déterminer celles où la protéine mCARM1 est présente et si des contaminants persistent (Figure 16B).

❖ *Chromatographie d'exclusion moléculaire*

Les fractions contenant la protéine CARM1 les plus pures ont été rassemblées et concentrées sur Amicon Ultra (Millipore®) avec une limite d'exclusion de 30 kDa (Amicon

Ultra 30) jusqu'à un volume de 1,5 ml. L'échantillon ainsi concentré a été injecté sur une colonne GF HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare®) équilibrée avec un tampon contenant 20 mM TrisHCl pH 8,0, 100 mM NaCl et 5 mM β -mercaptoéthanol. Après élution avec ce même tampon, les fractions ont été analysées par SDS-PAGE 10% (Figure 16C). Celles dont la pureté était satisfaisante ont été rassemblées et concentrées sur Amicon Ultra 30, en ne dépassant jamais la limite de 8 mg.ml⁻¹. Pour 1 litre de culture, 0,8 à 1 mg de protéine mCARM1 pure étaient généralement obtenus.

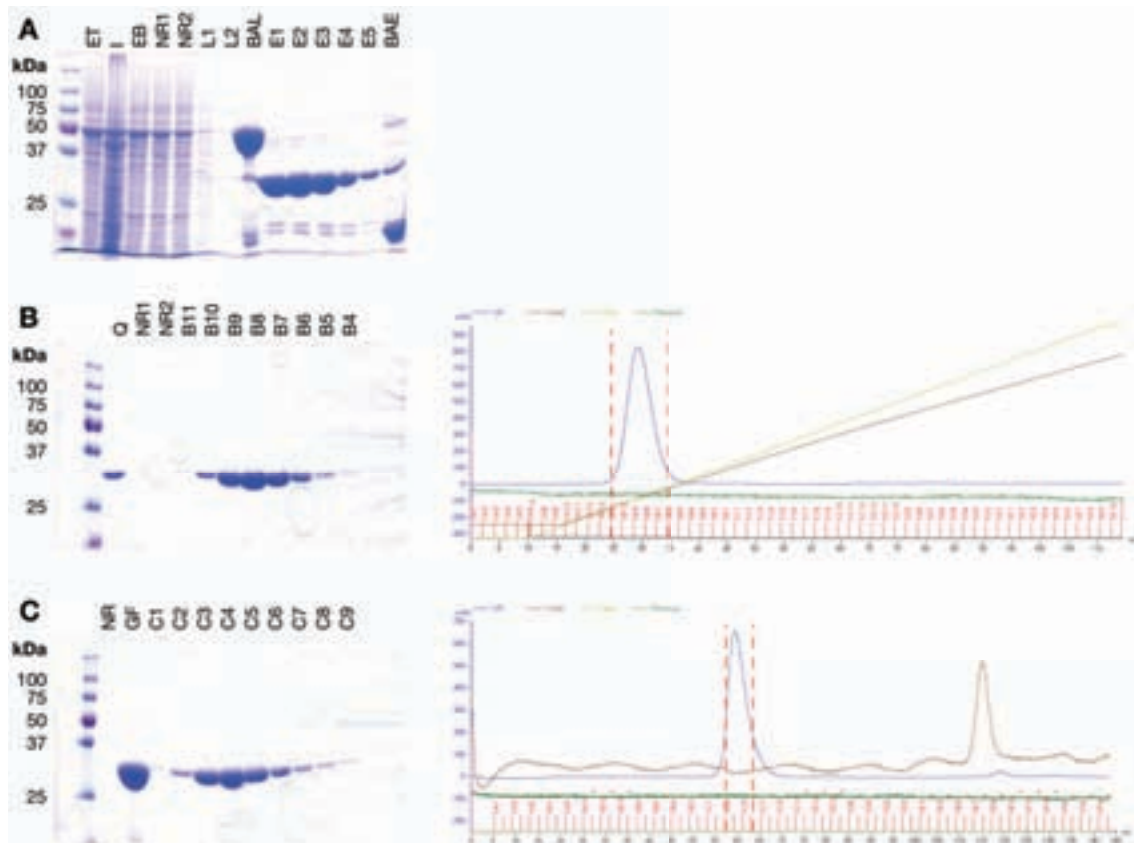


Figure 16 - Gels et chromatogrammes pour les différentes étapes de purification de mCARM1₁₃₀₋₅₀₇
 (A) Gel SDS-PAGE 10% de la chromatographie d'affinité au glutathion : ET, Extrait total ; I, Fraction insoluble ; EB, Extrait brut ; NR1-NR2, Fractions non-retenues sur résine après les incubations 1 et 2 ; L1-L2, Lavages 1 et 2 ; BAL, Billes après lavage ; E1-E5, Fractions d'élution 1 à 5 ; BAE, Billes après élution.
 (B) Gel SDS-PAGE 10% et chromatogramme de la chromatographie échangeuse d'anions : Q, Échantillon chargé sur HiTrap Q-HP 5 ml ; NR1-NR2, Fractions non-retenues sur résine 1 et 2 ; B11-B4, Fractions d'élution.
 (C) Gel SDS-PAGE 10% et chromatogramme de la chromatographie d'exclusion moléculaire : NR, Fraction non-retenue lors de la concentration sur Amicon Ultra ; GF, Échantillon injecté sur GF HiLoad 16/60 Superdex S200 ; C1-C9, Fractions d'élution.

2. EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTÉINE CARM1 DE MOUSTIQUE

Pour les expériences nécessitant que la protéine CARM1 soit concentrée à plus de 8 mg.ml⁻¹, l'homologue chez le moustique *Anopheles gambiae* (AgCARM1), comportant sous sa forme entière 622 acides aminés, a été utilisé (62% d'identité de séquence avec la protéine humaine). En plus de pouvoir être concentrée plus fortement que mCARM1, la protéine de

moustique est exprimée de manière soluble chez *E. coli*, et sa production est donc moins coûteuse. Le clone original nous a été donné par le laboratoire du Dr Wei Xu (University of Wisconsin, Madison). Celui-ci correspond au vecteur d'expression pET21a (Novagen®), codant pour le fragment 1 à 509 de la protéine AgCARM1, c'est-à-dire les domaines amino-terminal et catalytique, associé à une étiquette poly-histidine à l'extrémité carboxy-terminale.

a. Expression dans *E. coli*

La protéine AgCARM1₁₋₅₀₉ a été produite dans la souche BL21DE3 d'*E. coli* transformée avec le vecteur d'expression recombinant décrit auparavant. Du milieu LB complété avec 0,1 mg.ml⁻¹ d'ampicilline a étéensemencé avec une pré-culture de bactéries transformées, puis incubé à 37°C. Lorsque les cultures avaient atteint une densité optique de 0,5, l'expression d'AgCARM1₁₋₅₀₉ a été induite par ajout de 0,5 mM d'IPTG. Après 20 heures d'incubation à 20°C, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4000 g pendant 20 minutes et les culots stockés à -80°C ou utilisés directement.

b. Purification de la protéine exprimée

La purification de la protéine AgCARM1 est similaire à celle de mCARM1, à la seule différence près que la première étape est une chromatographie d'affinité métallique. Pour chaque litre de culture, les culots cellulaires ont été re-suspendus dans 40 ml de tampon de lyse, contenant 50 mM TrisHCl pH 8,0, 100 mM KCl, 20 mM Imidazole pH 8,0. Après lyse des cellules par sonication, l'extrait total a été centrifugé à 30 000 g pendant 45 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires et les éléments insolubles. Afin d'isoler la protéine de fusion AgCARM1₁₋₅₀₉-His₆, l'extrait brut a ensuite été incubé avec 6 ml de résine NiNTA superflow (Qiagen®) sous agitation douce pendant 2 heures à 4°C. Après centrifugation de la suspension à 500 g pendant 2 minutes à 4°C, les billes ont été déposées sur colonne. Elles ont ensuite été lavées avec 10 ml de tampon de lyse, puis avec 10 ml de tampon de lavage contenant 50 mM TrisHCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole pH 8,0. Après lavage, la protéine a été éluée avec 50 mM TrisHCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 350 mM Imidazole pH 8,0. Afin de déterminer les fractions dans lesquelles la protéine AgCARM1₁₋₅₀₉ est présente, les différentes fractions ont été analysées par SDS-PAGE 10% et l'absorbance à 280 nm mesurée (Figure 17A).

Le reste de la purification s'est ensuite déroulée comme pour la protéine mCARM1. Les fractions d'éluion contenant la protéine AgCARM1₁₋₅₀₉ ont été rassemblées et la concentration en NaCl ajustée à 100 mM avec un tampon sans sels (50 mM TrisHCl pH 8,0). L'échantillon ainsi dilué a ensuite été purifié sur une colonne échangeuse d'anions en utilisant les tampons A (50 mM TrisHCl pH 8,0, 100 mM NaCl) et B (50 mM TrisHCl pH 8,0, 1 M NaCl) comme tampons d'éluion. Les fractions d'éluion ont été analysées par SDS-PAGE 10% afin de déterminer celles où la protéine AgCARM1₁₋₅₀₉ est présente et si des contaminants sont

toujours présents (Figure 17B). Après concentration des fractions les plus pures sur Amicon Ultra une limite d'exclusion de 50 kDa (Amicon Ultra 50), celles-ci ont été injectées sur une colonne d'exclusion moléculaire, et la protéine a été éluée avec un tampon contenant 50 mM TrisHCl pH 8,0 et 80 mM NaCl). Les fractions ont ensuite été analysées par SDS-PAGE 10% (Figure 17C), et celles dont la pureté était satisfaisante ont été rassemblées et concentrées sur Amicon Ultra 50. Habituellement, 5 à 8 mg de protéine AgCARM1₁₋₅₀₉ pure ont pu être ainsi obtenus par litre de culture.

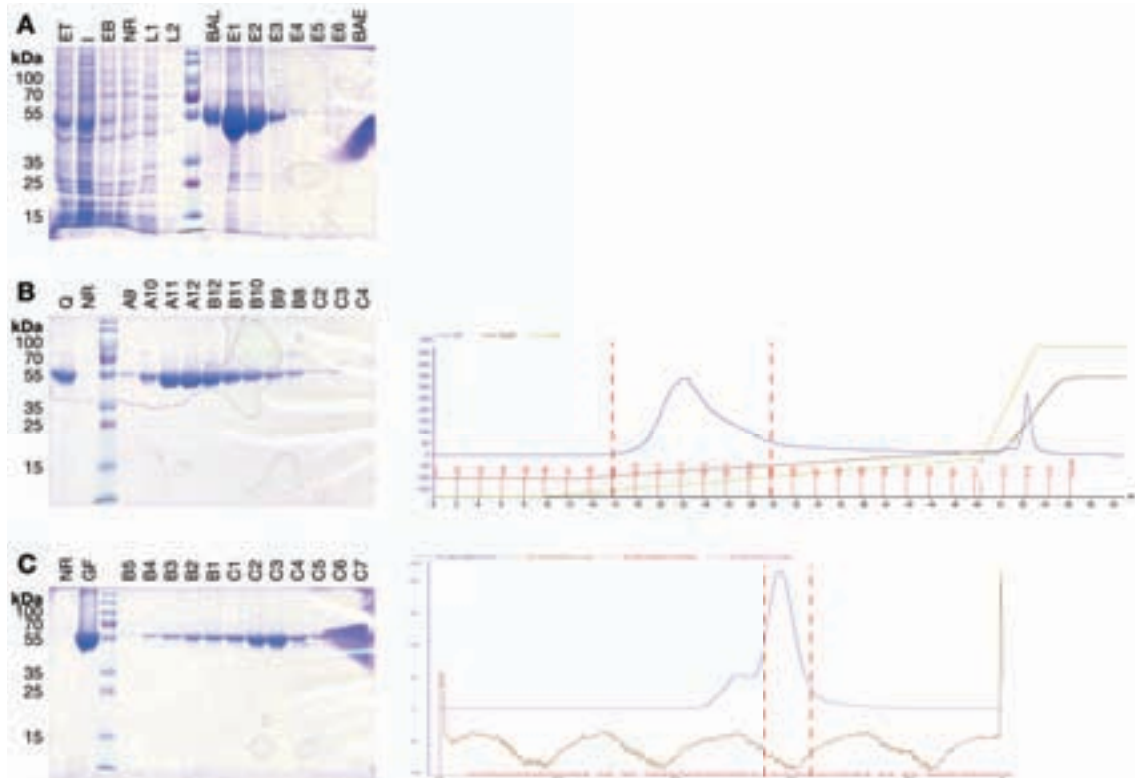


Figure 17 - Gels et chromatogrammes pour les différentes étapes de purification de AgCARM1₁₋₅₀₉

(A) Gel SDS-PAGE 10% de la chromatographie d'affinité métallique : ET, Extrait total ; I, Fraction insoluble ; EB, Extrait brut ; NR, Fraction non-retenue sur résine après incubation ; L1-L2, Lavages 1 et 2 ; BAL, Billes après lavage ; E1-E6, Fractions d'élution 1 à 6 ; BAE, Billes après élution.

(B) Gel SDS-PAGE 10% et chromatogramme de la chromatographie échangeuse d'anions : Q, Échantillon chargé sur HiTrap Q-HP 5 ml ; NR, Fraction non-retenue sur résine ; A9-C4, Fractions d'élution.

(C) Gel SDS-PAGE 10% et chromatogramme de la chromatographie d'exclusion moléculaire : NR, Fraction non-retenue lors de la concentration sur Amicon Ultra ; GF, Échantillon injecté sur GF HiLoad 16/60 Superdex S200 ; B5-C7, Fractions d'élution.

3. EXPRESSION ET PURIFICATION DU TÉTRAMÈRE D'HISTONES (H3H4)₂

Des cellules BL21(DE3) d'*E. coli* transformées avec un plasmide d'expression codant pour l'histone H4 associé à une étiquette poly-histidine et l'histone H3 [203] ont été cultivées dans 3 x 1 litre de milieu « Terrific Broth » complété avec 100 µg.ml⁻¹ d'ampicilline à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm de 0,6. La co-expression des histones H3 et H4 a ensuite été induite avec 0,2 mM d'IPTG pendant 2 heures à 37°C. Les cellules ont été

récoltées par centrifugation à 4000 g pendant 20 minutes. Après re-suspension dans du tampon de lyse (50 mM TrisHCl pH 8,2, 2 M NaCl, 0,1% PMSF), elles ont ensuite été lysées par sonication. Le lysat a été clarifié par centrifugation à 25000 g pendant 30 minutes et chargé sur une colonne de 1,5 ml de résine NiNTA superflow (Qiagen®). Les hétérotétramères (H3H4)₂ ont été élués avec du tampon contenant 50 mM TrisHCl pH 8,0, 2 M NaCl et 200 mM Imidazole pH 8,0. Les fractions contenant (H3H4)₂ ont été concentrées sur Amicon Ultra 30 et ont été injectées sur une colonne GF HiLoad 16/60 Superdex 200 équilibrée avec 50 mM TrisHCl pH 8,0, 2 M NaCl, 0,5 mM EDTA et 0,5 mM DTT. Le tétramère (H3H4)₂ purifié a ensuite été concentré sur Amicon Ultra 30 jusqu'à une concentration d'environ 9 mg.ml⁻¹.

4. EXPRESSION ET PURIFICATION D'UN FRAGMENT DE LA PROTÉINE PABP1

La séquence nucléotidique correspondant aux résidus 437 à 488 de la protéine PABP1 humaine a été insérée dans un vecteur pGEX à la suite de la séquence codant pour la GST et le site de clivage de la thrombine. La souche BL21(DE3) transformée par le plasmide résultant a été cultivée à 37°C en milieu LB contenant 0,1 mg.ml⁻¹ d'ampicilline jusqu'à une densité optique de 0,6. L'expression de la protéine de fusion a été induite par addition de 0,5 mM d'IPTG. La culture a été poursuivie à 20°C pendant 20 heures, puis les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 4000 g pendant 20 minutes. Les cellules ont été remises en suspension dans le tampon de lyse (¹/₂₀ du volume de culture) contenant 50 mM TrisHCl pH 8,5 et 200 mM NaCl, et stockées à -20°C.

Après décongélation, les cellules ont été lysées par sonication, puis l'extrait total a été centrifugé à 30000 g pendant 45 minutes à 4°C. Le surnageant a été déposé sur une colonne de 2 ml de glutathion-sépharose (« Glutathion Sepharose 4B » de GE Healthcare®). Après 3 lavages de la résine par 5 ml de tampon contenant 50 mM TrisHCl pH 8,5, 200 mM NaCl, la protéine de fusion a été éluée à l'aide de 4 ml du tampon précédent additionné de 50 mM de glutathion réduit. La protéine a été concentrée sur Amicon Ultra avec une limite d'exclusion de 10 kDa (Amicon Ultra 10) jusqu'à 5 mg.ml⁻¹ dans le tampon final contenant 50 mM TrisHCl pH 8,5, 200 mM NaCl, 0,5 mM DTT.

B. CARACTÉRISATION BIOPHYSIQUE

1. THERMOFLUOR®

Le ThermoFluor®, aussi appelé en anglais « Thermal shift assay », est une technique mise au point pendant les années 1990 permettant de caractériser la stabilité thermique d'une protéine [204]. Son principe repose sur la détection de la fluorescence émise par une sonde, par exemple le SYPRO® Orange [205], interagissant spécifiquement avec les régions

hydrophobes des protéines. Classiquement, lorsqu'elle est mélangée à une solution protéique, la sonde exposée à l'environnement aqueux émet une fluorescence faible. Sous l'influence de la température, la protéine en solution se dénature, exposant ses régions hydrophobes, avec lesquelles le SYPRO® Orange peut désormais interagir et ainsi émettre une fluorescence plus importante. Le ThermoFluor® permet donc de suivre la dénaturation d'une protéine sous l'effet de la température et de déterminer sa température de fusion (T_m) (Figure 18).

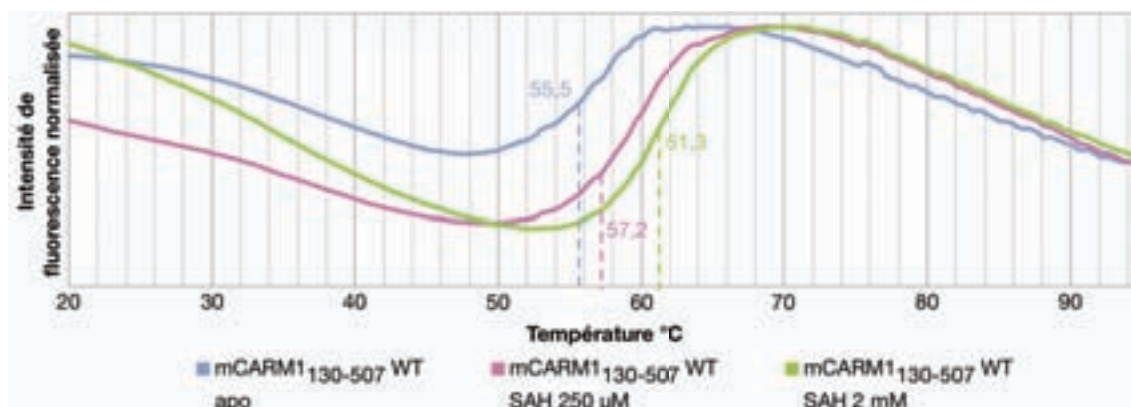


Figure 18 - Caractérisation de l'effet du SAH sur la stabilité thermique de mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT

L'observation de la fluorescence émise par le SYPRO® Orange permet de caractériser la stabilité thermique d'une protéine, ainsi que l'effet de la fixation d'un ligand sur celle-ci. Par exemple ici, les mesures de ThermoFluor® en absence et en présence de SAH montrent que ce dernier a un effet stabilisateur sur la protéine mCARM1₁₃₀₋₅₀₇, permettant une augmentation du T_m de plusieurs degrés.

Les mesures de ThermoFluor® ont été réalisées grâce à un appareil classique de PCR en temps réel (Bio-Rad® MiniOpticon Real-Time PCR Detection System). Cette machine permet de faire jusqu'à 48 mesures en parallèle (1 blanc + 47 échantillons). Chaque mesure a été réalisée sur un échantillon de 30 μ l contenant au moins 5 μ g de protéine et 7 μ l de SYPRO Orange (dilué 200 fois) dans les conditions de tampons désirées. En plus de ces composants essentiels, des additifs (cofacteur, inhibiteur ou autre ligand) ont pu être ajoutés, afin de déterminer leur effet sur la stabilité de la protéine (Figure 18). Le protocole qui a été suivi consiste en un gradient de température allant de 20°C à 95°C, avec une mesure d'intensité de fluorescence tous les 0,5°C. Le contrôle de l'expérience et l'analyse de données de fluorescence ont été réalisés grâce au logiciel fourni avec l'appareil (Opticon Monitor).

2. MICROCALORIMÉTRIE (ITC)

La microcalorimétrie ou « Isothermal Titration Calorimetry » (ITC) est une méthode permettant de caractériser thermodynamiquement les interactions entre des molécules en solution. Son principe est basé sur la mesure des échanges de chaleur (émission ou absorption) générés par une interaction. Elle permet ainsi de déterminer directement certains paramètres thermodynamiques, comme la stœchiométrie N , la constante d'association K_a et la

variation d'enthalpie ΔH . Les autres paramètres thermodynamiques comme la constante de dissociation K_d , ainsi que les variations d'énergie libre ΔG et d'entropie ΔS , peuvent ensuite être déterminés à partir du K_a et de ΔH grâce aux relations :

$$K_d = \frac{1}{K_a}$$
$$\Delta G = -RT \times \ln(K_a) = \Delta H - T\Delta S$$

où R est la constante des gaz parfaits, et T la température en degrés Kelvin.

Les mesures d'ITC ont dans un premier temps été réalisées à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC) de Strasbourg, avec l'aide du Dr. Éric Ennifar, puis de manière autonome à l'IGBMC. Dans les deux cas, les expériences ont été réalisées sur un système iTC200 Microcal® (GE Healthcare®). Cet appareil est constitué de deux cellules, une cellule échantillon et une cellule de référence, placées dans une enceinte adiabatique et accessibles par des tubes étroits (Figure 19). Une seringue rotative est utilisée pour injecter des petits volumes de ligand dans la cellule échantillon et permet également d'homogénéiser le milieu réactionnel (Figure 19). La différence de température entre les deux cellules est gardée constante par apport ou par retrait de chaleur (en fonction des cas) à la cellule échantillon. Lorsqu'une réaction chimique a lieu dans la cellule échantillon, de la chaleur est émise ou absorbée. La puissance nécessaire pour conserver la différence de température constante entre les deux cellules suite à cette réaction permet de déterminer la quantité totale de chaleur émise ou absorbée par le système étudié.

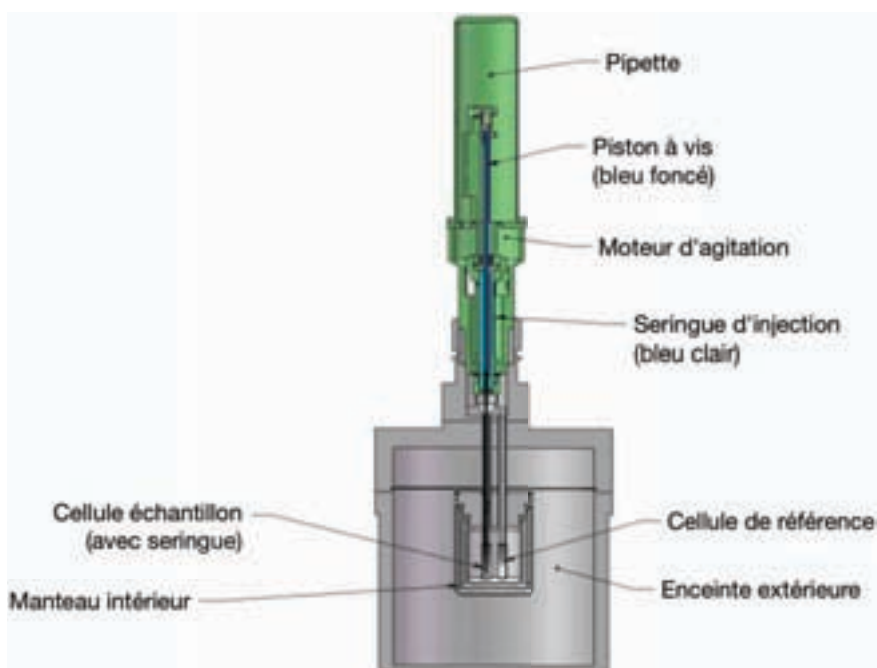


Figure 19 - Système iTC200 Microcal®

Dans une expérience d'ITC classique, une solution contenant une molécule biologique (protéine, ADN...), est titrée par une solution contenant un partenaire d'interaction (cofacteur, substrat, inhibiteur). La chaleur émise ou absorbée au moment de l'interaction (ΔH) est mesurée au cours du temps (Figure 20A). Chaque pic correspond à une variation de chaleur associée à l'injection d'un petit volume de ligand dans la cellule échantillon, permettant de déterminer la proportion de ligand lié. Au fur et à mesure que le système se rapproche de la saturation, les échanges de chaleurs deviennent moins importants, jusqu'à ce que les variations ne soient plus dues qu'à l'effet de la dilution de l'échantillon. Une courbe d'interaction en fonction du rapport ligand/molécule biologique peut ensuite être déduite à partir des variations de chaleur au fil des injections (Figure 20B). Après analyse de la courbe d'interaction avec le modèle approprié, les paramètres de l'interaction N , K_d et ΔH peuvent être déterminés.

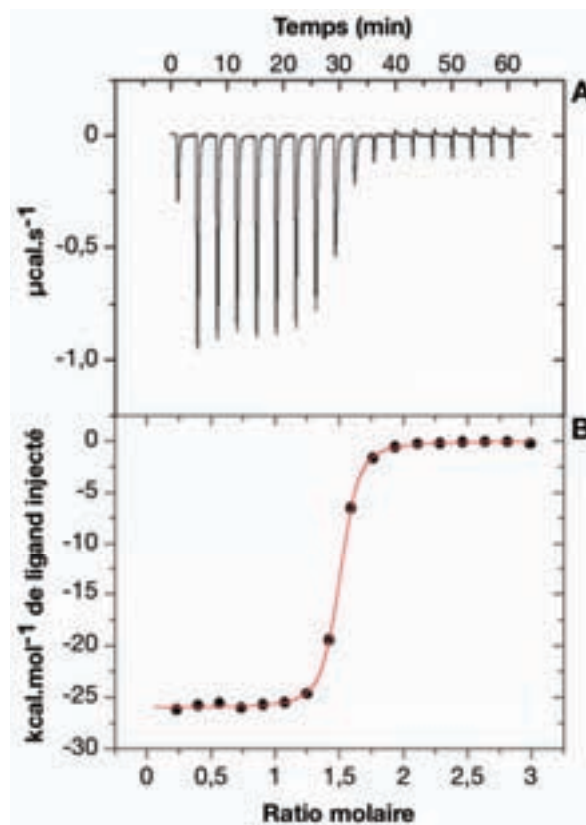


Figure 20 - Courbes d'ITC classiques

(A) Données brutes correspondant aux variations de chaleur pour chaque injection de ligand au cours du temps.
 (B) Courbe d'interaction obtenue par intégration des données brutes en fonction du rapport molaire ligand/molécule biologique.

L'ITC nécessitant une quantité importante de protéine et de ligand, la majorité des expériences ont été réalisées sur AgCARM1₁₋₅₀₉ qui peut être produite en plus grande quantité que n'importe quelle construction de mCARM1. 300 μl d'une solution contenant la protéine CARM1 à une concentration comprise entre 75 μM et 150 μM (soit 4,4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ à 70 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)

ont été placés dans la cuve échantillon, tandis que le ligand en solution (dans des conditions de tampon identiques à celui de la protéine) à tester était chargé dans la seringue à une concentration variant de 500 μM à 2 mM. Celui-ci a été injecté dans la cellule échantillon en 20 injections allant de 0,5 μl à 2 μl . Chaque injection était espacée de la précédente de 180 secondes pour permettre au système de se rééquilibrer. Afin d'avoir un bon signal, les premières expériences ont été réalisées à 37°C. Par la suite, ayant remarqué que la protéine s'agrégeait au cours de l'expérience, différentes températures ont été testées, variant entre 30°C et 4°C. Cependant, ceci n'a pas permis de résoudre le problème d'agrégation.

3. ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE

L'anisotropie de fluorescence est une technique consistant à observer le mouvement de rotation d'une sonde fluorescente en solution. Une petite molécule, dont le mouvement est rapide, sera caractérisée par une valeur d'anisotropie basse, tandis qu'une molécule de taille plus importante, dont le mouvement est plus lent, sera caractérisée par une valeur d'anisotropie plus haute. Il est ainsi possible d'observer la formation d'un complexe en marquant l'un des membres avec une sonde fluorescente.

Généralement, lorsque des molécules fluorescentes sont excitées par une lumière polarisée, la fluorescence émise par ces molécules est également polarisée. Le degré de polarisation de l'émission est décrite en termes d'anisotropie r . L'origine de l'anisotropie est l'existence de moments de transition pour l'absorption et l'émission se trouvant le long de directions spécifiques à l'intérieur de la structure du fluorophore. Dans une solution homogène, les fluorophores à l'état fondamental sont orientés aléatoirement. Lorsqu'ils sont exposés à une lumière polarisée, les fluorophores dont les moments de transition de l'absorption sont orientés dans la même direction que la lumière incidente sont préférentiellement excités. La population à l'état excité est donc partiellement orientée.

Les mesures d'anisotropie décrivent le déplacement angulaire moyen d'un fluorophore ayant lieu entre l'absorption et l'émission consécutive d'un photon. Ce déplacement angulaire dépend de la vitesse et de l'étendue de la diffusion de rotation pendant le temps de vie de l'état excité. La vitesse de la diffusion de rotation dépend de la viscosité du solvant ainsi que de la taille et de la forme de la molécule. Pour des molécules biologiques, l'anisotropie dépend à la fois de leur diffusion de rotation et de leur flexibilité. Les mesures d'anisotropie de fluorescence peuvent être utilisées pour quantifier l'association d'une protéine avec d'autres macromolécules, qui change la vitesse de rotation globale.

Au cours des expériences d'anisotropie de fluorescence, l'échantillon est excité par une lumière polarisée, et l'intensité d'émission est mesurée à travers un polariseur. Lorsque le

polariseur d'émission est orienté parallèlement à la direction de la lumière d'excitation, l'intensité mesurée est appelée I_{\parallel} . De la même manière, lorsque le polariseur est perpendiculaire à l'excitation, l'intensité mesurée est appelée I_{\perp} . Ces valeurs d'intensité sont utilisées pour calculer l'anisotropie [206] :

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

L'anisotropie est une quantité sans dimension indépendante de l'intensité totale de l'échantillon. En effet, la différence ($I_{\parallel} - I_{\perp}$) est normalisée par l'intensité totale ($I_{\parallel} + 2I_{\perp}$). En l'absence d'artefact, l'anisotropie est donc indépendante de la concentration en fluorophore.

Lorsque l'intensité du fluorophore ne varie pas entre sa forme libre et sa forme liée, alors la fraction de fluorophore lié $f_{lié}$ peut être déterminée à partir des valeurs d'anisotropie du fluorophore libre r_{libre} et du fluorophore lié $r_{lié}$ [207, 208] :

$$f_{lié} = \frac{[L_{lié}]_{tot}}{[L]_{tot}} = \frac{r - r_{libre}}{r_{lié} - r_{libre}}$$

L'anisotropie peut donc être exprimée ainsi :

$$r = r_{libre} + (r_{lié} - r_{libre}) \frac{[L_{lié}]_{tot}}{[L]_{tot}}$$

Lorsque l'on considère la formation du complexe $PL \rightleftharpoons P + L$ correspondant la fixation d'un ligand L par une protéine P , la constante d'association apparente K'_a peut être définie par :

$$K'_a = \frac{[L_{lié}]_{tot}}{[L_{libre}]_{tot} \times [P_{libre}]_{tot}}$$

En combinant les deux dernières équations, la courbe d'anisotropie obtenue pour la formation d'un tel complexe peut être modélisée par l'équation :

$$r = r_{libre} + \frac{(r_{lié} - r_{libre})}{n} \times \left(\frac{(1 + K'_a \times (n \times [L]_{tot} + [P]_{tot})) - \sqrt{(1 + K'_a \times (n \times [L]_{tot} + [P]_{tot}))^2 - 4 \times n \times K'^2_a \times [L]_{tot} \times [P]_{tot}}}{2 \times K'_a \times [L]_{tot}} \right)$$

où $[L]_{tot}$ et $[P]_{tot}$ sont respectivement les concentrations totales en ligand en en protéine, et n la stœchiométrie du complexe. La valeur K'_a peut ainsi être déterminée, et la constante de dissociation apparente K'_d en être déduite par :

$$K'_d = \frac{1}{K'_a}$$

L'ensemble des mesures d'anisotropie a été réalisé à 20°C dans une cuve en quartz dont le puits mesure 1 mm par 1 cm. Tous les peptides testés étant marqués à la fluorescéine, la longueur d'onde d'excitation utilisée pour l'ensemble des expériences est de 470 nm, et la fluorescence émise sélectionnée grâce à un filtre jaune (495 nm).

Dans un premier temps, 200 µl d'une solution contenant uniquement du peptide fluorescent et du SAH (respectivement à 5 µM et 2 mM) dans les conditions de tampon de la protéine sont déposés dans la cuve, et une première mesure est réalisée afin de caractériser l'anisotropie du peptide en absence de CARM1 *libre*. Par la suite, des volumes précis d'une solution protéique concentrée contenant également du peptide fluorescent et du SAH (respectivement à 5 µM et 2 mM) sont ajoutés pour incrémenter de 10 µM la concentration en CARM1 dans la cuve. Après chaque ajout, le mélange CARM1/SAH/peptide est laissé à incuber pendant 5 minutes à 20°C, et une nouvelle mesure d'anisotropie est ensuite réalisée.

L'ensemble des mesures d'anisotropie sont ensuite compilées pour obtenir une courbe représentant la variation de l'anisotropie en fonction de la concentration en protéine. Ces données ont été ajustées à l'équation décrite précédemment grâce au logiciel Origin® afin de déterminer la valeur de K'_d , en considérant une stœchiométrie de 0,5 (un seul peptide par dimère).

4. SPECTROSCOPIE DE CORRÉLATION DE FLUORESCENCE (FCS)

Le principe de la FCS est d'observer le mouvement de diffusion d'une sonde fluorescente en solution. Une petite molécule, dont le mouvement est rapide, sera caractérisée par un temps de diffusion court, tandis qu'une molécule de taille plus importante, dont le mouvement est plus lent, sera caractérisée par un temps de diffusion plus long. Il est ainsi possible d'observer la formation d'un complexe en marquant l'un des membres avec une sonde fluorescente.

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) a été décrite pour la première fois dans les années 1970 [209-212]. La FCS est basée sur l'analyse des fluctuations d'intensité lumineuse au cours du temps résultant généralement de la diffusion d'un fluorophore au travers d'un petit volume. Ce dernier est défini par un faisceau laser focalisé et une ouverture confocale. Lorsqu'un fluorophore diffuse à l'intérieur du faisceau lumineux focalisé, un jet de photons est émis dû aux multiples cycles d'excitation/émission du même fluorophore. Si le fluorophore diffuse rapidement en dehors du volume, le jet de photons est de courte durée. Si le fluorophore diffuse plus lentement, ce dernier dure plus longtemps.

L'analyse de la corrélation entre les variations d'émissions lumineuses et le temps permet de déterminer le coefficient de diffusion du fluorophore [213].

Contrairement aux mesures d'intensité, où il est plus facile de faire des mesures sur des solutions concentrées en fluorophore, les mesures de FCS sont de meilleure qualité lorsqu'un petit nombre de fluorophore est observé. Pour détecter un petit nombre de fluorophore avec un faisceau laser focalisé, l'échantillon doit donc être dilué. Les échantillons étant dilués, le bruit de fond dû aux impuretés fluorescentes et à la dispersion de la lumière doit être supprimé par des éléments d'optique confocaux et un filtrage efficace.

Les mesures de FCS ont été réalisées sur un appareillage configuré par le laboratoire de « Biophotonique des interactions moléculaires et cellulaires » dirigé par Yves Mély [214, 215]. Celui-ci comprend un microscope inversé (Olympus® IX70) associé à un laser Ti:Sapphire à modes synchronisés, procurant une excitation deux-photons à 800 nm. Les photons émis sont détectés par une photodiode Avalanche (PerkinElmer Optoelectronics® APD SPCM-AQR-14-FC), et la fonction d'auto-corrélation normalisée $G(\tau)$ est directement calculée par un corrélateur ALV-5000E (ALV, Allemagne).

Les mesures ont été réalisées dans des plaques 96 puits noire à fond en verre (Porvair), en utilisant un volume de 50 μ l par puits et avec un point focal réglé environ 100 μ m au dessus du fond du puits. 100 collectes de FCS [216] d'une courte durée (5 secondes) ont été réalisées pour chaque échantillon contenant 300 nM de peptide marqué à la fluorescéine complétés par 9,7 μ M du même peptide non-marqué, en présence ou non de protéine (concentrations croissantes) et de SFG (2 mM). La puissance d'excitation était d'environ de 2,5 mW au niveau des échantillons. Cette condition a été montrée comme procurant le rapport signal/bruit optimal et minimisant le photoblanchiment de la sonde fluorescente [217]. Le volume d'excitation était d'environ 0,4 fl et le rapport des rayons axial/latéral d'environ 3. La fonction de corrélation $G(\tau)$ calculée à partir des fluctuations de fluorescence, a été modélisée par les équations suivantes (correspondant respectivement au modèles de diffusion à une et deux espèces) :

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \times \left[\frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \times \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{1}{s^2 \times \tau_D}}} \right]$$

$$G(\tau) = \left(\frac{1}{N_1 \times B_1 + N_2 \times B_2} \right)^2 \times \left\{ \left[N_1 \times B_1^2 \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D1}}\right)} \times \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{1}{s^2 \times \tau_{D1}}}} \right] + \left[N_2 \times B_2^2 \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D2}}\right)} \times \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{1}{s^2 \times \tau_{D2}}}} \right] \right\}$$

où τ est le retard de temps ; τ_D , τ_{D1} et τ_{D2} sont les temps de résidence moyens des espèces fluorescentes dans le volume focal ; N , N_1 , et N_2 sont le nombre moyen d'espèces fluorescentes diffusant au travers du volume d'excitation ; B_1 et B_2 sont la brillance des espèces fluorescentes ; s est le rapport des rayons axial/latéral du volume d'excitation.

Les constantes de diffusion du peptide libre $D_{peptide}$ et du peptide lié à la protéine $D_{complexe}$ ont été calculées à partir de l'équation :

$$D_{peptide} = D_{TMR} \times \frac{\tau_{D,TMR}}{\tau_{D,peptide}}$$

$$D_{complexe} = D_{TMR} \times \frac{\tau_{D,TMR}}{\tau_{D,complexe}}$$

où D_{TMR} est la constante de diffusion de la tétraméthyl-rhodamine (TMR), égale à $421 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [218] ; $\tau_{D, TMR}$ est le temps de diffusion moyen de la TMR dans le volume focal d'une solution aqueuse à 50 nM ; $\tau_{D, peptide}$ et $\tau_{D, complexe}$ sont respectivement les temps de diffusion moyens dans le volume focal du peptide seul et lié à la protéine en solution.

Le diamètre hydrodynamique R des particules en complexe a été calculé à partir de l'équation de Stokes-Einstein :

$$R = \frac{k \times T}{6\pi \times \eta \times D}$$

où k est la constante de Boltzmann ; T est la température ; η est la viscosité du solvant. Le rayon est relié à la masse moléculaire MW de la molécule avec une gravité spécifique ν par :

$$R = \sqrt[3]{\frac{3 \times MW \times \nu}{4\pi}}$$

montrant que le coefficient de diffusion est faiblement dépendant de la masse moléculaire. Enfin, le rapport entre les masses moléculaires du peptide lié à la protéine et du peptide libre est estimé par l'équation [219] :

$$\frac{MW_{complexe}}{MW_{peptide}} \cong \left(\frac{D_{complexe}}{D_{peptide}} \right)^3$$

Pour chaque expérience, une série de mesure a été réalisée pour le peptide seul, ainsi que pour le peptide en présence de différentes concentrations de protéine. Pour chaque échantillon, la proportion de peptide en complexe a été estimée grâce de la fonction d'auto-corrélation correspondant au modèle de diffusion à deux espèces. Afin de déterminer une

valeur de K_d , l'ensemble des données pour les différentes concentrations en protéine a ensuite été traité grâce au logiciel libre R [220], en modélisant les données expérimentales par l'équation dérivée de celle de Michaelis-Menten :

$$frac_i = \frac{frac_{max} \times [Peptide]_{tot}}{K_d + [Peptide]_{tot}}$$

où $frac_i$ est la fraction de complexe ; $frac_{max}$ est la fraction de complexe maximale, mesurée pour une concentration saturante en protéine, soit 1 ; $[Peptide]_{tot}$ est la concentration totale en peptide.

C. CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE

1. CARACTÉRISATION DE « L'EFFICACITÉ » D'UNE ENZYME : DÉTERMINATION DE K_M ET DE K_{CAT}

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de différentes constructions et mutants de CARM1 envers PABP1 et le SAM, des tests d'activité ont été réalisés. Cette technique consiste en la quantification de substrat [^{14}C]-méthylé formé lors de la réaction de méthylation par CARM1 à partir de SAM radioactif. Les réactions ont été réalisées à 25°C en présence de 200 nM de CARM1, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'albumine de sérum bovin (BSA) dans un tampon contenant 25 mM TrisHCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,25 mM EDTA et 0,25 mM β -mercaptoéthanol. Pour les tests d'activité visant à caractériser les paramètres cinétiques envers PABP1, les expériences ont été réalisées en présence de 21 μM de [^{14}C]-SAM $\text{mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$ (Perkin Elmer[®]) pour des concentrations en protéine de fusion GST-PABP1 allant de 0,2 μM à 140 μM afin d'assurer une accumulation linéaire de produit le temps de la réaction de méthylation. De la même manière, pour les tests d'activité visant à caractériser les paramètres cinétiques pour le SAM, les expériences ont été réalisées en présence de 50 μM de protéine de fusion GST-PABP1 pour des concentrations en SAM radioactif variant de 1 μM à 40 μM . La réaction a été initiée par ajout de l'enzyme CARM1 au milieu réactionnel, et a été arrêtée par addition de tampon de charge SDS-PAGE après 2, 5, 8 et 12 minutes pour chaque concentration en peptide ou SAM radioactif. Après séparation des différents composants du milieu réactionnel sur gel de polyacrylamide dénaturant 12%, le gel a été coloré avec du bleu de Coomassie, décoloré, séché sur du papier Whatman 3MM et exposé pendant 1 à 5 jours contre une plaque au phosphore activé GP2025 (Kodak). La quantité de radioactivité incorporée spécifiquement par la protéine GST-PABP1 a été quantifiée par analyse au « phosphorimager » (Typhoon[™] 2000, Molecular dynamics[®]). Les valeurs V_{max} et K_m ont été déterminées en modélisant l'équation de Michaelis-Menten sur les données expérimentales grâce au logiciel libre R [220] :

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

où $[S]$ est la concentration en substrat (PABP1 ou $[^{14}\text{C}]$ -SAM en fonction des cas). En effet, même si nous sommes dans le cas d'une réaction à deux substrats (A et B) à fixation aléatoire (Figure 5), l'expression de la vitesse de réaction peut-être simplifiée en considérant que dans les conditions de l'expérience la concentration d'un des deux substrats est toujours saturante. En effet, dans le cas d'une réaction à deux substrats à fixation aléatoire, la vitesse réactionnelle peut être exprimée comme suit :

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{k'_A}{[A]} + \frac{k'_B}{[B]} + \frac{k'_A \times k'_B}{[A] \times [B]}} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{k'_A}{[A]} + \frac{k'_B}{[B]} + \frac{k_A \times k'_B}{[A] \times [B]}}$$

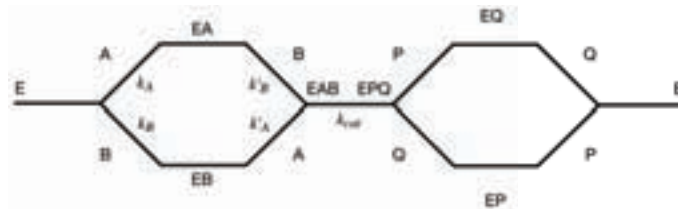


Figure 21 - Schéma de la cinétique d'une réaction à deux substrats à fixation aléatoire

avec k_A et k_B les constantes d'association des complexes EA et EB, k'_A et k'_B les constantes de dissociation. Si la concentration en substrat B est saturante, alors l'expression se simplifie :

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{k'_A}{[A]}} = \frac{V_{\max} \times [A]}{k'_A + [A]}$$

avec :

$$k'_A = K_m^A$$

La constante catalytique k_{cat} peut ensuite être déterminée grâce à la relation :

$$k_{cat} = \frac{V_{\max}}{[E]}$$

où $[E]$ est la concentration en enzyme (CARM1).

2. CARACTÉRISATION DU POUVOIR INHIBITEUR D'UN LIGAND : DÉTERMINATION D'IC₅₀

Le pouvoir inhibiteur des composés développés a été déterminé à l'aide de tests d'activité. 7,5 μM du tétramère d'histone (H3H4)₂, 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de BSA et 200 nM de CARM1 ou PRMT1 ont été pré-incubés pendant 30 minutes à température ambiante avec des concentrations croissantes de composés (de 0,5 μM à 2 mM) en présence de tampon contenant 50 mM TrisHCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 0,5 mM EDTA et 0,5 mM β -mercaptoéthanol. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 1 minute à 17000 g afin d'éliminer la protéine ayant pu précipiter. Puis la réaction a été initiée par l'ajout de 10 μM de ¹⁴C-SAM à 50 mCi.mmol⁻¹ (Perkin Elmer®). Après 20 minutes d'incubation à 25°C, la réaction a été stoppée par addition de 3 μl de tampon de charge SDS-PAGE et les échantillons analysés sur gel de polyacrylamide dénaturant 12%. Le gel a ensuite été coloré avec du bleu de Coomassie, décoloré, séché sur du papier Whatman 3MM, puis exposé 1 à 5 jours contre une plaque au phosphore activé GP2025 (Kodak). La quantité de radioactivité incorporée spécifiquement par les protéines H3 ou H4 a été quantifiée par analyse au « phosphorimager » (Typhoon™ 2000, Molecular dynamics®). Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées en modélisant une courbe de réponse dose-dépendante sigmoïde sur les données expérimentales grâce au logiciel libre R [220].

D. CARACTÉRISATION STRUCTURALE PAR DIFFRACTION DE CRISTAUX AU RAYONS X

Pour la cristallisation, les échantillons du domaine catalytique de mCARM1 (constructions 130-507, 130-497 ou 130-487) ont été préparés à 2 mg.ml⁻¹ dans les conditions de tampon suivantes : 100 mM TrisHCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol. Dans le cas de la co-cristallisation avec des ligands, ceux-ci ont tout d'abord été dissous dans l'eau, et leurs concentrations déterminées par mesure de la densité optique à 260 nm ($\epsilon = 15400 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Les ligands ainsi préparés ont ensuite été ajoutés à la solution protéique à des concentrations variant entre 500 μM et 2 mM. Afin d'éliminer la protéine instable pouvant se trouver en solution, les échantillons ont été incubés 1 heure à 37°C, puis centrifugés à 10000 g pendant 10 minutes.

Le domaine catalytique de mCARM1 a été cristallisé par la technique de diffusion de vapeur en gouttes suspendues. Cette technique consiste à mélanger sur une lamelle une goutte de protéine purifiée à une goutte de réservoir, contenant un agent précipitant et éventuellement des additifs. La lamelle est ensuite retournée au-dessus du réservoir, l'environnement étant fermé hermétiquement grâce à un anneau de paraffine liquide. Des échanges de vapeur entre la goutte et le réservoir permettent d'atteindre un équilibre entre les deux. Un état de sursaturation de la protéine dans la goutte sera progressivement atteint, la

nucléation sera ainsi favorisée. À mon arrivée dans l'équipe, la cristallisation du domaine catalytique de mCARM1 était déjà maîtrisée. Au cours de ce projet, différentes constructions du domaine catalytique de CARM1 (mCARM1₁₃₀₋₅₀₇, mCARM1₁₃₀₋₄₉₇, mCARM1₁₃₀₋₄₈₇), sauvages ou mutantes, ont été co-cristallisées avec différents ligands (cofacteur ou analogue de substrat). Différentes conditions de cristallisation ont été testées, en faisant varier la nature du tampon (TrisHCl, HEPES, BTP), la nature et la concentration de l'agent précipitant (PEG1500, PEG2000MME, PEG3350) ainsi que la concentration en sels (NaCl) autour d'une condition initiale contenant 100 mM TrisHCl pH8,0, 19% (w/v) PEG2000MME, 167 mM NaCl. Les gouttes ont été réalisées en mélangeant 1 µl de solution protéique à 2,0 mg.ml⁻¹ et contenant 1 à 2 mM de ligand, à 1 µl de la condition de cristallisation. Les gouttes et réservoirs ont ensuite été laissés à équilibrer à 17°C ou 24°C. Des cristaux sont généralement apparus au bout de quelques jours, avec une forme typique de « livre ouvert » (Figure 22).

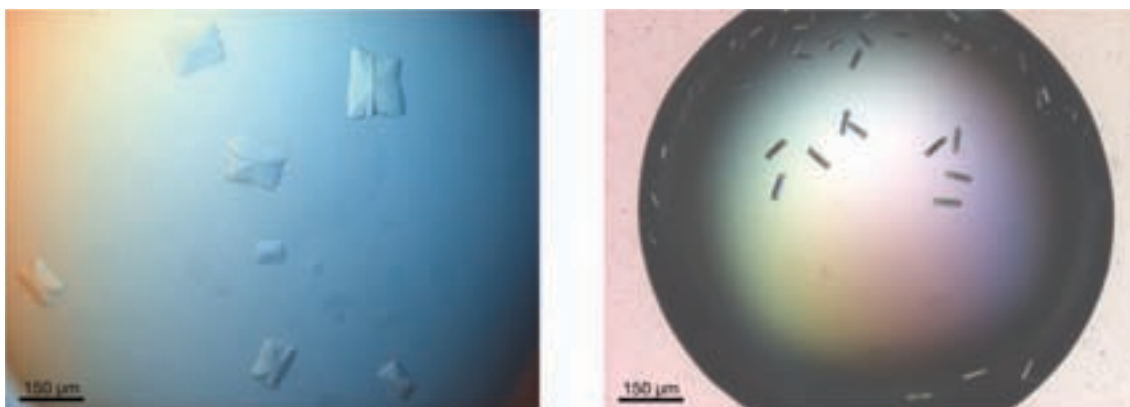


Figure 22 - Cristaux classiques de mCARM1₁₃₀₋₄₈₇

(A) Vue « à plat » des cristaux obtenus classiquement pour mCARM1₁₃₀₋₄₈₇.

(B) Vue « de côté » des cristaux obtenus classiquement pour mCARM1₁₃₀₋₄₈₇.

La collecte des données de diffraction aux rayons X étant réalisée sous flux d'azote gazeux à -180°C afin de minimiser les dommages dus aux rayonnements X, les cristaux ont été congelés au préalable par trempage dans l'azote liquide. Pour éviter la formation de cristaux de glace, les cristaux ont auparavant été transférés dans une solution de réservoir additionnée par 20% (v/v) PEG400, ce dernier étant cryo-protecteur à cette concentration. Étant donné la faible intensité de diffraction des cristaux obtenus pour le domaine catalytique de mCARM1 sur la source de rayons X du laboratoire, les données de diffraction ont dû être collectées sur des sources de rayonnement synchrotron, comme à l'ESRF (Grenoble) ou à SOLEIL (Gif-sur-Yvette). Étant donné la mauvaise qualité de diffraction des cristaux du domaine catalytique de CARM1, il était en général nécessaire de tester une dizaine de cristaux pour pouvoir collecter un jeu de données dont la résolution était inférieure à 3,0 Å. L'arrivée de la nouvelle génération de détecteurs PILATUS 6M (Dectris) a révolutionné la collecte de données de diffraction en cristallographie. Ces détecteurs, qui exploitent une technologie dite

« hybride-pixel » où les photons X sont directement convertis en signal électrique, marie une très grande dynamique et un très faible bruit de fond, avec un temps de lecture de l'ordre de quelques milli-secondes. Les statistiques de collectes de données pour les différentes structures qui seront présentées par la suite sont disponibles en annexes.

Les données de diffraction ont été soit indexées, intégrées et mises à l'échelle avec le logiciel HKL-2000 [221], soit indexées et intégrées avec XDS [222] en utilisant la suite autoPROC, et dans ce cas, la mise à l'échelle a été réalisée à l'aide du programme SCALA de la suite CCP4 [223]. En fonction des cristaux, les jeux de données pour le domaine catalytique de mCARM1 peuvent appartenir au groupe d'espace I222, au groupe d'espace P2₁2₁2, ou encore au groupe d'espace P2₁, avec des paramètres de maille proches de $a = 75 \text{ \AA}$, $b = 99 \text{ \AA}$ et $c = 206 \text{ \AA}$. Dans le cas du groupe d'espace I222, un dimère est retrouvé dans l'unité asymétrique, alors qu'un tétramère ou encore un octamère sont respectivement retrouvés dans le cas des groupes d'espace P2₁2₁2 et P2₁. Toutes les structures de CARM1 présentées par la suite ont été résolues par la méthode de remplacement moléculaire, en prenant comme référence la meilleure structure de CARM1 précédemment obtenue grâce au programme PHENIX [224]. Plusieurs cycles d'affinements ont ensuite été réalisés soit en utilisant Refmac [225] dans le cas des premiers jeux de données, soit grâce aux logiciels PHENIX [224] ou Buster [226]. Les cartes de densité électronique présentées dans l'ensemble du document sont toutes de type $|2mF_{obs} - DF_{model}|$ (abrégé « 2F_o-F_c ») [227]. Les statistiques de traitement et d'affinement des différentes structures qui seront présentées par la suite sont décrites en annexes.

**Études structurales de complexes
CARM1-analogues de substrats**

CHAPITRE III - ÉTUDES STRUCTURALES DE COMPLEXES CARM1-ANALOGUES DE SUBSTRATS

A. STRATÉGIE

Bien que plusieurs structures tridimensionnelles de PRMT soient connues et en dépit de nombreux travaux dans un domaine très compétitif à l'échelle internationale, très peu de connaissances structurales sont disponibles pour comprendre le mode de reconnaissance et de fixation d'un peptide substrat. Malgré les efforts fournis par notre équipe, aucune structure de CARM1 en complexe avec un substrat n'a pu être obtenue par cristallographie aux rayons X, que ce soit pour des substrats entiers ou sous forme de peptides courts ou long [159]. Cela est probablement dû à la faible stabilité de ces complexes ou au comportement oligomérique de CARM1 en solution, qui compliquent les études structurales.

Pour résoudre les difficultés d'identification et de visualisation de complexes CARM1/substrat, une nouvelle approche a été initiée, consistant à lier de façon covalente un substrat peptidique à une molécule analogue du cofacteur. Cette approche permettrait d'ancrer le substrat à la surface de CARM1 et ainsi de stabiliser le complexe, afin de faciliter les études structurales. Dans d'autres cas, un pontage covalent d'un substrat à un cofacteur s'est avéré comme une stratégie efficace pour capturer et caractériser des complexes enzyme-substrat peu stables. Ces molécules hameçons sont dérivées du SAM, puisque comme le montrent les structures de CARM1, la fixation du cofacteur induit une transition désordre/ordre, nécessaire à la structuration de la poche de fixation de l'arginine substrat [153].

En utilisant des approches complémentaires, des analogues et des mimes de l'état de transition de la réaction de méthylation, où un substrat/produit est lié à un analogue du cofacteur SAM, ont été conçus et synthétisés. La stratégie développée dans l'équipe s'est appuyée sur les structures tridimensionnelles de CARM1 pour définir les analogues et mimes de l'état de transition à synthétiser. L'approche a été structurée en 3 grandes phases correspondant à 3 classes de ligands : (i) des analogues du SAM (classe A), (ii) des analogues de l'état de transition de la réaction de méthylation entre le SAM et une arginine (classe B), (iii) des analogues hybrides du SAM lié à un peptide substrat (classe C) (Figure 23). Ces travaux sont le fruit d'une collaboration étroite avec l'équipe de chimistes dirigée par Alain Wagner, Directeur du laboratoire de « Synthèse bio-organique » de Strasbourg.

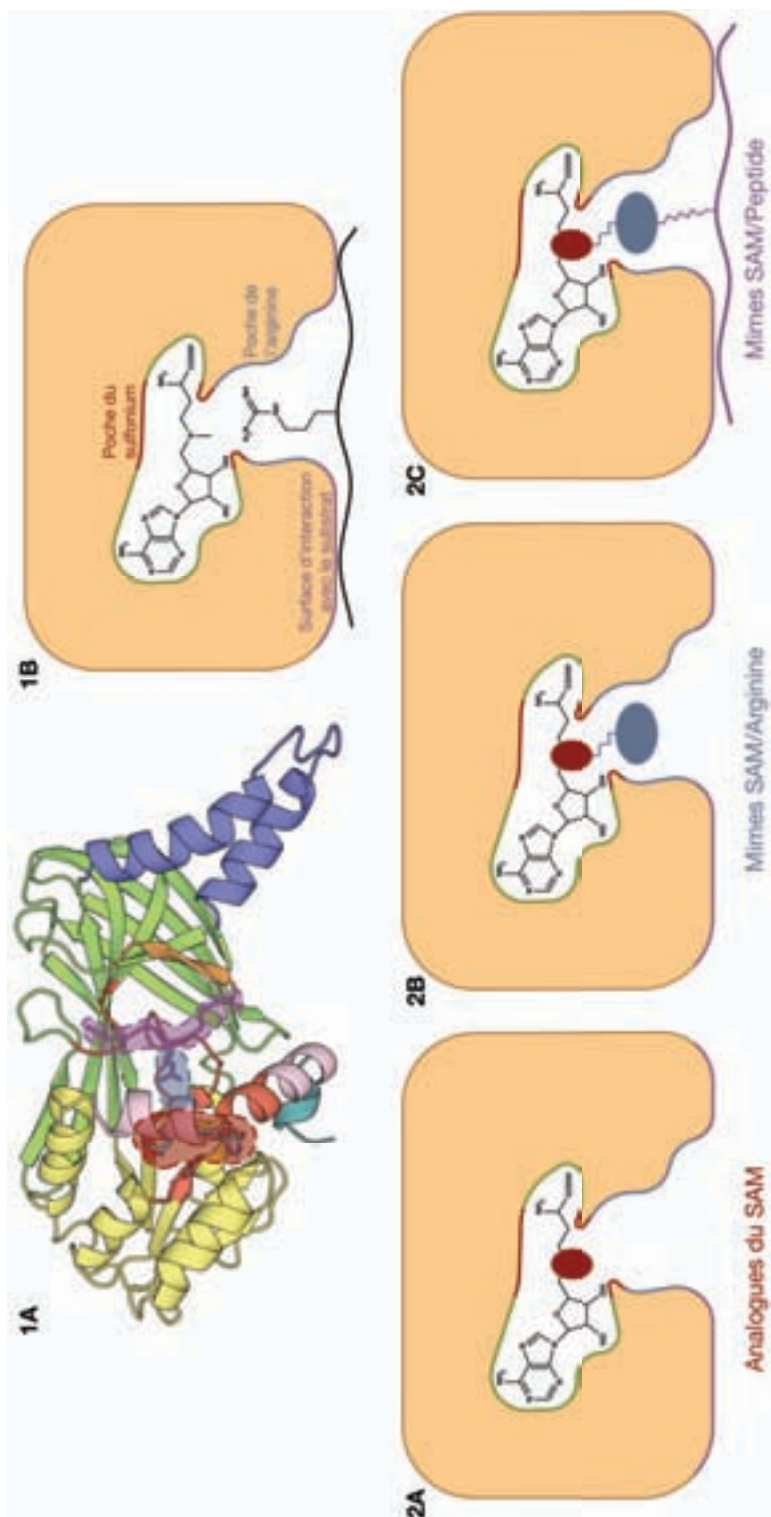


Figure 23 - Classes de ligands développées dans l'optique d'explorer les différentes poches de fixation des substrats de CARM1

(1A) et (1B) Trois régions du site actif peuvent être définies : (i) la poche du groupement sulfonium du SAM (en rouge), (ii) la poche de l'arginine substrat (en bleu), (iii) la surface d'interaction avec le substrat (en violet).

(2) Afin d'explorer ces 3 poches, 3 types de ligands ont été développés : (A) des analogues du SAM, permettant l'exploration de la poche du sulfonium, (B) des mimiques de l'état de transition SAM/Arginine permettant l'exploration de la poche de l'arginine, (C) des mimiques de l'état de transition SAM/Peptide permettant l'exploration de la surface d'interaction avec le substrat.

Cette approche comporte deux objectifs scientifiques majeurs : (i) révéler à l'échelle atomique les liens de coopérativité liant l'activité de méthylation et les reconnaissances macromoléculaires dans lesquelles la protéine CARM1 est impliquée ; (ii) découvrir des modulateurs de CARM1 pouvant donner lieu aux développements d'inhibiteurs spécifiques. En effet, l'implication des PRMT dans plusieurs cancers devient de plus en plus évidente [170], et même si de nombreuses études sont menées sur le développement d'inhibiteurs spécifiques des PRMT, aucune molécule montrant une efficacité *in vivo* n'a encore été trouvée. Les analogues et mimes qui ont été développés entrent en compétition avec le cofacteur SAM et pourraient ainsi servir de base pour la conception de nouveaux inhibiteurs spécifiques ou sélectifs d'une famille de PRMT donnée.

Un processus itératif combinant synthèse chimique, modélisation moléculaire et structure 3D de complexes a été utilisé pour améliorer la spécificité et la sélectivité des composés (Figure 24). Après leur synthèse, les composés ont d'abord été évalués par des méthodes biophysiques (Thermofluor® et microcalorimétrie), ainsi que par des tests d'inhibition compétitive. Les composés étant des analogues du cofacteur SAM, ils entrent en compétition avec ce dernier. La détermination de leur IC₅₀ a permis d'estimer leur affinité pour l'enzyme. Afin de déterminer leur sélectivité, ces tests d'inhibition compétitive ont également été réalisés sur PRMT1. Le produit secondaire de la réaction de méthylation SAH et l'inhibiteur naturel SFG ont été utilisés comme références, étant des inhibiteurs non-sélectifs des méthyltransférases connus. Les meilleurs composés ont ensuite été co-cristallisés avec CARM1, afin de caractériser structurellement le complexe CARM1/ligand. Les structures obtenues ont permis d'apprécier les modifications à apporter pour améliorer la fixation du ligand, et ainsi décider des nouvelles molécules à synthétiser.

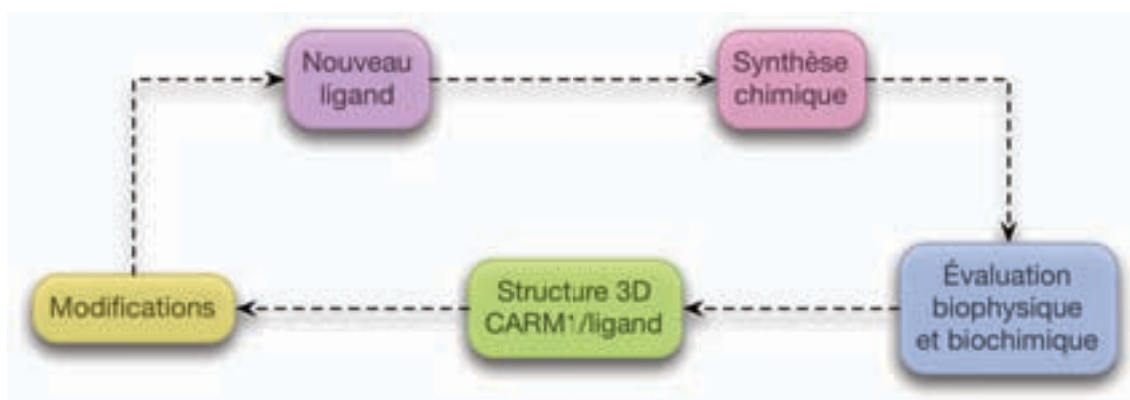


Figure 24 - Processus itératif d'amélioration de ligands

Une fois un nouveau ligand synthétisé, celui-ci est évalué par différentes méthodes biophysiques et biochimiques. Afin de caractériser précisément l'interaction entre le ligand et la protéine, la structure tridimensionnelle du complexe est résolue. Cette structure permet également de définir les modifications potentielles à apporter au ligand, afin d'améliorer son affinité et sa spécificité, étape clé du processus d'amélioration de ligands.

Ce chapitre est structuré selon les classes de ligands qui ont été développées. Dans un premier temps, les analogues du SAM seront présentés, suivi des mimes de l'état de transition SAM-arginine, et pour finir les mimes SAM-peptide. Pour chaque classe, les résultats des tests d'inhibition compétitives seront détaillés, et les structures cristallographiques des ligands en complexe avec CARM1 qui ont pu être résolues seront analysées. Un tableau récapitulatif reprenant tous les ligands conçus au cours de cette thèse est disponible en annexes.

B. ANALOGUES DU SAM

Les composés analogues du SAM ont été développés afin d'explorer la poche de fixation du groupement sulfonium du cofacteur SAM (Figure 25A), ainsi que le haut de la poche de fixation de l'arginine substrat (Figure 25A), où a lieu la réaction de méthylation. L'organisation structurale de cette poche est connue, grâce aux structures de CARM1 précédemment résolue en présence de SAH ou de SFG (Figure 25B).

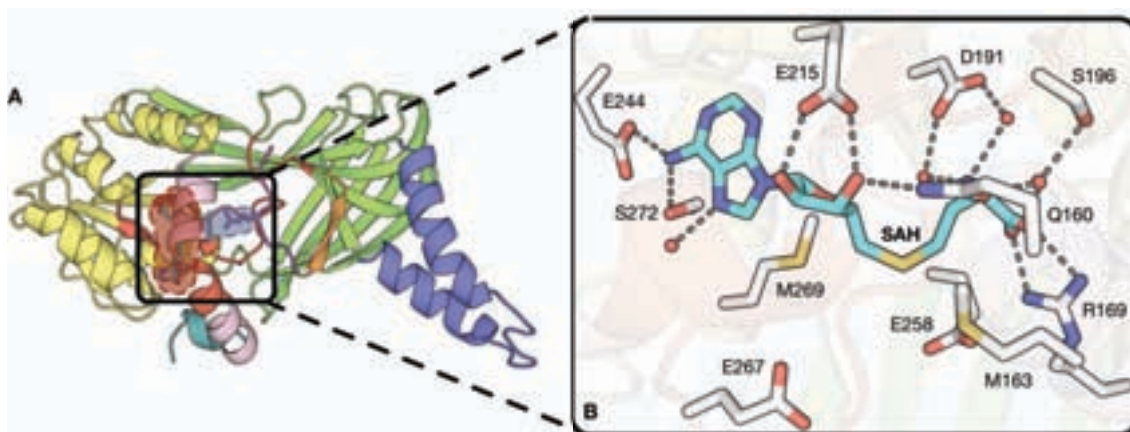


Figure 25 - Organisation structurale de la poche de fixation du cofacteur

(A) Situation de la poche de fixation du SAM et de l'arginine substrat.

(B) Organisation structurale de la poche de fixation du cofacteur. Le SAH est représenté en cyan, tandis que les résidus du site catalytique de CARM1 sont représentés en blanc. Figure issue de la structure CARM1_SAH (statistiques en annexes).

Les molécules analogues du SAM sont elles-mêmes séparées en deux types : (i) des molécules où seules des variations autour de l'atome de soufre sont réalisées, comme la modification du degré d'oxydation de celui-ci ou encore des modifications isostériques, (ii) une série d'analogues azotés, dont l'incorporation d'une petite extension, comme une chaîne hydrophobe/hydrophile ou encore un hétérocycle permettra l'exploration du haut de la poche de fixation de l'arginine substrat où a lieu la réaction de méthylation.

1. EXPLORATION DE LA POCHE DE FIXATION DU GROUPEMENT SULFONIUM

Afin de trouver la meilleure « base » pour le développement de ligands analogues du SAM ramifiés, différentes modifications du groupement sulfonium du SAM ont été évaluées. En effet, pour des questions de stabilité, l'atome de soufre ne peut pas être utilisé tel quel pour le développement de composés ramifiés. Il n'est pas non plus possible d'utiliser un atome de carbone comme dans la SFG, car cela pose problème pour la synthèse chimique. Les composés entrant en compétition avec le cofacteur SAM, leurs capacités d'inhibition ont donc été évaluées afin d'estimer leurs affinités et ainsi déterminer quel composé serait la meilleure base pour les étapes suivantes.

Deux types de modifications ont été réalisées : (i) des modifications du degré d'oxydation de l'atome de soufre (composés SA379 et SA505), (ii) des modifications isostériques, où l'atome de soufre est remplacé par un atome d'oxygène (composé SA377) ou de sélénium (composé SA372), ou encore par un atome d'azote (composés SA106, SA107, SA221, SA227, SA270 et SA920). L'ensemble de ces composés sont capables de se lier à la protéine CARM1, avec des constantes d'inhibition allant de 16 μM à plus de 1 mM (Tableau 7).

La mauvaise affinité de certains composés ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$), peut être expliquée soit par la présence probable de contacts stériques avec des résidus de la poche de fixation (comme pour le groupement carbonyle du composé SA106), soit par une mauvaise accommodation de l'atome substitué au soufre du SAM dans la poche de fixation (comme pour les composés SA372 et SA377, où l'atome de soufre du SAM est respectivement substitué par un atome de sélénium et d'oxygène).

Les composés dont le degré d'oxydation du soufre a été modifié (composés SA379 et SA505) montrent de mauvaises propriétés inhibitrices ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$). Ce résultat est étonnant, puisque des composés sont des inhibiteurs potentiels des ADN méthyltransférases et des phosphatidyléthanolamine méthylases SAM-dépendantes [228]. Le dernier type de composés, les composés portant une fonction amide, ont tous des constantes d'inhibition de l'ordre du μM , à l'exception du composé SA106. Il est à noter que le composé SA107 est un inhibiteur potentiel de CARM1 et de PRMT1 (IC_{50} de 37 μM et 31 μM respectivement), alors que de précédentes études ont montré qu'il n'affectait pas fortement l'activité des catéchol-O-méthyltransférases et des ARNt méthyltransférases ($\text{IC}_{50} > 1 \text{ mM}$) [229]. Ensemble, ces deux résultats mettent en évidence que même si les méthyltransférases SAM-dépendantes utilisent le même cofacteur et présentent une forte conservation en séquence, il est tout de même possible d'obtenir des inhibiteurs spécifiques en apportant de petites modifications au SAM.

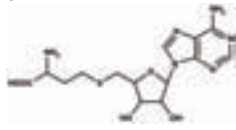
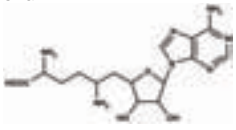
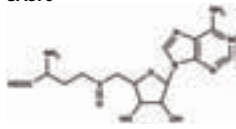
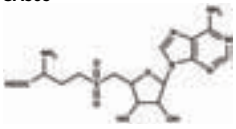
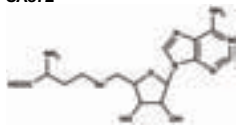
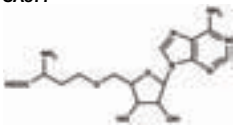
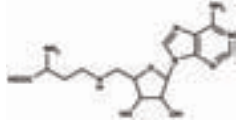
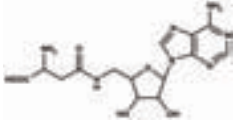
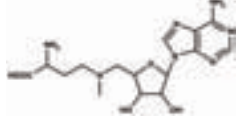
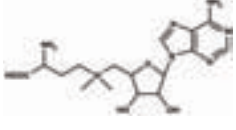
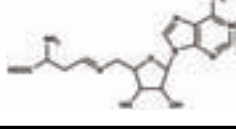
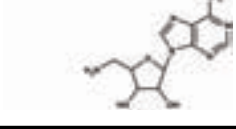
Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1	Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1
	CARM1	PRMT1			CARM1	PRMT1	
Références							
SAH 	0,9	1,34 ± 0,3	1,5	SFG 	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,9
Modification du degré d'oxydation du soufre							
SA379 	350 ± 33	ND ^[c]	-	SA505 	250 ± 50	ND ^[c]	-
Modifications isostériques							
SA372 	600 ± 50	ND ^[c]	-	SA377 	> 1 mM	ND ^[c]	-
SA107 	37 ± 5	31 ± 5	0,8	SA106 	> 1 mM	ND ^[c]	-
SA221 	158 ± 52	> 2 mM	> 12,7	SA227 	75 ± 5	> 2 mM	> 26,7
SA270 	27 ± 9	200 ± 20	7,4	SA920 	16 ± 2	380 ± 44	20,9

Tableau 7 - Capacité d'inhibition (IC₅₀) des analogues du SAM occupant la poche de fixation du groupement sulfonium pour CARM1 et PRMT1

[a] Le tétramère d'histone (H3H4)₂ a été utilisé comme substrat et du SAM ¹⁴C comme donneur de méthyle.

[b] Les valeurs présentées sont les résultats moyens d'au moins 2 expériences avec comme erreur la déviation standard (DS) correspondante.

[c] Non déterminé. Lorsque l'inhibition vis-à-vis de CARM1 était moyenne, les tests d'inhibition compétitive n'ont pas été réalisés pour PRMT1.

De façon surprenante, le composé SA920, qui est similaire à un produit de dégradation du SAM [230], est le composé possédant la meilleure affinité pour CARM1 (IC₅₀ = 16 μM). Il est d'autant plus surprenant que cette affinité n'est pas aussi bonne pour PRMT1 (IC₅₀ = 380 μM). Cependant, c'est le composé SA221, dont l'affinité pour CARM1 est relativement correcte (IC₅₀ = 158 μM), qui a été sélectionné comme molécule de base pour le développement de nouvelles molécules visant à explorer la poche de fixation de l'arginine substrat, cette molécule

étant celle offrant le plus de possibilités en terme de stratégie de synthèse (comparativement aux composés SA107, SA227, SA270 et SA920).

2. EXPLORATION DE LA POCHE DE FIXATION DU GROUPEMENT GUANIDINIUM DE L'ARGININE SUBSTRAT

À partir du composé SA221, deux types de ligands possédant une ramification supplémentaire au niveau de l'atome d'azote furent synthétisés : (i) des composés à chaîne hydrophobe ou hydrophile, (ii) des ligands à hétérocycle. Ces ligands ont ensuite pu être triés en 4 classes, en fonction de leur capacité et spécificité d'inhibition envers CARM1 (Tableau 8) : (i) des ligands ayant un fort pouvoir inhibiteur spécifique de CARM1 (composés SA268, SA435 et SA580), (ii) des ligands ayant une inhibition moyenne envers CARM1, mais dont la spécificité est conservée (composés SA269, SA275, SA599 et SA930), (iii) des ligands ayant une bonne inhibition pour CARM1 mais également pour PRMT1 (composés SA678 et SA707), (iv) des ligands dont l'inhibition envers CARM1 est faible (composés SA814, SA838 et SA842). Il faut noter que dans une étude précédente [201], le composé SA707 n'inhibait pas CARM1, alors que selon nos travaux c'est au contraire un assez bon inhibiteur de CARM1 ($IC_{50} = 30 \mu M$). L'évaluation de la cytotoxicité de l'ensemble de ces composés sur des lignées cellulaires de cancer du sein (MCF7) a montré que ceux-ci n'avaient pas d'effet cytotoxique (viabilité de 90% à 250 μM pour tous les composés) (Travaux réalisés par Phytodia).

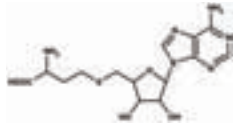
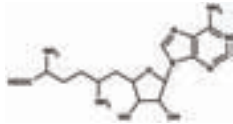
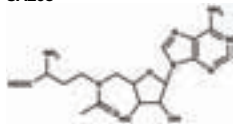
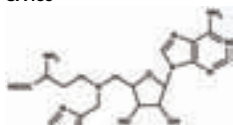
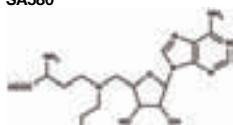
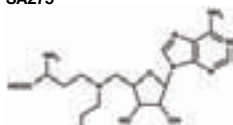
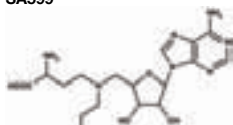
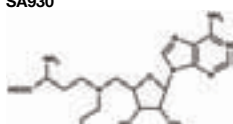
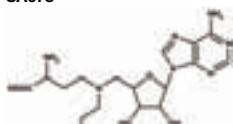
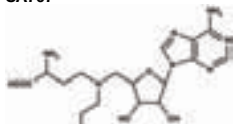
Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1	Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1
	CARM1	PRMT1			CARM1	PRMT1	
Références							
SAH 	0,9	1,34 ± 0,3	1,5	SFG 	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,9
Bonne inhibition de CARM1 (IC₅₀ < 50μM) et mauvaise inhibition de PRMT1 (IC₅₀ > 200μM)							
SA268 	50 ± 5	367 ± 12	7,3	SA435 	43 ± 24	294 ± 82	6,8
SA580 	20 ± 12	825 ± 164	41,3				
Moyenne inhibition de CARM1 (50 μM < IC₅₀ < 200μM) et mauvaise inhibition de PRMT1 (IC₅₀ > 200μM)							
SA275 	76 ± 11	290 ± 50	4,5	SA599 	115 ± 14	757 ± 38	6,6
SA930 	137 ± 5	260 ± 13	1,8				
Bonne inhibition de CARM1 et de PRMT1 (IC₅₀ < 50μM)							
SA678 	5 ± 1	22 ± 7	4,4	SA707 	30 ± 10	32 ± 4	1,1

Tableau 8 - Capacité d'inhibition (IC₅₀) des analogues du SAM occupant la poche de fixation du groupement guanidinium pour CARM1 et PRMT1

[a] Le tétramère d'histone (H3H4)₂ a été utilisé comme substrat et du SAM ¹⁴C comme donneur de méthyle.

[b] Les valeurs présentées sont les résultats moyens d'au moins 2 expériences avec comme erreur la déviation standard (DS) correspondante.

[c] Non déterminé. Lorsque l'inhibition vis-à-vis de CARM1 était moyenne, les tests d'inhibition compétitive n'ont pas été réalisés pour PRMT1.

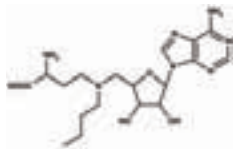
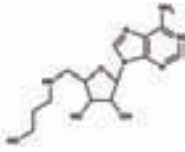
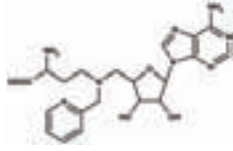
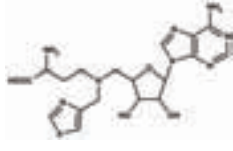
Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1	Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1
	CARM1	PRMT1			CARM1	PRMT1	
Moyenne ou mauvaise inhibition de CARM1 (IC ₅₀ > 50μM)							
SA269	120 ± 22	ND ^[c]	-	SA814	703 ± 80	ND ^[c]	-
							
SA838	621 ± 50	ND ^[c]	-	SA842	409 ± 40	ND ^[c]	-
							

Tableau 8 - Capacité d'inhibition (IC₅₀) des analogues du SAM occupant la poche de fixation du groupement guanidinium pour CARM1 et PRMT1 (suite)

Ces ligands ramifiés ont permis de mettre en évidence que la poche où a lieu la méthylation du groupement guanidinium de l'arginine substrat offre un environnement assez contraint, avec peu de libertés. Comme le montre la structure de CARM1, cette poche est relativement polaire, avec des charges négatives apportées par les 2 résidus glutamate du motif III conservés au sein des PRMT (E258 et E267 chez mCARM1) et de 2 groupements carbonyle de la chaîne principale (E258 et M260) (Figure 26A). Cette caractéristique de la poche explique les différences d'affinité observées entre les composés SA580, SA599 et SA930. Ces composés se distinguent par le nombre d'atomes d'oxygène présents au niveau de leur ramification, qui peuvent être substitués par des atomes d'azote (nombre d'atomes d'azote : SA930 (0) < SA599 (1) < SA580 (2)). La substitution d'un atome d'oxygène par un atome d'azote permet d'apporter un donneur de liaison hydrogène supplémentaire, ce qui favorise les contacts avec la poche de fixation de l'arginine de CARM1, et améliore l'affinité du composé (IC₅₀ : SA580 (20 μM) < SA599 (115 μM) < SA930 (137 μM)) (Tableau 8). La même observation peut être faite pour les composés SA275 et SA707 : la substitution de l'atome d'oxygène terminal de la ramification du composé SA275 par un atome d'azote dans le composé SA707 permet d'améliorer l'affinité de ce dernier (IC₅₀ respectifs de 76 μM et 30 μM) (Tableau 8). L'étroitesse de la poche de fixation de l'arginine impose également des contraintes stériques importantes, ce qui explique la mauvaise inhibition des composés possédant des hétérocycles (SA838 et SA842).

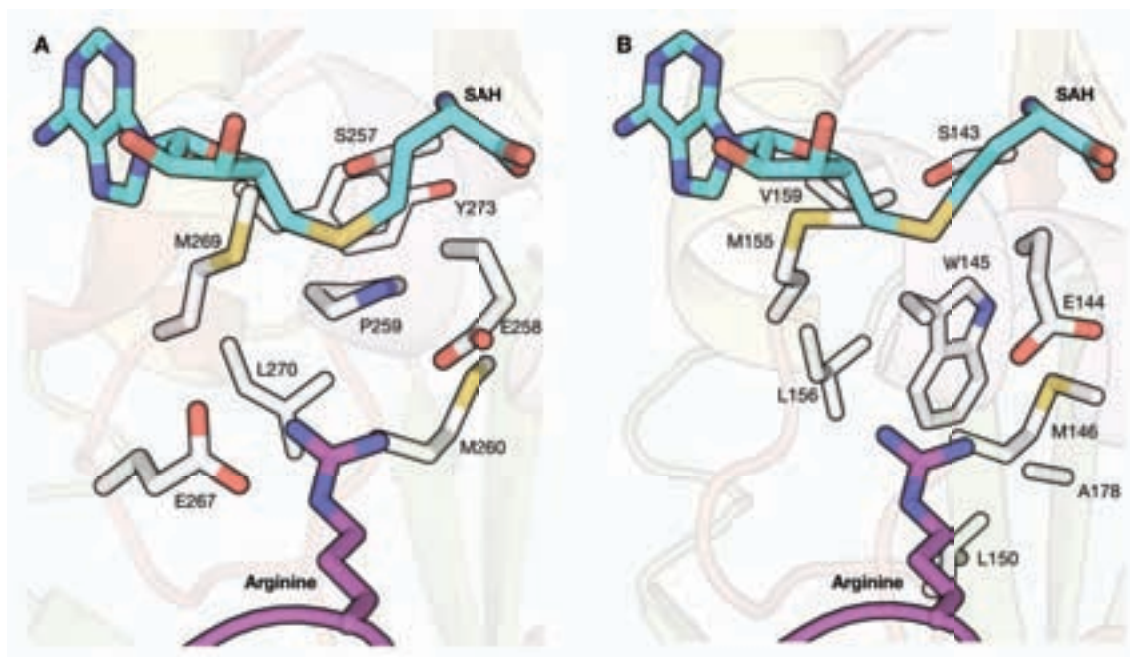


Figure 26 - Modèle de la poche de fixation du groupement guanidinium chez CARM1 et PRMT1

La poche de fixation du groupement guanidinium de l'arginine substrat (en violet) débouche sur l'atome de soufre du SAH (en cyan). Les résidus du site catalytique sont représentés en blanc.

(A) Poche de fixation du groupement guanidinium chez CARM1. Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å de la proline P259 sont représentés.

(B) Poche de fixation du groupement guanidinium chez PRMT1. Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du tryptophane W145 sont représentés.

Les composés dont l'affinité est bonne pour CARM1 ($IC_{50} < 50 \mu M$) mais mauvaise pour PRMT1 ($IC_{50} > 200 \mu M$) ont permis de mettre en évidence que la relativement bonne conservation des résidus de la poche de fixation de l'arginine n'empêche pas d'avoir des ligands spécifiques. Une des différences majeures des 2 poches se situe au niveau du motif III, où le résidu proline de CARM1 (P259) est remplacé par un résidu tryptophane chez PRMT1 (W145) ainsi que chez les autres PRMT (Figure 26B) (alignements de séquences en annexes). Cette proline impose une organisation particulière de la 2^e couche de résidus de la poche. L'environnement autour de cette proline dans CARM1 et son équivalent autour du tryptophane dans PRMT1 varie significativement. La structure de CARM1 semble capable d'accueillir des composés tels que le SA435 ($IC_{50} = 43 \mu M$) et le SA580 ($IC_{50} = 20 \mu M$), alors que PRMT1 possède un environnement plus rigide et moins prompt à former un réseau de liaisons hydrogène adéquat (IC_{50} des composés SA435 et SA580 respectivement de 294 μM et 757 μM).

3. CARACTÉRISATION BIOPHYSIQUE

En plus des tests d'inhibition compétitive, 2 autres méthodes biophysiques ont été utilisées pour caractériser l'affinité de CARM1 pour les composés synthétisés : le Thermofluor® et la microcalorimétrie (ITC). Le Thermofluor® permet de définir l'effet de la fixation d'un ligand

sur la stabilité thermique d'une protéine, alors que la microcalorimétrie permet de définir précisément les paramètres thermodynamiques de la fixation, tels que la constante d'association (K_a), la stœchiométrie (n) et l'enthalpie (ΔH).

a. Thermofluor®

Le Thermofluor® a été envisagé comme méthode de criblage rapide des différents composés synthétisés, afin de déterminer les molécules les plus efficaces. Il a été montré que la fixation d'une molécule au niveau d'une protéine se traduisait généralement par une augmentation de la stabilité thermique de la protéine [231]. Cette augmentation devrait être augmentée avec l'affinité de la protéine pour le composé. Ceci a été vérifié avec les molécules de référence (SAH et SFG) qui ont un effet positif sur la stabilité de CARM1 (T_m de l'apoprotéine : 56°C), comme le montre l'augmentation du T_m (respectivement +4,7°C et +9,0°C) (Tableau 9). La quasi-totalité des ligands présentés auparavant a été testée avec la protéine CARM1, afin de voir l'effet de leur fixation sur la stabilité de la protéine. Les résultats obtenus en Thermofluor® sont assez difficiles à interpréter. En effet, des composés montrant une bonne capacité d'inhibition ($IC_{50} < 50 \mu M$) n'ont pas pour autant un effet positif sur la stabilité de la protéine, certains ayant même plutôt tendance à la déstabiliser (Tableau 9).

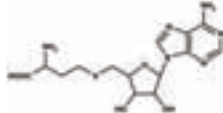
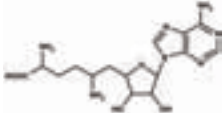
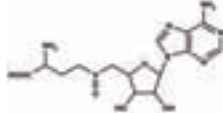
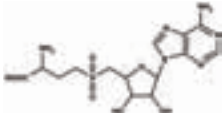
Composé	$IC_{50} \pm DS$ (μM) [a][b]	Effet sur la stabilité de la protéine (Variation du T_m)	Composé	$IC_{50} \pm DS$ (μM) [a][b]	Effet sur la stabilité de la protéine (Variation du T_m)
Références					
SAH 	0,9	Stabilisation (+ 4,7°C à 2,0 mM)	SFG 	0,7 ± 0,3	Forte stabilisation (+ 9,0°C à 2,0 mM)
Modification du degré d'oxydation du soufre					
SA379 	350 ± 33	Forte déstabilisation (- 7,5°C à 2,0 mM)	SA505 	250 ± 50	Forte déstabilisation (- 6,0°C à 2,0 mM)

Tableau 9 - Effet de la fixation d'analogues du SAM sur la stabilité thermique de la protéine CARM1

[a] Le tétramère d'histone (H3H4)₂ a été utilisé comme substrat et du SAM ¹⁴C comme donneur de méthyle.

[b] Les valeurs présentées sont les résultats moyens d'au moins 2 expériences avec comme erreur la déviation standard (DS) correspondante.

[c] Non déterminé.

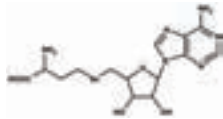
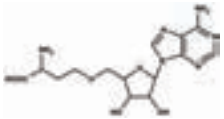
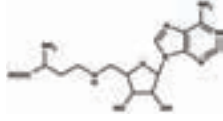
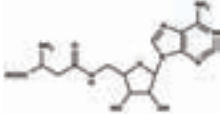
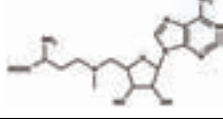
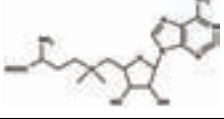
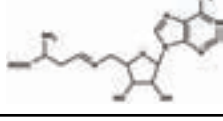
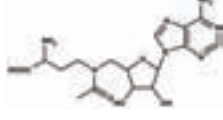
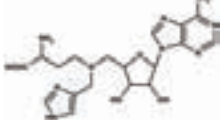
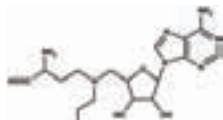
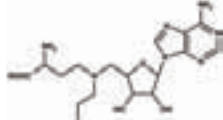
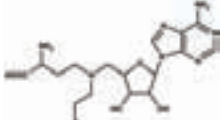
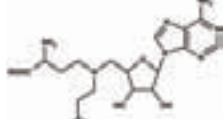
Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) [a][b]	Effet sur la stabilité de la protéine (Variation du T _m)	Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) [a][b]	Effet sur la stabilité de la protéine (Variation du T _m)
Modifications isostériques					
SA372 	600 ± 50	Très forte déstabilisation (- 4,0°C à 0,1 mM)	SA377 	> 1 mM	Très forte déstabilisation (- 16,5°C à 2,0 mM)
SA107 	37 ± 5	Déstabilisation (- 3,5°C à 2,0 mM)	SA106 	> 1 mM	Déstabilisation (- 4,0°C à 2,0 mM)
SA221 	158 ± 52	Très forte déstabilisation (- 18,0°C à 2,0 mM)	SA227 	75 ± 5	Très forte déstabilisation (- 21°C à 1,0 mM)
SA270 	27 ± 9	Très forte déstabilisation (- 24,0°C à 2,0 mM)			
Bonne inhibition de CARM1 (IC₅₀ < 50μM) et mauvaise inhibition de PRMT1 (IC₅₀ > 200μM)					
SA268 	50 ± 5	ND ^[c]	SA435 	43 ± 24	Peu ou pas d'effet (+ 1,0°C à 2 mM)
SA580 	20 ± 12	Forte déstabilisation (- 7,5°C à 2,0 mM)			
Moyenne inhibition de CARM1 (50 μM < IC₅₀ < 200μM) et mauvaise inhibition de PRMT1 (IC₅₀ > 200μM)					
SA275 	76 ± 11	Forte déstabilisation (- 5,3°C à 2,0 mM)	SA599 	115 ± 14	Peu ou pas d'effet (- 0,5°C à 2 mM)
SA930 	137 ± 5	ND ^[c]			

Tableau 9 - Effet de la fixation d'analogues du SAM sur la stabilité thermique de la protéine CARM1 (suite)

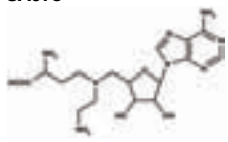
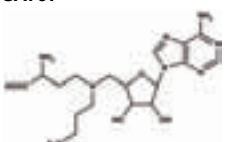
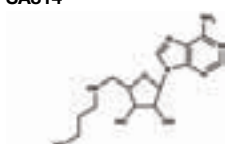
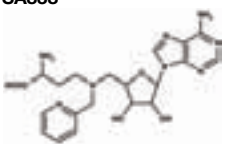
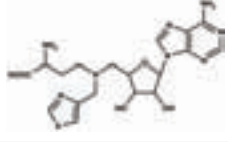
Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}	Effet sur la stabilité de la protéine (Variation du T _m)	Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}	Effet sur la stabilité de la protéine (Variation du T _m)
Bonne inhibition de CARM1 et de PRMT1 (IC₅₀ < 50μM)					
SA678 	5 ± 1	ND ^[c]	SA707 	30 ± 10	Forte déstabilisation (- 9,0°C à 2,0 mM)
Mauvaise inhibition de CARM1 (IC₅₀ > 200μM)					
SA814 	703 ± 80	ND ^[c]	SA838 	621 ± 50	Peu ou pas d'effet (+ 0,5°C à 2 mM)
SA842 	409 ± 40	Déstabilisation (- 3,5°C à 2,0 mM)			

Tableau 9 - Effet de la fixation d'analogues du SAM sur la stabilité thermique de la protéine CARM1 (suite)

Aucune des molécules analogues du SAM testées en Thermofluor[®] ne semble posséder la capacité de stabilisation du SAH ou de la SFG, puisque celles-ci ont un effet neutre ou négatif sur la stabilité de CARM1 (variation de T_m allant de +1,0°C à -24°C) (Tableau 9). La fixation d'un ligand déstabilisant la protéine n'est pas décrite dans la littérature. Ce que nous observons peut donc être la conséquence soit d'une contamination par une molécule dénaturante, soit d'un mécanisme de reconnaissance plus complexe, impliquant une réorganisation du site de fixation.

Pour les composés ayant une mauvaise capacité d'inhibition (IC₅₀ > 200 μM), cette observation est compréhensible. Comme il a été expliqué auparavant, le site catalytique de CARM1 offre un environnement très contraint. La présence de groupements volumineux ou chargés négativement sur les ligands n'est pas compatible avec cet environnement et doit donc déstabiliser la protéine lorsqu'ils se fixent. Cependant, pour les composés dont la capacité d'inhibition est bonne (IC₅₀ < 50 μM), il est plus difficile d'expliquer cette absence de stabilisation de CARM1 (composés SA435, SA580 et SA707). Ces composés possèdent des groupements amine, interagissant avec les charges négatives du site actif, et leur conférant ainsi une bonne capacité d'inhibition en comparaison aux autres composés. Cependant, en comparaison aux références SAH et SFG, l'addition d'une extension (cycle ou chaîne carbonée) doit être à l'origine d'une réorganisation partielle du site catalytique. Cette

réorganisation serait à l'origine d'une certaine déstabilisation de la protéine, pouvant être plus ou moins compensée par l'effet positif des groupements amine présents dans l'extension du composé.

Nous espérons pouvoir utiliser le Thermofluor® comme méthode de criblage rapide des composés, mais la difficulté d'interprétation des résultats ne le permet malheureusement pas.

b. Microcalorimétrie (ITC)

En complément des tests d'inhibition qui permettent de définir des valeurs d'IC₅₀ pour les composés, nous nous sommes intéressés à la microcalorimétrie (ITC), qui nous aurait permis de définir les constantes de dissociation (K_d) correspondantes. L'ITC est une technique permettant de mesurer directement la constante d'association (K_a), la stœchiométrie (n) et l'enthalpie (ΔH) associées à la réaction d'association d'un complexe. Le K_d , l'énergie libre (ΔG) et l'entropie (ΔS) peuvent ensuite en être déduits.

Des tests préliminaires ont été réalisés sur des molécules de référence (SAM, SAH et SFG). Les courbes obtenues pour l'ensemble des expériences ne correspondent pas à la courbe en « S » classique de ce type d'interaction (Tableau 10). Les valeurs de K_d calculées pour ces ligands sont moyennes en comparaison avec ce qui a pu être publié (de l'ordre de la dizaine de μM dans nos expériences alors qu'elles sont de l'ordre du μM dans la littérature) (Tableau 10) [160]. Ceci peut être expliqué par l'absence du premier plateau, ce qui entraîne une incertitude sur la détermination des paramètres thermodynamiques. Hormis les valeurs de K_d , les valeurs de stœchiométrie sont également problématiques : elles varient d'un cas à l'autre et sont toujours inférieures à 1 (0,23 pour le SAM, 0,44 pour le SAH et 0,78 pour la SFG) (Tableau 10).

Deux explications aux erreurs de mesure peuvent être proposées : (i) les concentrations de CARM1 et de ligands utilisées sont fausses, (ii) l'échantillon est de mauvaise qualité (agrégé, mal purifié). Dans notre cas, il semblerait que l'échantillon soit sensible aux conditions expérimentales (1 heure à 24°C sous agitation), car en fin d'expérience du précipité était toujours retrouvé dans la cellule de mesure. Plusieurs températures ayant été testées, il semblerait que ce soit l'agitation constante pendant le temps de l'expérience qui soit à l'origine de cette agrégation. D'autres raisons, spécifiques à CARM1, pourraient également expliquer l'erreur sur les mesures : (i) malgré la saturation en ligand, tous les sites de CARM1 ne sont pas occupés, (ii) du SAM ou SAH endogène est toujours présent dans certains sites de la protéine après purification, (iii) CARM1 étant organisée sous forme d'oligomères, les différents sites ne sont pas équivalents et fixent différemment le cofacteur. Cette hypothèse est

soutenue par les analyses en spectrométrie de masse qui montrent une organisation tétramérique de CARM1, au sein duquel l'occupation des sites catalytiques est très variable.

	SAM	SAH	SFG
Protéine utilisée	AgCARM1 ₁₋₅₀₉ WT	mCARM1 ₁₃₀₋₅₀₇ WT	AgCARM1 ₁₋₅₀₉ WT
Courbe expérimentale [a]			
Courbe après intégration [b]			
N	0,262 ± 0,007 sites de fixation	0,444 ± 0,008 sites de fixation	0,478 ± 0,019 sites de fixation
K_a	22900 ± 410 M	49300 ± 2060 M ⁻¹	77390 ± 11370 M ⁻¹
K_d	43,7 ± 0,8 µM	20,3 ± 0,8 µM	12,92 ± 1,90 µM
ΔG	-2626 ± 47 cal.mol ⁻¹	-2827 ± 118 cal.mol ⁻¹	-3013 ± 443 cal.mol ⁻¹
ΔH	-45480 ± 1306 cal.mol ⁻¹	-15920 ± 375 cal.mol ⁻¹	-34770 ± 1858 cal.mol ⁻¹
ΔS	-141,4 ± 4,0 cal.mol ⁻¹ .deg ⁻¹	-43,2 ± 1,1 cal.mol ⁻¹ .deg ⁻¹	-102,4 ± 6,2 cal.mol ⁻¹ .deg ⁻¹

Tableau 10 - Caractérisation de l'association de CARM1 avec différents ligands par ITC.

Pour les cofacteurs testés (SAH et SFG), la courbe expérimentale^[a] ainsi que la courbe des données après intégration^[b] sont représentées. Les constantes cinétiques déterminées directement (stœchiométrie N, constante d'association K_a et enthalpie ΔH) ou indirectement (constante de dissociation K_d, énergie libre ΔG et entropie ΔS) à partir des données expérimentales sont détaillées en dessous.

[a] Courbe de mesure expérimentale. Chaque pic correspond à une injection de cofacteur dans la cuve échantillon contenant CARM1.

[b] Courbe des données après intégration.

Bien que nous ayons testé différentes conditions expérimentales, en variant le tampon de la protéine, la température et la vitesse d'agitation au cours de l'expérience, du précipité était toujours retrouvé dans la cellule de mesure en fin d'expérience. Les courbes expérimentales ne nous permettant pas de caractériser correctement l'affinité des différentes

molécules de référence, nous n'avons finalement pas utilisé cette méthode pour les différents composés synthétiques.

4. CARACTÉRISATION STRUCTURALE

Sur les 22 composés analogues du SAM, 14 composés ont été co-cristallisés avec CARM1. Comme indiqué dans le chapitre « Matériel et méthodes », les essais de co-cristallisation du domaine catalytique de mCARM1 ont été réalisés avec 1 à 2 mM de composé. Étant donné la faible qualité de diffraction des cristaux du domaine catalytique de mCARM1, les données de diffraction aux rayons X ont été collectées aux synchrotrons SOLEIL (Gif-sur-Yvette) ou à l'ESRF (Grenoble). Dans un premier temps, les cartes de densité ont été affinées à partir d'un modèle de mCARM1 sans cofacteur, afin de ne pas biaiser l'affinement. La structure de seulement 5 analogues du SAM a ainsi pu être résolue. Dans les structures de mCARM1, l'occupation des sites étant différente d'une sous-unité à l'autre, les structures qui vont être présentées par la suite correspondent à la sous-unité où le composé est le mieux défini.

L'un de ces composés est le ligand SA920, mimant un produit de dégradation du SAM (Figure 27). La structure (résolution : 2,7 Å ; R_{free} : 23,0% ; statistiques en annexes) montre que ce composé s'adapte parfaitement à la poche de fixation de l'adénosine de cofacteur : l'adénine est stabilisée de manière habituelle par les résidus E244 et S272, tandis que le ribose, en plus d'interagir avec le résidu E215, est stabilisé davantage par une molécule d'eau se trouvant dans le site actif. Au vu des données cristallographique, il est compréhensible que le composé SA920 ait une bonne affinité pour CARM1 ($IC_{50} = 16 \mu\text{M}$).

Les structures de 3 composés à chaîne hydrophobe ou hydrophile ont également pu être résolue : (i) le composé SA678 dont la ramification comporte 2 atomes de carbone suivis d'un groupement amine terminal, (ii) le composé SA707 dont la ramification comporte 3 atomes de carbone suivis d'un groupement amine terminal, (iii) le composé SA269 dont la ramification est constituée de 4 atomes de carbone. La structure du composé SA678 (résolution : 2,25 Å ; R_{free} : 24,8% ; statistiques en annexes) est parfaitement définie dans le site catalytique (Figure 28). La partie SAM est bien ancrée dans la poche : les résidus E244, S272 et E215 stabilisent l'adénosine, tandis que les résidus D191 et R169 interagissent avec l'extrémité de la partie acide aminé. La ramification de ce composé est également bien stabilisée, grâce à un réseau de liaisons hydrogène émanant du groupement amine terminal et impliquant des molécules d'eau. L'extrémité de la ramification est ainsi solidement ancrée par les résidus E258, E267, Y150, Y154 et W416.

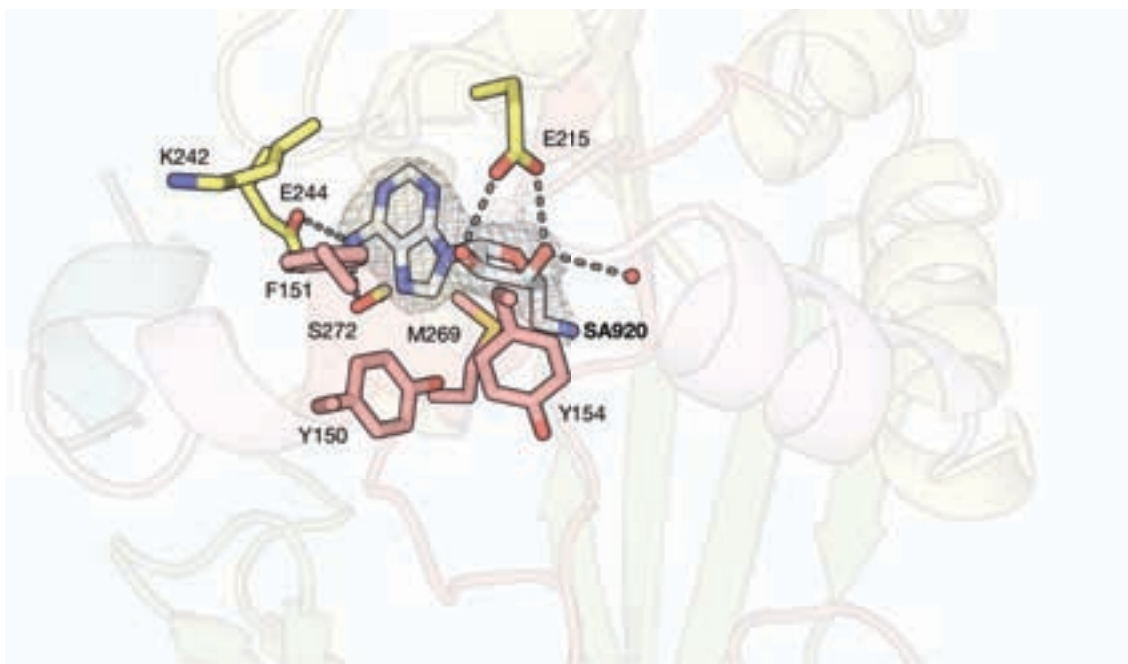


Figure 27 - Structure du composé SA920 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement du composé SA920 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II ou III (en saumon), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du composé sont représentés. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour du composé) avec un contourage à 1,0 σ . Figure issue de la structure CARM1_SA920 (statistiques en annexes).

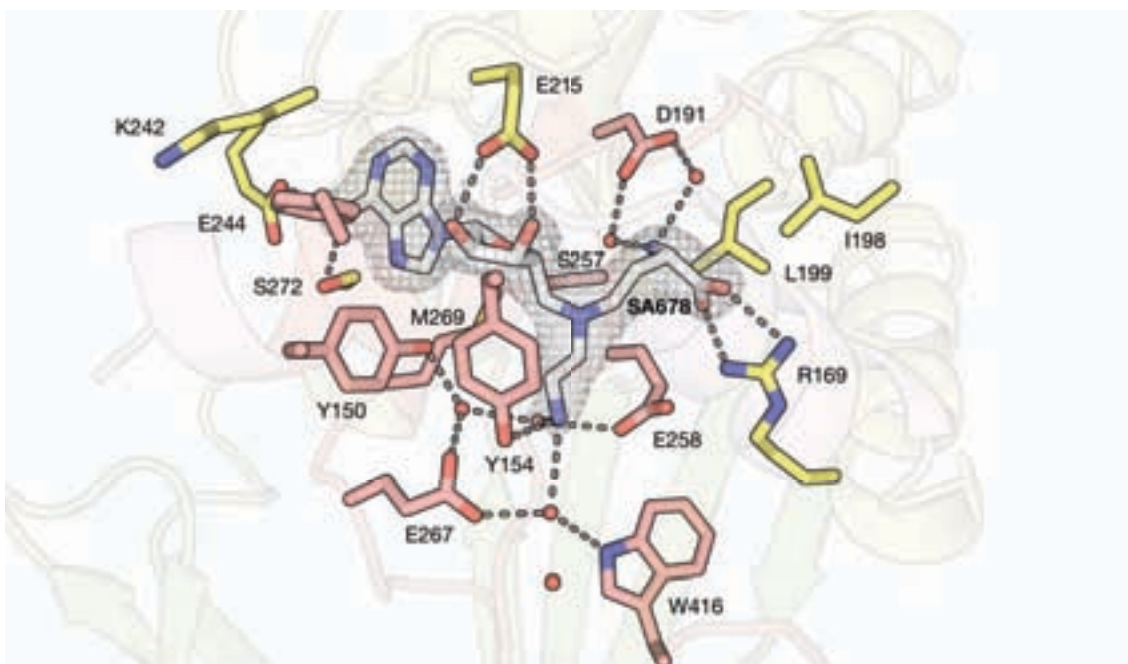


Figure 28 - Structure du composé SA678 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement du composé SA678 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II, III ou IV (en saumon), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du composé sont représentés. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour du composé) avec un contourage à 1,0 σ . Figure issue de la structure CARM1_SA678 (statistiques en annexes).

De manière intéressante, ce réseau de liaisons hydrogène n'est pas retrouvé dans la structure du composé SA707 (résolution : 2,4 Å ; R_{free} : 22,1% ; statistiques en annexes), dont

la ramification comporte un atome de carbone de plus (Figure 29). Bien que la ramification soit bien définie dans la structure, le groupement amine terminal est ancré grâce une unique liaison hydrogène avec le résidu W416 par le biais d'une molécule d'eau. En effet, l'ajout d'un atome de carbone supplémentaire à la ramification pousse le groupement amine terminal vers la sortie de la poche, l'éloignant ainsi des autres résidus avec lesquels il ne peut plus interagir. Cette différence permet d'expliquer l'écart d'IC₅₀ entre les composés SA678 et SA707 (respectivement 5 µM et 30 µM).

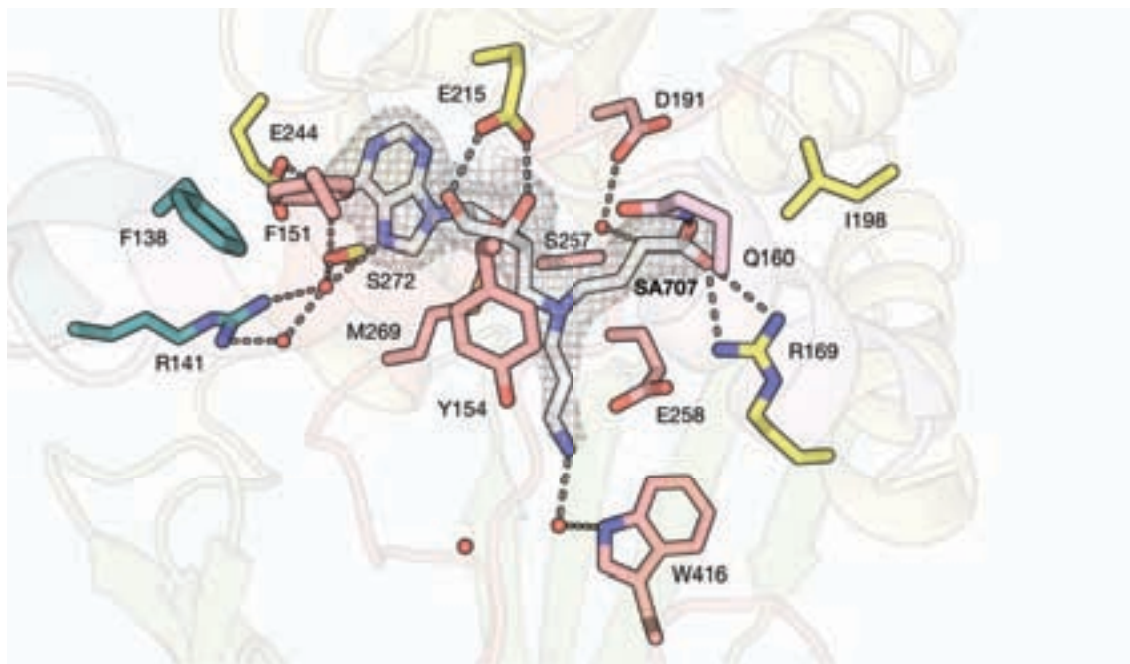


Figure 29 - Structure du composé SA707 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement du composé SA707 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II, III ou IV (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant aux hélices amino-terminales αY (en rose) et $\alpha X'$ (en bleu-vert), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du composé sont représentés. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour du composé avec un contourage à 1,0 σ . Figure issue de la structure CARM1_SA707 (statistiques en annexes).

La 3^e structure est celle du composé SA269 (résolution : 2,4 Å ; R_{free} : 26,1% ; statistiques en annexes), dont la ramification est de longueur similaire à celle du composé SA707, mais qui se termine cette fois-ci par un groupement méthyle (et non pas par un groupement amine). La densité électronique de ce composé n'est pas complète, et seule la partie adénosine est bien définie (Figure 30). Seules les extrémités de la partie méthionine et de la ramification sont visibles dans la densité. Ceci peut être expliqué par une flexibilité interne des chaînes, ou taux d'occupation du site trop faible.

Le composé SA435 est le seul dont la structure est parfaitement définie dans la poche de CARM1 (résolution : 2,0 Å ; R_{free} : 22,7% ; statistiques en annexes) (Figure 31). Son extension, composée d'un groupement imidazole, est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre les azotes de l'hétérocycle et les glutamates E258 et E267, ainsi que par la tyrosine

Y154. La superposition de la structure de PRMT1 permet de mettre en évidence l'importance de la proline P259 dans la fixation spécifique de certains composés. En effet, la présence de cette proline permet une certaine plasticité de la poche. Chez PRMT1, la présence d'un tryptophane (W153) à la place de cette proline (Figure 26) impose des contraintes stériques supplémentaires, expliquant la mauvaise affinité du composé SA435 pour PRMT1.

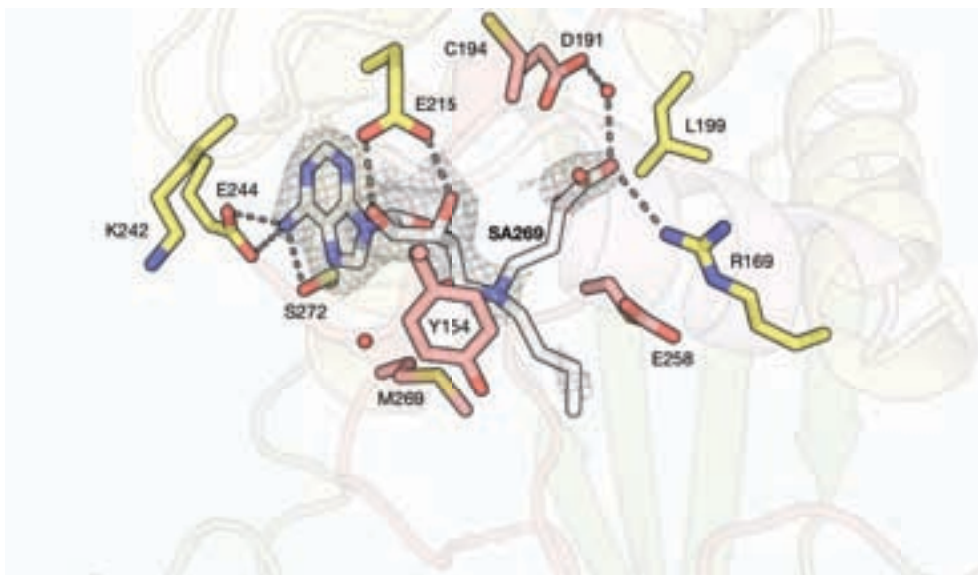


Figure 30 - Structure du composé SA269 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement du composé SA269 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II ou III (en saumon), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du composé sont représentés. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour du composé avec un contourage à 1,0 σ . Figure issue de la structure CARM1_SA269 (statistiques en annexes).

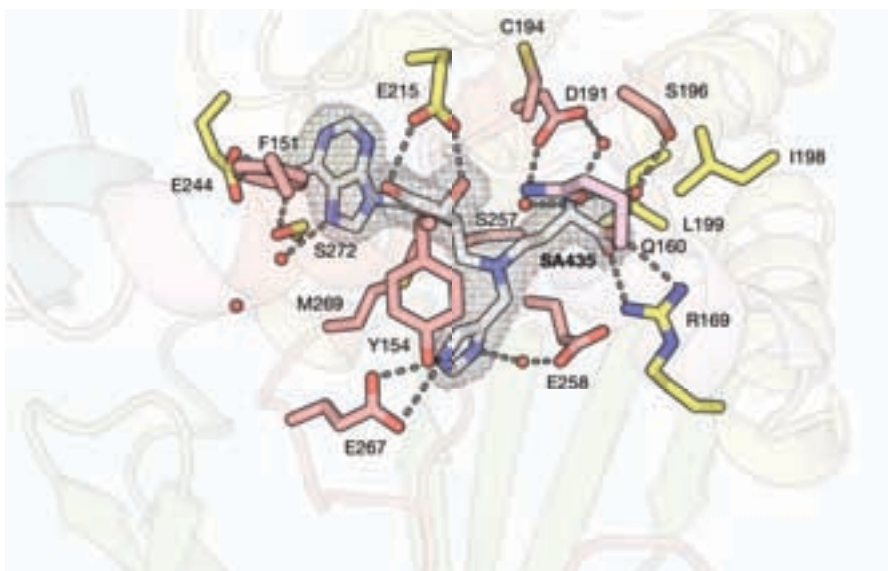


Figure 31 - Structure du composé SA435 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement du composé SA435 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II ou III (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant à l'hélice amino-terminale αY (en rose), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du composé sont représentés. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour du composé avec un contourage à 1,0 σ . Figure issue de la structure CARM1_SA435 (statistiques en annexes).

C. MOLÉCULES MIMANT L'INTERMÉDIAIRE DE RÉACTION SAM/ ARGinine

De précédentes études structurales ont montré que la fixation du cofacteur était à l'origine d'une structuration supplémentaire du site catalytique de CARM1, nécessaire à la formation de la poche de fixation de l'arginine substrat [153]. Afin d'explorer cette poche, des composés mimant l'intermédiaire de réaction de méthylation SAM/Arginine ont été développés. Son organisation structurale en présence d'une arginine a préalablement été modélisée à partir des structures de CARM1 en présence de SAH ou de SFG (Figure 32).

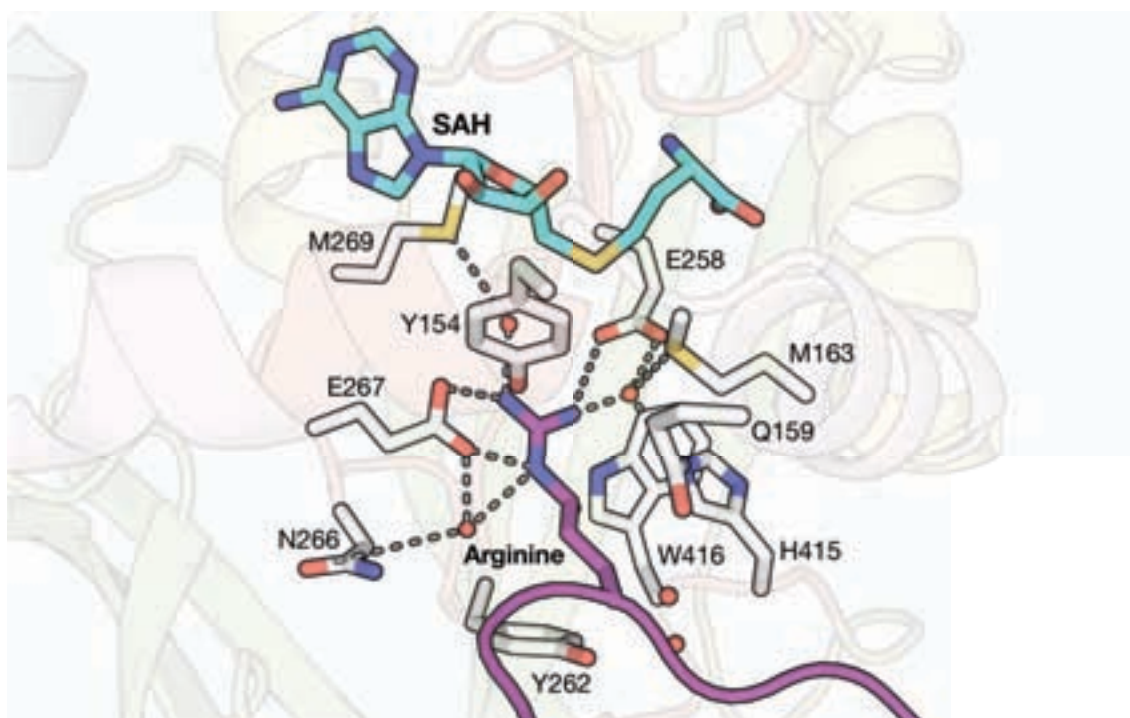


Figure 32 - Modèle de la poche de fixation du guanidinium de l'arginine substrat.

La poche de fixation de l'arginine substrat (en violet) débouche sur l'atome de soufre du SAH (en blanc). Elle est formée par différents résidus des motifs I, III et IV (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant à l'hélice amino-terminale αY (en rose). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å de l'arginine sont représentés.

1. CARACTÉRISATION DE L'AFFINITÉ ET DU POUVOIR INHIBITEUR

6 analogues de l'état de transition ont été synthétisés et testés afin d'explorer la poche de fixation de l'arginine substrat. La moitié d'entre eux possède une chaîne carbonée à 2 carbones, avec soit un groupement guanidine simple en bout de chaîne (SA684), soit un groupement guanidine mono- ou diméthylé (respectivement SA714 et SA757) (Tableau 11). L'autre moitié des composés correspond à des analogues de l'état de transition comportant un bras espaceur à trois carbones, se terminant également avec un groupement guanidine simple (SA649), ou un groupement guanidine mono- ou diméthylé (respectivement SA752 et SA760) (Tableau 11).

De manière générale, les analogues de l'état de transition semble être de meilleurs inhibiteurs que les analogues du SAM qui se limitaient à la poche de fixation du groupement sulfonium. En effet, les valeurs d'IC₅₀ varient entre 2,1 µM et 10,0 µM pour les analogues de l'état de transition (Tableau 11), alors que le meilleur analogue du SAM (composé SA920) avait un IC₅₀ de 16 µM (Tableau 7).

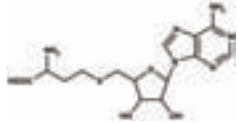
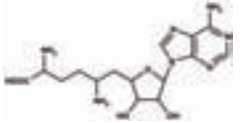
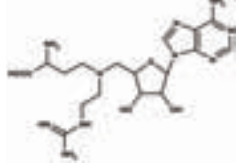
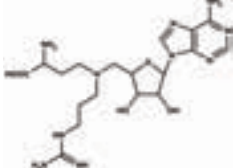
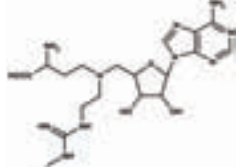
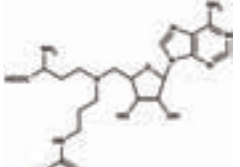
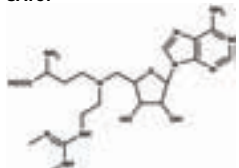
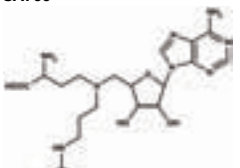
Composé	IC ₅₀ ± DS (µM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1	Composé	IC ₅₀ ± DS (µM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1
	CARM1	PRMT1			CARM1	PRMT1	
Références							
SAH	0,9	1,34 ± 0,3	1,5	SFG	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,9
							
Analogues de l'état de transition à 2 atomes de carbone				Analogues de l'état de transition à 3 atomes de carbone			
SA684	2,5 ± 1,2	113 ± 43	45,2	SA649	8,2 ± 0,3	22 ± 2	2,7
							
SA714	9 ± 2	262 ± 62	29,1	SA752	10 ± 1	21 ± 8	2,1
							
SA757	12 ± 5	125 ± 8	10,4	SA760	15 ± 6	34 ± 1	2,3
							

Tableau 11 - Capacité d'inhibition (IC₅₀) des analogues de l'état de transition SAM/Arginine pour CARM1 et PRMT1

[a] Le tétramère d'histone (H3H4)₂ a été utilisé comme substrat et du SAM ¹⁴C comme donneur de méthyle.

[b] Les valeurs présentées sont les résultats moyens d'au moins 2 expériences avec comme erreur la déviation standard (DS) correspondante.

Bien que la longueur de la chaîne carbonée n'ait pas l'air d'affecter énormément la fixation des composés chez CARM1, un effet indéniable peut être observé pour PRMT1. En effet, les valeurs d'IC₅₀ sont 4 à 9 fois supérieures pour les composés dont le bras espaceur comporte 2 carbones en comparaison aux mêmes composés avec 1 carbone de plus (Tableau 11). La longueur de la chaîne carbonée peut donc être utilisée comme élément sélectif

entre les différentes PRMT. Ces résultats concordent avec ceux obtenus précédemment par Dowden et collaborateurs [201].

Alors que l'état de méthylation des analogues de l'état de transition avec une chaîne à 3 atomes de carbone ne semble pas affecter réellement la fixation de ces composés chez CARM1 (0 groupement méthyle : $8,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$; 1 groupement méthyle : $10 \pm 1 \mu\text{M}$; 2 groupements méthyle : $15 \pm 6 \mu\text{M}$), un effet plus flagrant peut être observé pour les analogues de l'état de transition avec une chaîne à 2 atomes de carbone (0 groupement méthyle : $2,5 \pm 1,2 \mu\text{M}$; 1 groupement méthyle : $9 \pm 2 \mu\text{M}$; 2 groupements méthyle : $12 \pm 5 \mu\text{M}$). Cette différence traduit peut-être une rigidité plus importante du haut de la poche de fixation de l'arginine. La résolution de structures en présence de ces composés permettrait de confirmer cette hypothèse.

2. CARACTÉRISATION STRUCTURALE

Bien que les 6 analogues de l'état de transition SAM/Arginine aient été testés en co-cristallisation avec CARM1, la structure de seulement 3 d'entre eux a pu être résolue : (i) le composé SA649, dont le groupement guanidinium est relié à la partie analogue au SAM par une chaîne à 3 atomes de carbone, (ii) le composé SA684, dont le groupement guanidinium est relié à la partie analogue au SAM par une chaîne à 2 atomes de carbone, (iii) le composé SA714, dérivé du composé SA684 possédant un groupement méthyle supplémentaire sur un des atomes d'azote terminaux de la fonction guanidinium.

Dans la structure obtenue par co-cristallisation avec CARM1 (résolution : $2,6 \text{ \AA}$; R_{free} : 24,5% ; statistiques en annexes), la stabilisation du groupement guanidinium du composé SA684 est très similaire à celle du groupement guanidinium de l'arginine substrat décrite précédemment dans le modèle (Figure 32). En effet, le groupement guanidinium du composé SA684 est ancré dans la poche par les glutamate E257 et E258 avec qui il forme des liaisons hydrogène (Figure 33). Il est possible que l'histidine H415 du motif IV participe également à cette stabilisation.

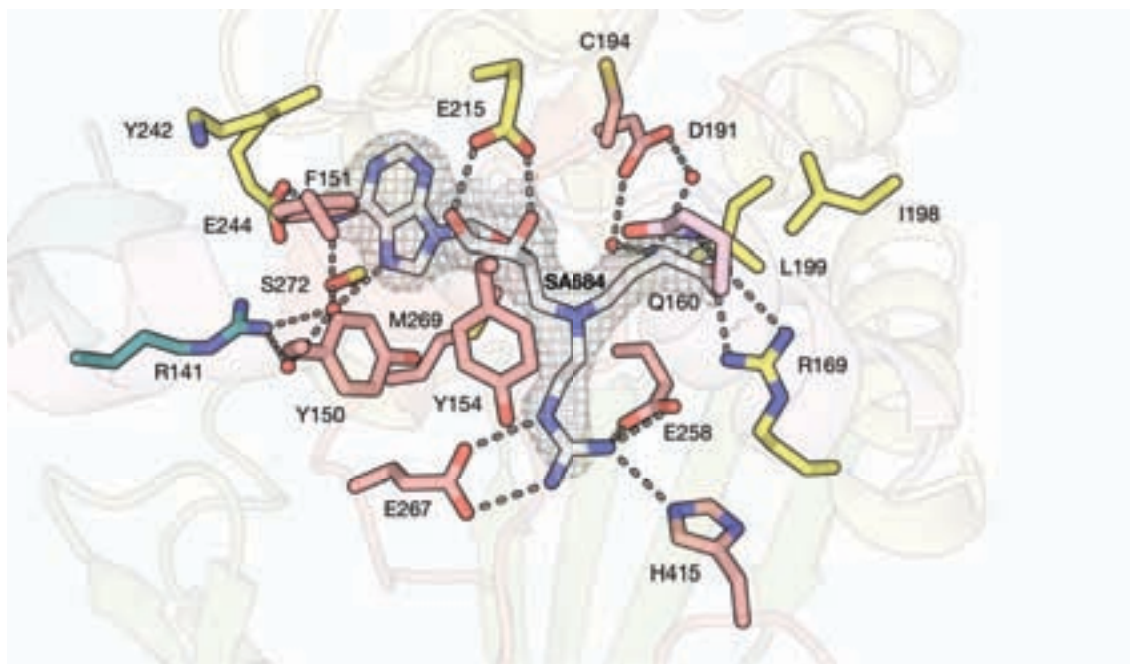


Figure 33 - Structure du composé SA684 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement du composé SA684 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II, III ou IV (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant aux hélices amino-terminales αY (en rose) et $\alpha X'$ (en bleu-vert), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du composé sont représentés. La densité électronique $2F_o-F_c$ est représentée autour du composé avec un contourage à $1,0 \sigma$. Figure issue de la structure CARM1_SA684 (statistiques en annexes).

En comparaison, le composé SA649 (résolution : 2,1 Å ; R_{free} : 23,1% ; statistiques en annexes), dont la ramification possède un atome de carbone supplémentaire, s'adapte moins bien à la poche de fixation de l'arginine substrat (Figure 34). En effet, la structure montre que la chaîne carbonée est « comprimée » dans le haut de la poche afin d'accommoder le groupement guanidinium entre les deux acides glutamiques. Cependant, ceci apporte un encombrement stérique important et provoque une légère réorganisation de l'environnement local : le glutamate E258 est poussé vers l'arginine R169, ce qui a pour conséquence une moins bonne stabilisation du groupement guanidinium par le glutamate E258, ainsi qu'une moins bonne stabilisation du groupement carboxyle de la partie acide aminé du composé par l'arginine R169. Ces observations sont en adéquation avec les mesures d' IC_{50} présentées auparavant, montrant que le composé SA684 était un meilleur inhibiteur que le composé SA649 (IC_{50} respectifs de 2,5 μM et 8,2 μM).

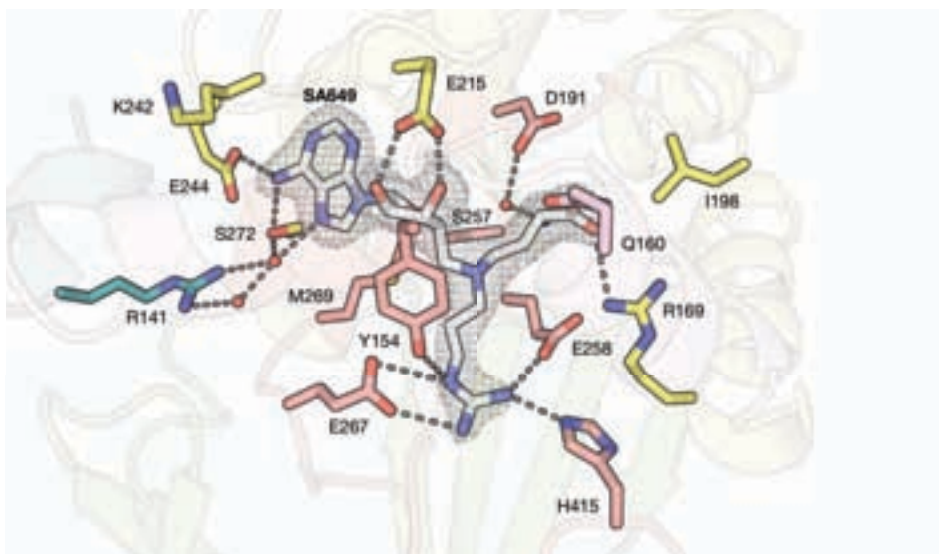


Figure 34 - Structure du composé SA649 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement du composé SA649 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II, III ou IV (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant aux hélices amino-terminales αY (en rose) et $\alpha X'$ (en bleu-vert), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du composé sont représentés. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour du composé avec un contourage à 1,0 σ . Figure issue de la structure CARM1_SA649 (statistiques en annexes).

La structure du composé SA714 (résolution : 2,5 Å ; R_{free} : 23,1% ; statistiques en annexes) ne permet cependant pas d'expliquer la différence d' IC_{50} avec le composé SA684 (IC_{50} respectifs de 9,0 μM et 2,5 μM). En effet, l'ajout d'un groupement méthyle au bout de la ramification ne semble pas structuralement perturber la stabilisation du groupement guanidinium par les glutamates E258 et E267 (Figure 35).

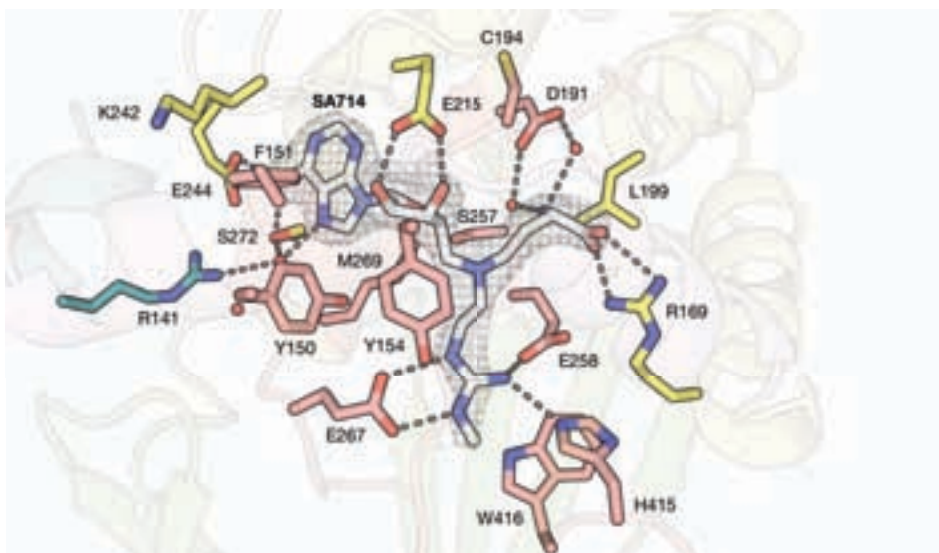


Figure 35 - Structure du composé SA714 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement du composé SA714 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II, III ou IV (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant à l'hélice amino-terminale $\alpha X'$ (en bleu-vert), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du composé sont représentés. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour du composé avec un contourage à 1,0 σ . Figure issue de la structure CARM1_SA714 (statistiques en annexes).

D. MOLÉCULES MIMANT L'INTERMÉDIAIRE DE RÉACTION SAM/PEPTIDE

La 3^e partie du projet a consisté à utiliser des molécules analogues du SAM réactives capables de réagir avec un peptide naturel ou modifié, afin d'obtenir un composé covalent SAM/peptide favorisant la stabilisation du complexe CARM1/substrat. Il est essentiel d'utiliser un analogue du cofacteur comme « ancre », puisque sa fixation est nécessaire à la formation de la poche de fixation de l'arginine substrat [153]. Les analogues réactifs du SAM ont été conçus à partir des connaissances que nous avons déjà acquises avec les analogues du SAM non-réactifs et des mimes SAM-arginine décrits précédemment.

Dans un premier temps, des analogues réactifs du SAM ont été caractérisés seuls, afin de déterminer les candidats les plus compatibles avec l'environnement du site catalytique de CARM1. 2 types de molécules réactives ont été utilisées : (i) des dérivés du SAM électrophiles, (ii) des dérivés du SAM à fonction azoture. Ces composés sont respectivement capables de réagir soit avec des acides aminés naturels nucléophiles, soit avec un acide aminé synthétique portant une fonction alcyne. Quelque soit la chimie utilisée, le produit de la réaction entre un analogue du SAM réactif et un peptide substrat peut être obtenu soit par catalyse chimique *in vitro*, soit par rapprochement des 2 réactifs dans le site catalytique de CARM1 *in situ*.

1. DÉRIVÉS ÉLECTROPHILES DU SAM

Au total, 17 composés électrophiles ont été synthétisés. Ces analogues sont capables de réagir avec une arginine, qui est un nucléophile naturel, mais ils peuvent également réagir avec d'autres acides aminés nucléophiles, tels qu'une cystéine ou une lysine. Ces deux acides aminés ont d'ailleurs un pouvoir nucléophile supérieur à celui d'une arginine (Arg < Lys < Cys). En fonction de la longueur de la ramification des analogues réactifs du SAM, l'un ou l'autre acide aminé sera utilisé : une cystéine sera plutôt utilisée dans le cas d'analogues du SAM possédant une ramification longue, alors qu'une lysine ou une arginine pourra être utilisée pour les analogues du SAM possédant une ramification courte.

a. Caractérisation de l'affinité et du pouvoir inhibiteur

La majorité des dérivés électrophiles du SAM a été testée sur CARM1. Les valeurs d'IC₅₀ varient entre 13,3 µM et 863,8 µM (Tableau 12). La médiocrité de l'affinité de certains de ces composés peut-être expliquée soit par les charges négatives portées par la chaîne latérale, soit par une rigidité de celle-ci, imposée par certains groupements. Ces caractéristiques ne sont malheureusement pas compatibles avec l'environnement restreint et chargé négativement de la poche de fixation de l'arginine chez CARM1.

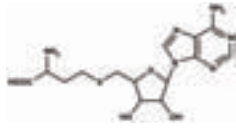
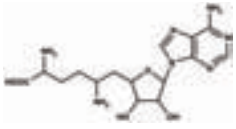
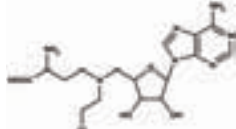
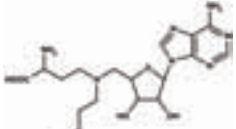
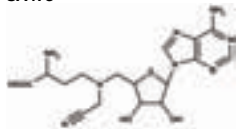
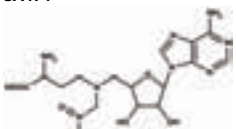
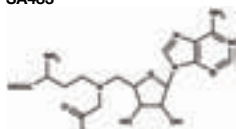
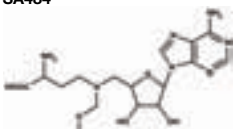
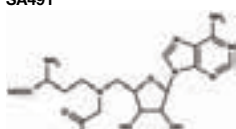
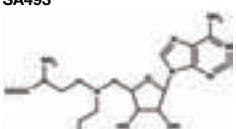
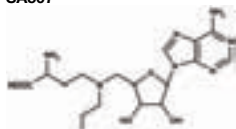
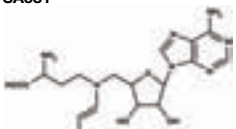
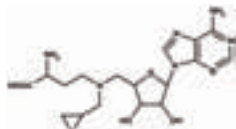
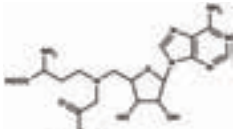
Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1	Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1
	CARM1	PRMT1			CARM1	PRMT1	
Références							
SAH 	0,9	1,34 ± 0,3	1,5	SFG 	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,9
Dérivés du SAM électrophiles							
SA271 	ND ^[c]	ND ^[c]	-	SA398 	ND ^[c]	ND ^[c]	-
SA473 	863,8	ND ^[c]	-	SA474 	ND ^[c]	ND ^[c]	-
SA483 	80,7	ND ^[c]	-	SA484 	ND ^[c]	ND ^[c]	-
SA491 	131,7	ND ^[c]	-	SA493 	153,0	ND ^[c]	-
SA507 	212,4	ND ^[c]	-	SA581 	192,7	ND ^[c]	-
SA586 	114,8	ND ^[c]	-	SA592 	309,7	ND ^[c]	-

Tableau 12 - Capacité d'inhibition (IC₅₀) des dérivés électrophiles du SAM pour CARM1 et PRMT1

[a] Le tétramère d'histone (H3H4)₂ a été utilisé comme substrat et du SAM ¹⁴C comme donneur de méthyle.

[b] Les valeurs présentées sont les résultats moyens d'au moins 2 expériences avec comme erreur la déviation standard (DS) correspondante.

[c] Non déterminé.

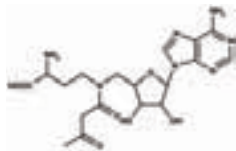
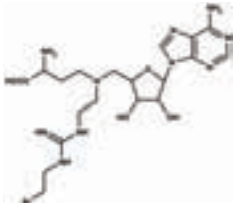
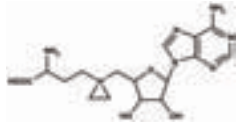
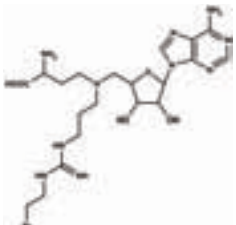
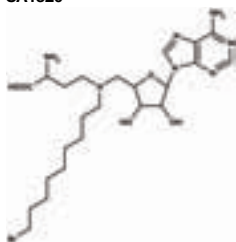
Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1	Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1
	CARM1	PRMT1			CARM1	PRMT1	
Dérivés du SAM électrophiles							
SA598 	20,6	ND ^[c]	-	SA751 	14 ± 7	350	25
SA765 	13,3	ND ^[c]	-	SA1231 	ND ^[c]	ND ^[c]	-
SA1320 	33	191	5,8				

Tableau 12 - Capacité d'inhibition (IC₅₀) des dérivés électrophiles du SAM pour CARM1 et PRMT1 (suite)

L'un des meilleurs dérivés électrophiles du SAM est le composé SA751, qui est dérivé des analogues de l'état de transition SAM/Arginine décrits précédemment. Il est caractérisé par un groupement guanidinium, relié à la partie analogue au SAM par une chaîne à 2 atomes de carbone, prolongée d'une extension à 2 atomes de carbone terminée par un atome de brome réactif. Étant donné sa chaîne latérale, ce composé est plutôt destiné à réagir avec une cystéine. Comme nous avons pu l'observer avec la structure du composé SA684, dont la chaîne comporte 2 atomes de carbone comme le réactif SA751, le groupement guanidinium du produit de la réaction (Figure 36) devrait se positionner au même endroit du site catalytique de CARM1 que le groupement guanidinium d'une arginine. Le reste de la ramification devrait permettre de sortir de la poche de l'arginine, pour accéder au sillon de fixation du peptide substrat de l'enzyme.

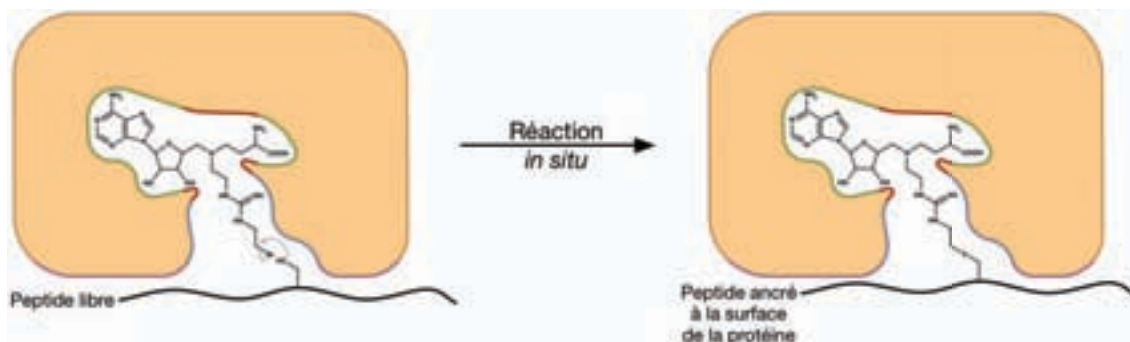


Figure 36 - Réaction de substitution nucléophile in situ entre le composé SA751 et une cystéine

Le composé SA751 a été dessiné pour se fixer dans la poche du cofacteur et réagir avec un peptide dont l'arginine substrat aura été substituée par une cystéine. Le lien covalent ainsi formé permettra l'ancrage du peptide à la surface de la protéine.

Un autre composé intéressant est le composé SA765, donc l' IC_{50} est le plus bas au sein des dérivés électrophiles du SAM (13,3 μ M). Il est caractérisé par un aziridium réactif. Ce groupement étant petit, le composé SA765 est plutôt destiné à réagir avec une arginine. Le produit de réaction ainsi obtenu ressemblerait fort à celui décrit précédemment, avec un groupement guanidinium relié à la partie analogue au SAM par une chaîne à 2 atomes de carbone (Figure37).

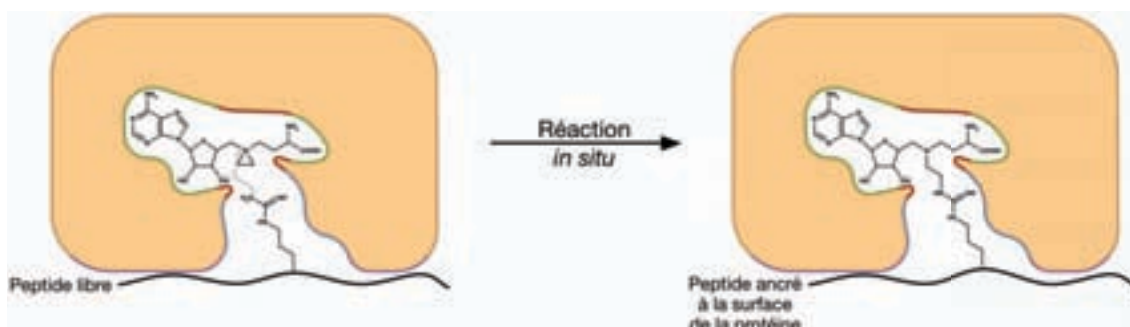


Figure 37 - Réaction de condensation in situ entre le composé SA765 et une arginine

Le composé SA765 a été dessiné pour se fixer dans la poche du cofacteur et réagir avec un peptide non-modifié. Le lien covalent ainsi formé entre le composé réactif et l'arginine permettra l'ancrage du peptide à la surface de la protéine.

b. Caractérisation structurale

Dans un premier temps, des essais de co-cristallisation ont été réalisés avec CARM1 et les dérivés électrophiles, afin de déterminer les candidats les plus compatibles avec l'environnement du site catalytique de CARM1. Des essais de co-cristallisation en présence de peptides ont par la suite été réalisés avec les composés électrophiles les plus prometteurs. Des peptides de tailles différentes correspondant à l'extrémité amino-terminale de l'histone H3 ont été synthétisés, dont certains avec l'arginine R18 remplacée par une lysine ou une cystéine (Tableau 13). Sur l'ensemble des composés électrophiles, 14 ont été testés en co-cristallisation avec CARM1 avec ou sans peptide. Des essais de co-cristallisation ont également été réalisés en utilisant des acides aminés libres, tels qu'une arginine, une arginine mono-méthylée, une

cystéine ou encore une lysine. Bien que différentes conditions de cristallisation et d'incubation (préalable à la cristallisation) aient été testées, aucune structure de CARM1 en complexe avec un produit de la réaction électrophile/peptide n'a pu être obtenue. Dans les structures qui ont pu être résolues, seuls les dérivés réactifs du SAM étaient visibles. La structure de 5 d'entre eux a ainsi pu être résolue (SA271, SA592, SA751, SA765, SA491).

Nom	Séquence
Peptides arginine	
H3₁₋₃₄ K18ac	ARTKQTARKS TGGKAP ^{RK_{ac}} QL ATKAARKSAP ATGG 1 17 18 34
H3₁₋₄₁ K18ac	ARTKQTARKS TGGKAP ^{RK_{ac}} QL ATKAARKSAP ATGGVKKPHR Y 1 17 18 41
H3₁₋₄₁ R17me1 K18ac	ARTKQTARKS TGGKAP ^{Rme1K_{ac}} QL ATKAARKSAP ATGGVKKPHR Y 1 17 18 41
H3₁₃₋₁₈ R17C K18ac	GKAP ^{RK_{ac}} 13 17 18
H3₁₃₋₁₈ R17C K18ac	GKAP ^{Rme1K_{ac}} 13 17 18
PABP₁₄₃₉₋₄₈₄	AQ GARPHPFQNM PGAI ^R PAAP ^R PPFSTMRPAS SQVPRVMSTQ RVAN 439 455 460 484
Peptides lysine	
H3₁₃₋₁₈ R17K K18ac	GKAP ^{KK_{ac}} 13 17 18
Peptides cystéine	
H3₁₅₋₁₉ R17C K18ac	APCK ^{ac} Q 15 17 19
H3₁₃₋₁₈ R17C K18ac	GKAP ^{CK_{ac}} 13 17 18

Tableau 13 - Liste des peptides synthétisés pour la co-cristallisation avec CARM1 et des dérivés électrophiles du SAM

Les acides aminés devant réagir avec les composés électrophiles *in situ* sont représentés en violet tandis que les autres résidus pouvant porter des modifications post-traductionnelles sont représentés en bleu.

Le composé SA271, caractérisé par une ramification à 2 atomes de carbone et terminée par un atome de chlore, est correctement stabilisée dans la poche de CARM1 (Figure 38). La structure (résolution : 2,7 Å ; R_{free} : 28,3% ; statistiques en annexes) met en évidence les diverses interactions nécessaires à l'ancrage de la partie analogue au SAM du composé, ainsi qu'une stabilisation de l'atome de chlore terminal par le résidu E258.

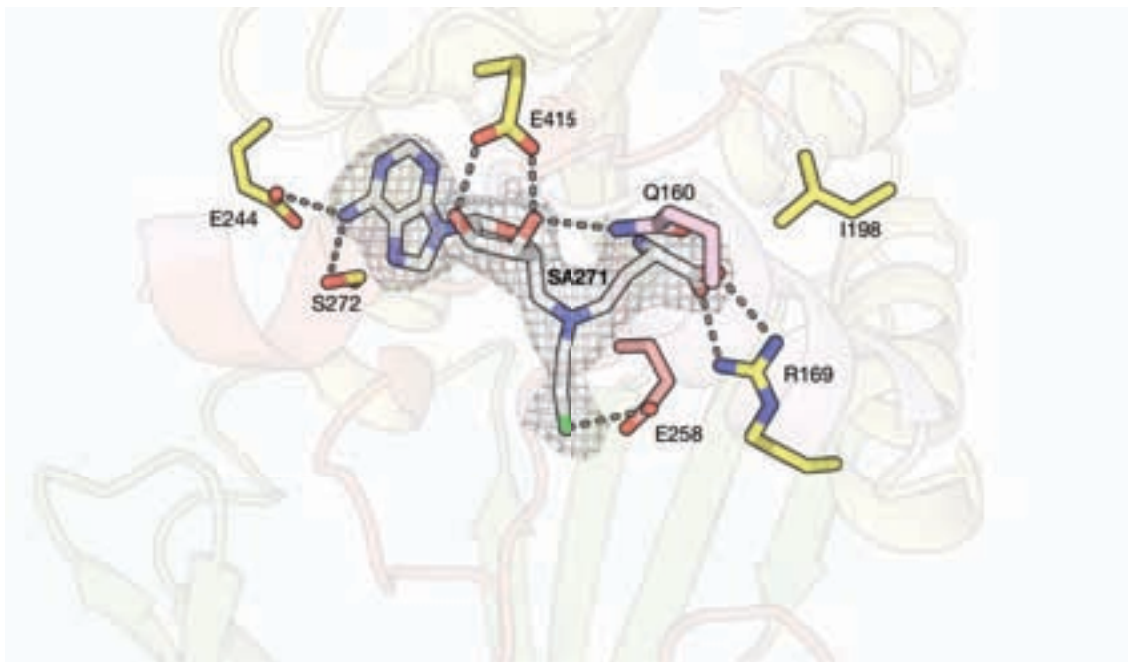


Figure 38 - Structure du composé SA271 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement du composé SA271 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs III (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant à l'hélice amino-terminale αY (en rose), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du composé sont représentés. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour du composé avec un contourage à 1,0 σ . Figure issue de la structure CARM1_SA271 (statistiques en annexes).

En comparaison, les structures des composés SA491 (résolution : 2,6 Å ; R_{free} : 25,0%) et SA592 (résolution : 2,6 Å ; R_{free} : 24,7%) sont moins bien définies (Figures 39) (statistiques en annexes). En effet, bien que la chaîne carbonée de la ramification soit plutôt bien visible au niveau de la densité électronique, les groupements carbonyle qui y sont greffés ne sont pas définis. Ceci est probablement dû à l'environnement riche en charges négatives de la poche de fixation de l'arginine substrat, qui ne permet pas d'ancrer la ramification qui a donc plusieurs conformations possibles. Ces observations sont en adéquation avec les valeurs d' IC_{50} moyennes qui ont été mesurées pour ces deux composés (respectivement 131,7 μM et 309,7 μM).

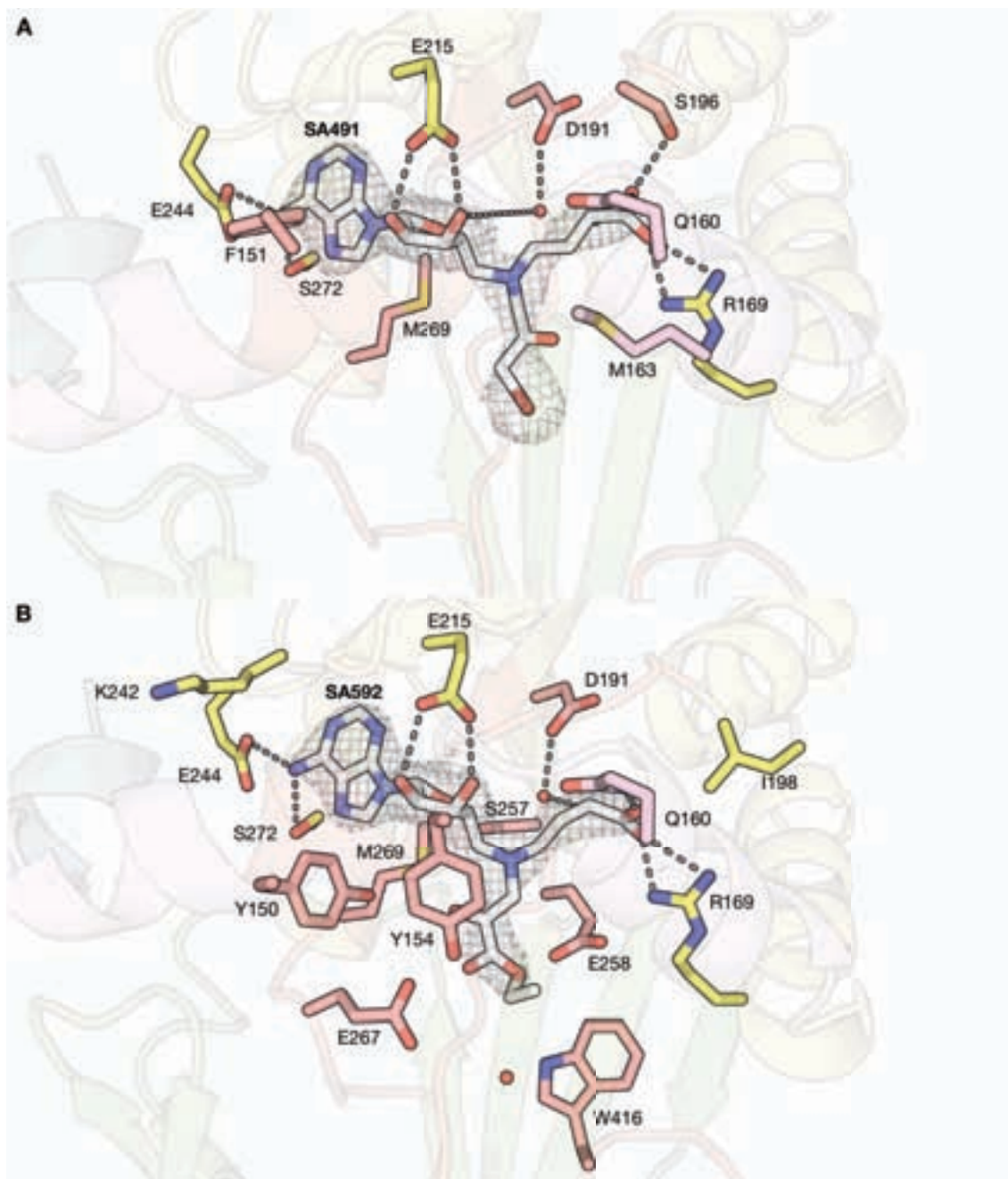


Figure 39 - Structures des composés SA491 et SA592 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement des composés SA491 et SA592 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II, III ou IV (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant aux hélices amino-terminales αY (en rose) et $\alpha X'$ (en bleu-vert), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å des composés sont représentés. La densité électronique $2F_o-F_c$ est représentée autour du composé avec un contourage à $1,0 \sigma$.

(A) Structure du composé SA491. Figure issue de la structure CARM1_SA491 (statistiques en annexes).

(B) Structure du composé SA592. Figure issue de la structure CARM1_SA592 (statistiques en annexes).

Des données de diffraction ont également pu être obtenues pour le composé SA751 (résolution : 2,7 Å ; R_{free} : 24,4% ; statistiques en annexes), caractérisé par une ramification à 2 atomes de carbone portant un groupement guanidinium et un atome de brome réactif. Cependant, la densité électronique n'est pas complète au niveau de la ramification du

composé (Figure 40). En effet, le groupement guanidinium est mal défini, ce qui suppose qu'il n'est pas stabilisé aussi efficacement que pour les composés SAM-Arginine analogues présentés précédemment. Cette instabilité peut être expliquée par la présence de l'extension portant l'atome réactif de brome, qui doit probablement apporter un certain encombrement stérique nuisant au positionnement correct du groupement guanidinium.

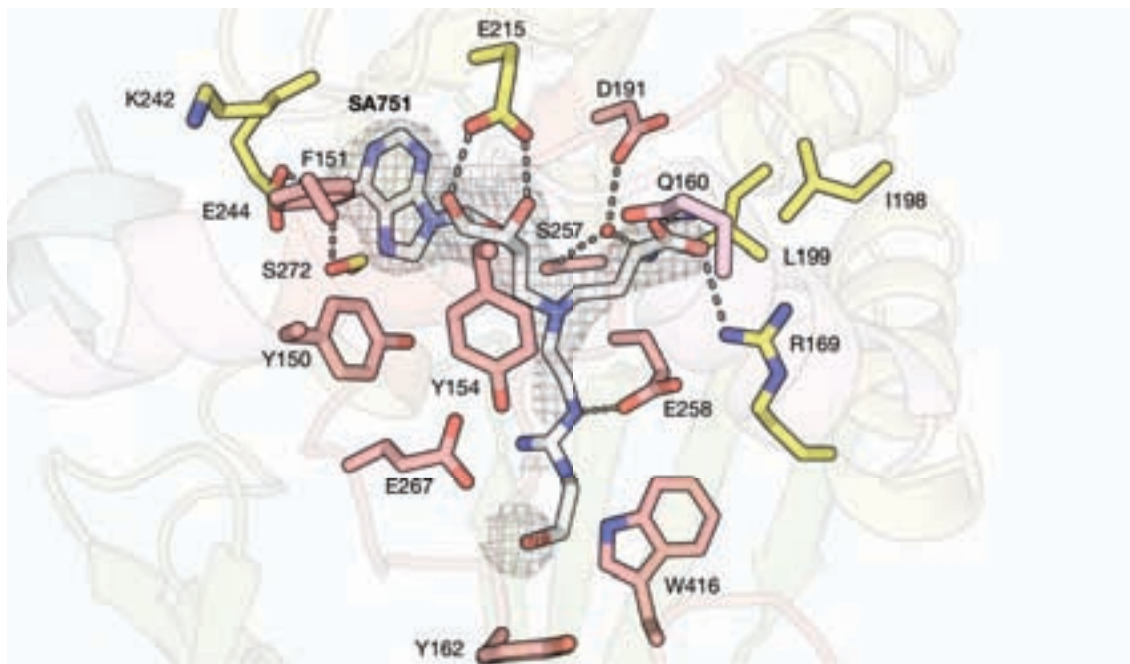


Figure 40 - Structure du composé SA751 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement du composé SA751 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II ou III (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant aux hélices amino-terminales αY (en rose) et $\alpha X'$ (en bleu-vert), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du composé sont représentés. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour du composé avec un contourage à 1,0 σ . Figure issue de la structure CARM1_SA751 (statistiques en annexes).

La structure du composé à fonction aziridium SA765 a également été résolue (résolution : 2,15 Å ; R_{free} : 22,5% ; statistiques en annexes). Les données structurales montrent une organisation de la poche du cofacteur similaire à celle observée en présence de SAH ou de SFG : la partie adénine est stabilisée par les résidus E244, S272 et R141, le ribose par le résidu E215, et enfin la partie acide aminé par les résidus D191, S196, R169 et Q160 (Figure 41). Ces observations concordent avec la bonne valeur d'IC₅₀ obtenue pour ce composé (13,3 μM).

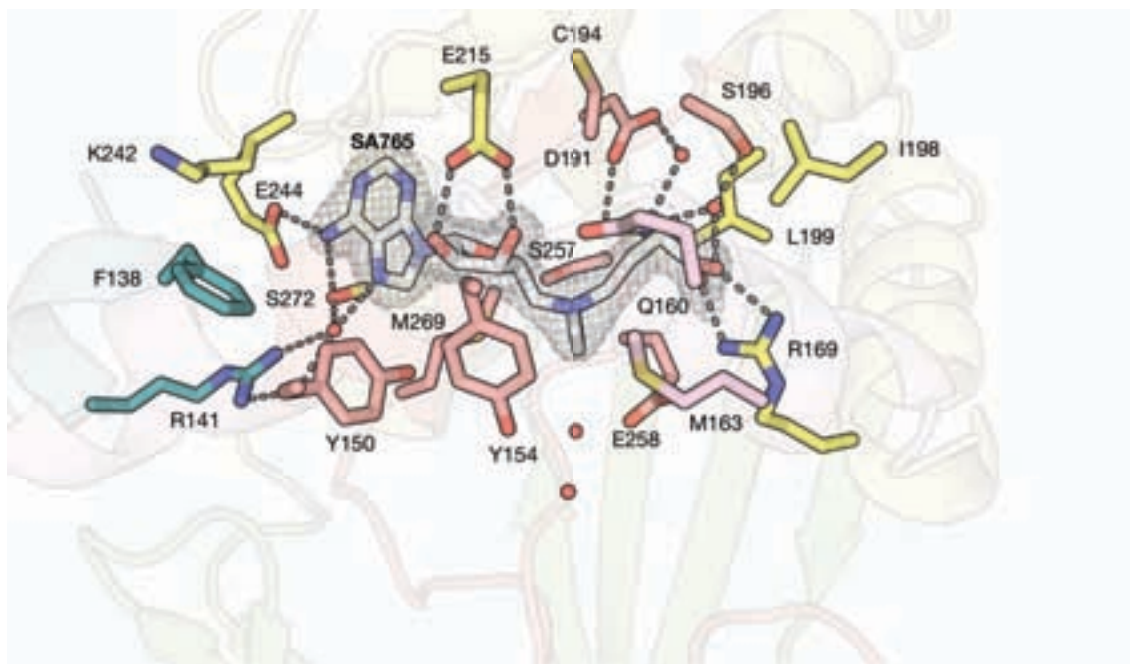


Figure 41 - Structure du composé SA765 dans le site catalytique de CARM1

L'environnement du composé SA765 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II ou III (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant aux hélices amino-terminales αY (en rose) et $\alpha X'$ (en bleu-vert), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å du composé sont représentés. La densité électronique $2Fo-Fc$ est représentée autour du composé avec un contourage à $1,0 \sigma$. Figure issue de la structure CARM1_SA765 (statistiques en annexes).

2. DÉRIVÉS DU SAM À FONCTION AZOTURE

La 2^e classe de composés réactifs sont des analogues du SAM à fonction azoture. Les molécules portant une fonction azoture sont capables de réagir par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen avec un groupement alcyne, conduisant à la formation de deux isomères de cycles triazole différents (Figure 42). Cette réaction a déjà été décrite dans la littérature [232, 233], et il a été montré qu'une enzyme peut remplacer un catalyseur chimique dans le cas d'une réaction de click *in situ* (Figure 43), comme dans le cas de l'acétylcholine estérase [234, 235], ou encore de la protéase VIH-1 [236].



Figure 42 - Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne de Huisgen

La cycloaddition entre une fonction azoture et un groupement alcyne conduit à un mélange d'isomères 1,4 et 1,5 de cycles triazoles.

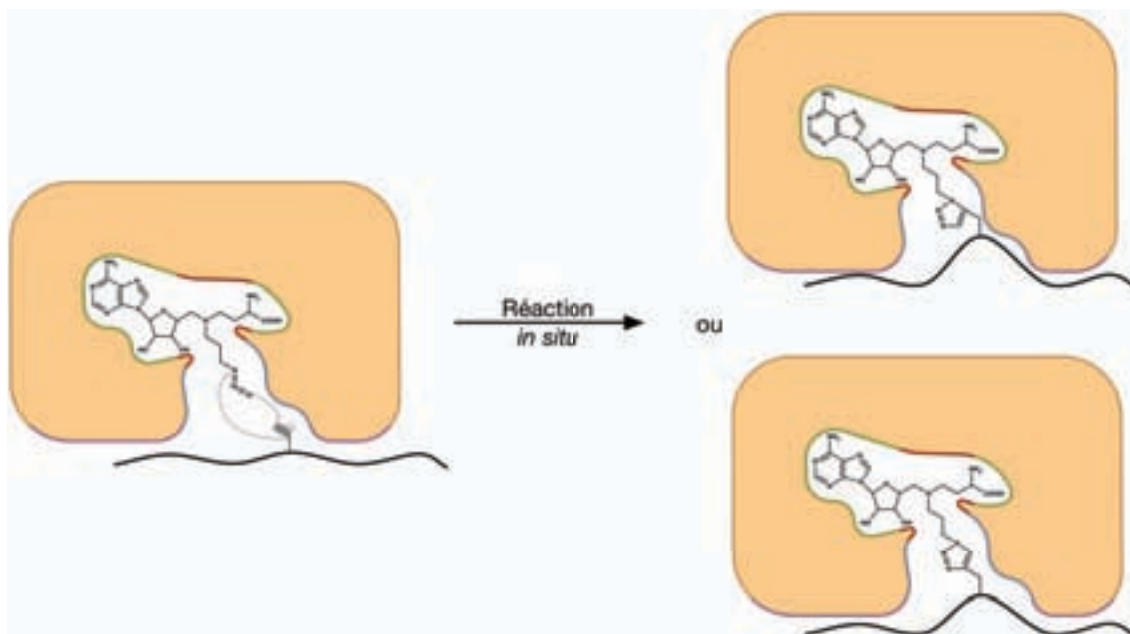


Figure 43 - Réaction de cycloaddition *in situ* entre le résidu SA401 et un acide aminé à fonction alcyne

a. Caractérisation de l'affinité et du pouvoir inhibiteur

Deux molécules hameçon à fonction azoture caractérisées par des longueurs de chaîne différentes ont été synthétisées : le composé SA401, dont la chaîne latérale comporte 3 atomes de carbone, et le composé SA705, dont la chaîne latérale comporte 2 atomes de carbone (Tableau 15). Ces composés sont capables de réagir par réaction de cycloaddition avec un groupement alcyne, qui dans notre cas a été greffé au bout de la chaîne latérale d'un acide aminé synthétique (Figure 43). Les différents produits de réaction pouvant être obtenus par réaction des composés SA401 et SA705 avec un acide aminé à fonction alcyne ont également été synthétisés chimiquement, afin de voir si l'hétérocycle produit au cours de la réaction était compatible avec l'environnement du site de fixation de l'arginine de CARM1 (Tableau 15).

Un peptide dérivé de l'extrémité amino-terminale de l'histone H3 comportant le résidu alcyne à la place de l'arginine substrat a été synthétisé pour être testé avec les composés azoture SA401 et SA705 (Tableau 14). Comme pour l'acide aminé alcyne libre, différents produits de réaction ont été synthétisés chimiquement (SA528 et SA1114) (Tableau 15).

Nom	Séquence
Peptides alcyne	
H3 ₁₂₋₂₂ R17X K18ac ^[a]	GGKAPXK _{ac} QLAT 12 17 18 22

Tableau 14 - Peptide synthétisé pour la co-cristallisation avec CARM1 et des dérivés du SAM à fonction azoture.

Les acides aminés devant réagir avec les composés azoture *in situ* sont représentés en violet tandis que les autres résidus pouvant porter des modifications post-traductionnelles sont représentés en bleu.

[a] L'arginine devant être normalement méthylée par CARM1 a été substituée par un acide aminé synthétique X contenant une fonction alcyne.

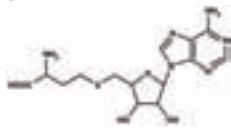
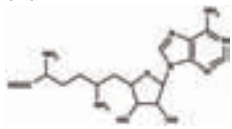
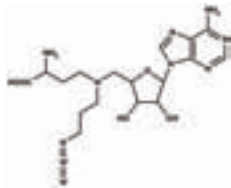
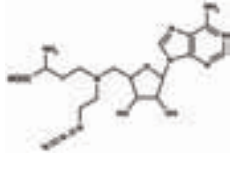
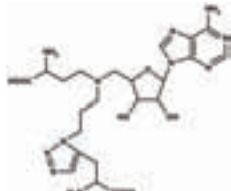
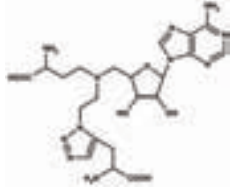
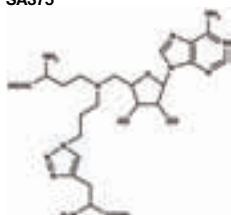
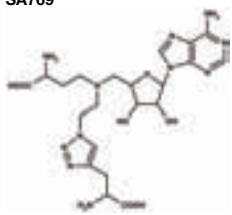
Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1	Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1
	CARM1	PRMT1			CARM1	PRMT1	
Références							
SAH	0,9	1,34 ± 0,3	1,5	SFG	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,9
							
Analogues du SAM réactifs à fonction azoture							
SA401	14	16	1,1	SA705	199	118	0,6
							
Produits de la réaction de cycloaddition avec un acide aminé à fonction alcyne							
SA870	13 ± 3	27 ± 17	2,1	SA770	208 ± 151	160 ± 137	0,8
							
SA375	70 ± 21	107 ± 17	1,5	SA769	55 ± 17	67 ± 18	1,2
							

Tableau 15 - Capacité d'inhibition (IC₅₀) des dérivés du SAM à fonction azoture et des différents produits de cycloaddition pour CARM1 et PRMT1

[a] Le tétramère d'histone (H3H4)₂ a été utilisé comme substrat et du SAM ¹⁴C comme donneur de méthyle.

[b] Les valeurs présentées sont les résultats moyens d'au moins 2 expériences avec comme erreur la déviation standard correspondante.

[c] Non déterminé.

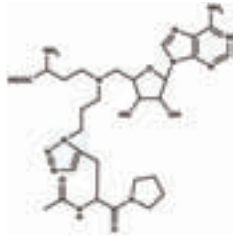
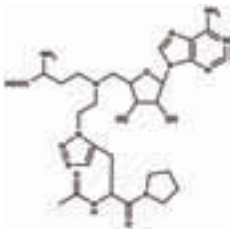
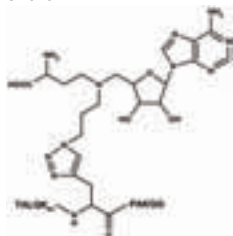
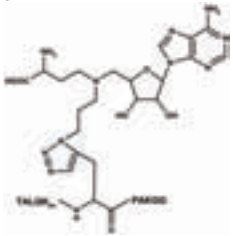
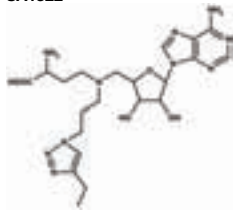
Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1	Composé	IC ₅₀ ± DS (μM) ^{[a][b]}		PRMT1/ CARM1
	CARM1	PRMT1			CARM1	PRMT1	
Produits de la réaction de cycloaddition avec un acide aminé à fonction alcyne							
SA1056	145 ± 30	29	0,2	SA1071	203 ± 35	318 ± 111	1,6
							
Produits de la réaction de cycloaddition avec un peptide à fonction alcyne							
SA528	227 ± 14	418 ± 211	1,8	SA1114	56	46 ± 24	0,8
							
Autres produits de cycloaddition							
SA1322	198	168 ± 53	0,8				
							

Tableau 15 - Capacité d'inhibition (IC₅₀) des dérivés du SAM à fonction azoture et des différents produits de cycloaddition pour CARM1 et PRMT1 (suite)

En regardant les capacités d'inhibition des différents composés, les composés avec une chaîne à 3 atomes de carbone semblent convenir mieux à CARM1 que les composés avec une chaîne à 2 atomes de carbone. Cela est visible pour les réactifs (SA401, 3 atomes de carbone : 14 μM ; SA705, 2 atomes de carbone : 199 μM), mais également pour les produits de la réaction de cycloaddition (SA870, triazole 1,5 à 3 atomes de carbone : 13 μM ; SA770, triazole 1,5 à 2 atomes de carbone : 208 μM). De plus, les produits triazoles 1,4 semblent clairement moins bons que les produits triazoles 1,5 dans le cas des composés avec une chaîne à 3 atomes de carbone (SA870, triazole 1,5 : 13 μM ; SA375, triazole 1,4 : 70 μM), mais l'effet inverse est observé pour les composés avec une chaîne à seulement 2 atomes de carbone (SA770, triazole 1,5 : 208 μM ; SA769, triazole 1,4 : 55 μM).

Deux produits de cycloaddition formés à partir d'un acide aminé alcyne protégé ont été synthétisés car nous pensons que les fonctions amine et carboxylate libres du résidu

pourraient perturber la fixation des composés. Cependant, les valeurs d'IC₅₀ montrent le contraire : l'addition de protection aux extrémités amino- et carboxy-terminales du résidu a plutôt un effet négatif sur la fixation (SA870, triazole 1,5 à 3 atomes de carbone non-protégé : 13 µM ; SA1056 , triazole 1,5 à 3 atomes de carbone protégé : 145 µM).

De même, nous pensons que l'intégration du résidu alcyne à un peptide issu de l'histone H3, substrat spécifique de CARM1, permettrait d'augmenter l'affinité du composé, mais l'utilisation d'un peptide semble perturber la fixation du produit de cycloaddition (SA870, triazole 1,5 à 3 atomes de carbone « libre » : 13 µM ; SA1114 , triazole 1,5 à 3 atomes de carbone intégré à un peptide : 56 µM).

Concernant la sélectivité des composés, ces derniers ne semblent pas spécifiques de CARM1, car des valeurs d'IC₅₀ équivalentes sont retrouvées chez CARM1 et PRMT1 pour tous les composés. Étonnamment, les capacités d'inhibition des produits de cycloaddition comprenant un peptide sont également comparables chez CARM1 et PRMT1 (respectivement 56 µM et 46 µM pour le composé SA1114). En effet, ce peptide est issu de l'histone H3, qui est un substrat spécifique de CARM1 et non pas de PRMT1. La résolution de la structure de CARM1 avec différents composés pourraient permettre d'expliquer ces différentes observations.

b. Caractérisation structurale

Les 2 dérivés du SAM à fonction azoture ont été testés en co-cristallisation avec CARM1 et le peptide PJ207 comprenant un résidu alcyne. Bien que différentes conditions de cristallisation et d'incubation (préalable à la cristallisation) furent testées, aucune structure de CARM1 en complexe avec un produit de la réaction de cycloaddition n'a pu être obtenue. Dans les structures qui ont pu être résolues, seuls les dérivés réactifs du SAM étaient visibles. Les structures des composés SA401 (résolution : 2,4 Å ; R_{free} : 21,4%) et SA705 (résolution : 2,2 Å ; R_{free} : 21,3%) ont cependant pu être résolues (Figure 44) (statistiques en annexes). Les données structurales mettent en avant la rigidité de la ramification apportée par la fonction azoture terminale. Peu d'interactions sont cependant visibles au niveau de cette ramification, la fonction azoture offrant peu de possibilités. La fonction azoture du composé SA401 (dont la ramification comporte 3 atomes de carbone) est stabilisée par deux liaisons hydrogène : la première entre l'atome d'azote neutre de la fonction azoture et le résidu Y154 du motif I, et la deuxième entre l'atome d'azote terminal de la fonction azoture chargé négativement et le résidu W416 du motif IV (Figure 44A). En revanche, la fonction azoture du composé SA705 (dont la ramification ne comporte que 2 atomes de carbone) est retenue plus haut dans la poche, et en conséquence n'est stabilisée que par une seule liaison hydrogène entre son azote terminal chargé négativement et le résidu E267 (Figure 44B). Cette différence dans la

stabilisation du groupement azoture est probablement l'explication à la différence d'IC₅₀ entre les composés SA401 et SA705 (respectivement 14 µM et 199 µM).

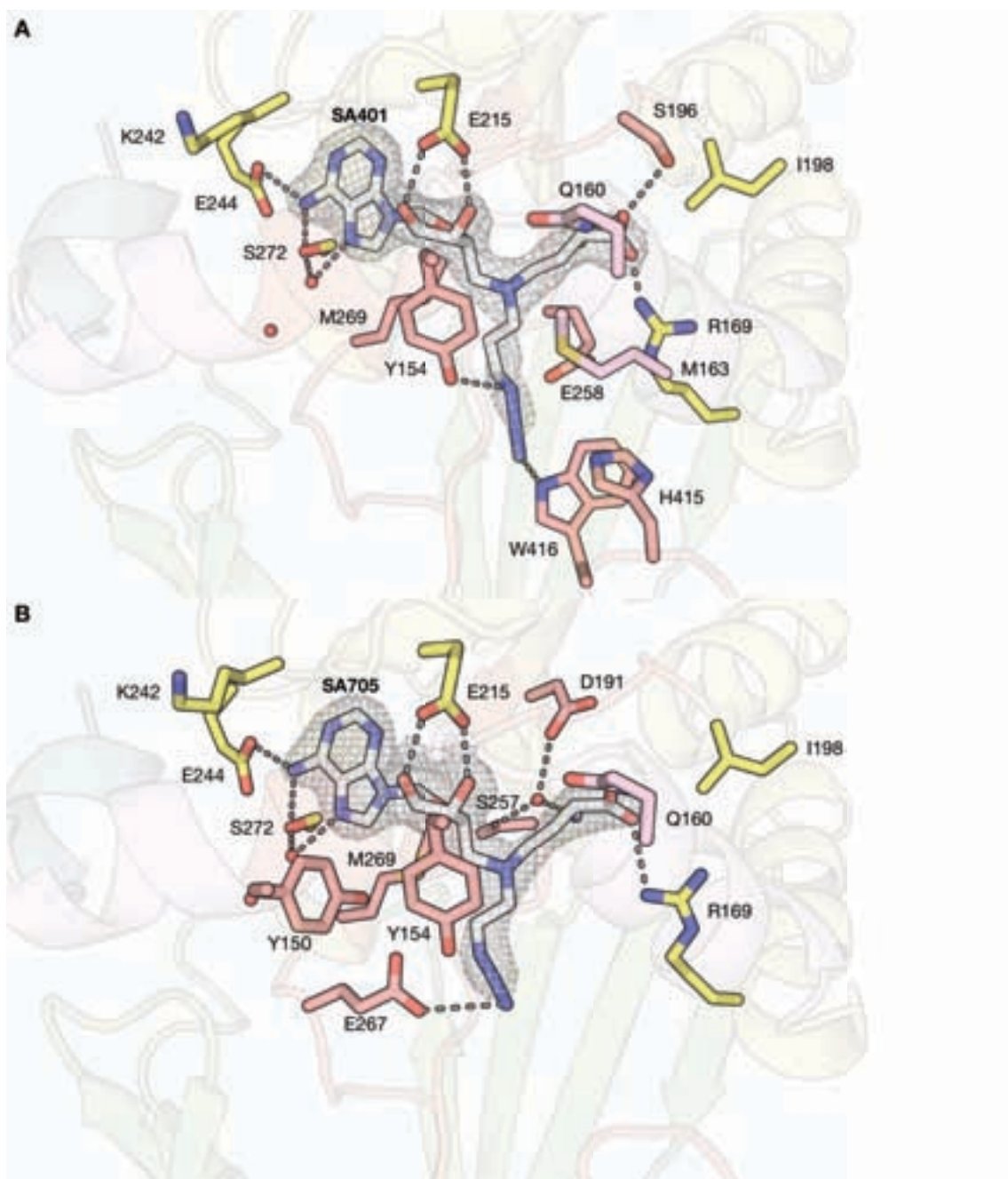


Figure 44 - Structures des composés à fonction azoture dans le site catalytique de CARM1
 L'environnement des composés SA401 et SA705 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II, III ou IV (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant à l'hélice amino-terminales αY (en rose), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å des composés sont représentés. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour des composés avec un contourage à 1,0 σ.
 (A) Structure du composé SA401. Figure issue de la structure CARM1_SA401 (statistiques en annexes).
 (B) Structure du composé SA705. Figure issue de la structure CARM1_SA705 (statistiques en annexes).

Les essais de cycloaddition *in situ* au cours de la cristallisation n'ayant pas été concluants, les différents produits de la réaction présentés précédemment furent testé en co-

crystallisation avec CARM1. Différentes structures ont été obtenues pour ces composés, mais les plus intéressantes sont celles des composés SA375 (résolution : 2,3 Å ; R_{free} : 22,1%) et SA870 (résolution : 2,4 Å ; R_{free} : 22,4%) qui permettent d'expliquer leur différence d' IC_{50} (statistiques en annexes). La ramification du composé SA375, caractérisé par un cycle triazole 1,4, est allongée dans la poche de l'arginine substrat, et l'hétérocycle est stabilisé par une liaison hydrogène entre l'azote N2 et le résidu E258 (Figure 45A). Les fonctions amine et carboxylate pointent ainsi vers l'extérieur de la poche, et sont respectivement stabilisées par les résidus Y262 et N266. En opposition, la ramification du composé SA870, caractérisée par un cycle triazole 1,5, est recroquevillée dans la poche de l'arginine substrat, et l'hétérocycle est stabilisé par une liaison hydrogène entre l'azote N3 et le résidu E258 (Figure 45B). Contrairement au composé SA375, les fonctions amine et carboxylate terminales ne sortent pas de la poche, mais sont cependant plus efficacement stabilisées par les résidus E267, N266 et W416. Cette différence dans la stabilisation des fonctions amine et carboxylate terminales explique pourquoi le composé SA870 a un meilleur IC_{50} que le composé SA375 (respectivement 13,3 μM et 70 μM).

Cependant, les structures mettent en avant un point important : bien que le composé SA870 ait un meilleur IC_{50} grâce à son cycle triazole 1,5, cette configuration ne permet pas d'atteindre la sortie de la poche. Malgré une valeur d' IC_{50} plus forte, le cycle triazole 1,4 du composé SA375 permet lui de sortir de la poche de l'arginine substrat. Afin de poursuivre le développement de ces composés, deux options sont donc possibles : (i) continuer le développement des molécules à partir du composé SA375 et son cycle triazole 1,4, (ii) continuer le développement des molécules en utilisant comme réactifs le composé SA401 et un acide modifié alcyne avec une chaîne carbonée plus longue, afin de pouvoir atteindre la sortie de la poche avec un cycle triazole 1,5.

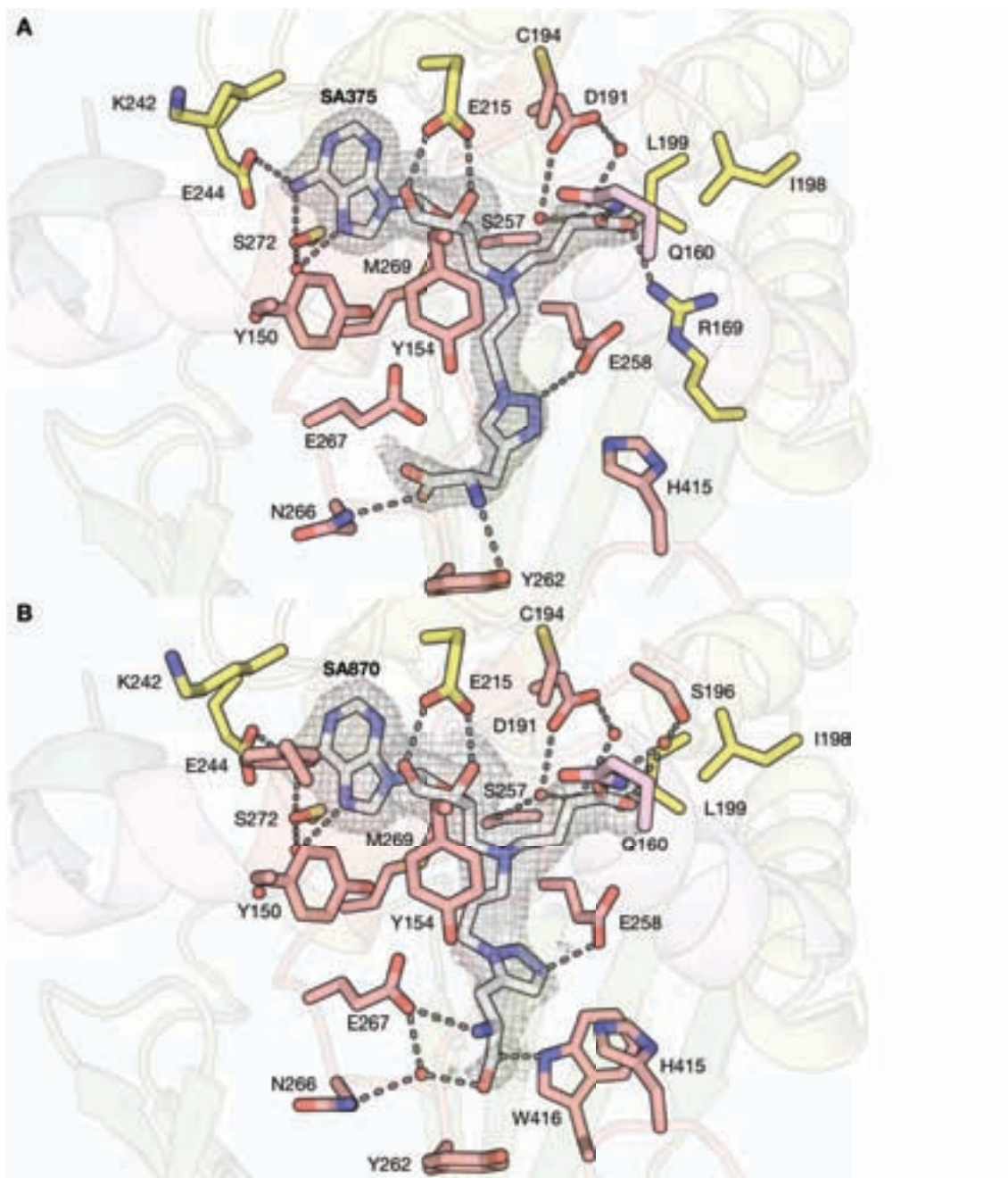


Figure 45 - Structures de 2 composés à cycle triazole dans le site catalytique de CARM1

L'environnement des composés SA375 et SA870 (en blanc) est formé par des résidus appartenant aux motifs I, II, III ou IV (en saumon), mais aussi par des résidus appartenant à l'hélice amino-terminales α Y (en rose), ou plus généralement localisés dans le Rossmann fold (en jaune). Seuls les résidus se situant à moins de 3,5 Å des composés sont représentés. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour des deux cystéines (C53 et C232) avec un contourage à 1,0 σ .

(A) Structure du composé SA375. Figure issue de la structure CARM1_SA375 (statistiques en annexes).

(B) Structure du composé SA870. Figure issue de la structure CARM1_SA870 (statistiques en annexes).

Étude fonctionnelle de la protéine CARM1

Comprendre les mécanismes de reconnaissance et de
méthylation du substrat

CHAPITRE IV - ÉTUDE FONCTIONNELLE DE LA PROTÉINE CARM1 : COMPRENDRE LES MÉCANISMES DE RECONNAISSANCE ET DE MÉTHYLATION DU SUBSTRAT

En complément aux études structurales, des études fonctionnelles ont été menées afin de mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance et de méthylation du substrat par CARM1. Ces études ont été réalisées sur différents peptides substrats ainsi que sur différents mutants de CARM1, pour identifier les résidus essentiels à ce mécanisme au niveau de CARM1 ainsi qu'au niveau du substrat.

A. CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION ENTRE CARM1 ET DIFFÉRENTS PEPTIDES SUBSTRATS

Afin de caractériser l'interaction entre CARM1 et ses substrats, différents peptides dérivés de l'histone H3 et de PABP1 ont été étudiés. Deux méthodes ont été utilisées dans ce but : l'anisotropie de fluorescence et la spectroscopie de corrélation de fluorescence. Ces deux techniques consistent à observer un substrat (ici un peptide) marqué par une sonde fluorescente, afin de caractériser la formation d'un complexe avec une molécule partenaire (pour nous CARM1).

1. CARACTÉRISATION PAR ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE

Les premiers essais de caractérisation de l'interaction entre CARM1 et des peptides substrats ont été réalisés par anisotropie de fluorescence. L'ensemble de ces expériences a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de « Biophotonique des interactions moléculaires et cellulaires » dirigé par Yves Mély. L'anisotropie de fluorescence est une technique consistant à observer le mouvement de rotation d'une sonde fluorescente en solution. Une petite molécule, dont le mouvement est rapide, sera caractérisée par une valeur d'anisotropie basse, tandis qu'une molécule de taille plus importante, dont le mouvement est plus lent, sera caractérisée par une valeur d'anisotropie plus haute. Il est ainsi possible d'observer la formation d'un complexe en marquant l'un des membres avec une sonde fluorescente.

Dans notre cas, nous avons utilisé des peptides marqués à la fluorescéine à leur extrémité amino-terminale pour observer leur fixation à la protéine CARM1 en présence de SAH. À l'état libre, le peptide fluorescent est caractérisé par une valeur d'anisotropie basale. L'augmentation de la concentration de CARM1, favorisant la formation d'un complexe, entraîne une augmentation de l'anisotropie, jusqu'à atteindre un plateau. Ce plateau correspond à l'état

où tout le peptide en solution est lié à CARM1, qui est en excès. La courbe obtenue permet ensuite de déduire une constante de dissociation en fonction de la stœchiométrie estimée. Dans le cas de CARM1, une stœchiométrie de 0,5 a été utilisée. En effet, les structures cristallographiques montrent que l'espace entre les deux monomères est restreint au sein du dimère. Il paraît donc peu probable que chaque monomère puisse recruter un peptide. Les données obtenues ont donc été évaluées pour un modèle où un seul peptide serait fixé par dimère de CARM1.

L'ensemble des expériences d'anisotropie a été réalisé sur une construction de la protéine CARM1 de moustique *Anopheles gambiae* (622 acides aminés pour la forme entière), correspondant au domaine amino-terminal et au domaine catalytique (AgCARM1₁₋₅₀₉). En effet, ces expériences nécessitent une importante quantité de protéine, et la protéine AgCARM1₁₋₅₀₉, dont l'activité a été vérifiée *in vitro*, s'exprime convenablement dans *E. coli* et est facile à purifier, contrairement à la protéine de souris qui doit être exprimée grâce au système baculovirus. De plus, pour ces expériences il est nécessaire que la solution stock de protéine soit très concentrée (> 15 mg.ml⁻¹), ce que nous n'arrivons pas à faire pour la protéine de souris qui s'agrège au-delà de 8 mg.ml⁻¹.

Deux peptides issus de l'histone H3 ont été testés par anisotropie de fluorescence (Tableau 16). Le premier peptide, correspondant aux résidus 1 à 34 de la queue de l'histone H3, possède l'arginine 17 en position centrale. Le deuxième quant à lui, correspondant aux résidus 1 à 41 de l'histone H3, représente l'intégralité de l'extrémité amino-terminale non structurée à l'état libre de l'histone H3. Ces deux peptides ont été synthétisés avec la lysine 18 acétylée, puisque cette modification a été montrée comme pré-requise pour la méthylation de l'histone H3 par la protéine CARM1 [81]. Pour les expériences d'anisotropie de fluorescence, ces 2 peptides ont été marqués à leur extrémité amino-terminale avec de la fluorescéine.

Nom	Séquence
*H3 ₁₋₃₄ K18ac	*-ARTKQTARKS TGGKAPRK ₁₈ QL ATKAARKSAP ATGG ₃₄
*H3 ₁₋₄₁ K18ac	*-ARTKQTARKS TGGKAPRK ₁₈ QL ATKAARKSAP ATGGVKKPHR Y ₄₁

Tableau 16 - Peptides utilisés pour les expériences d'anisotropie de fluorescence

Les noms de peptides précédés d'une étoile * correspondent à des peptides marqués à la fluorescéine. Ce marquage est représenté par une étoile jaune * au début ou à la fin de la séquence, en fonction de la localisation de la sonde fluorescente (respectivement à l'extrémité amino- ou carboxy-terminale). L'arginine 17 qui est méthylée par CARM1 est représentée en violet tandis que la lysine 18 acétylée est représentée en bleu.

Les résultats obtenus lors des expériences d'anisotropie de fluorescence montrent que le peptide court H3₁₋₃₄ K18ac a moins d'affinité que le peptide long H3₁₋₄₁ K18ac (respectivement 85 µM et 24 µM) (Tableau 17). La délétion des résidus 35 à 41 provoque une

chute de plus de 70% de l'efficacité de fixation du peptide issu de l'histone H3. Les résidus 35 à 41 étant situés assez loin du site principal de méthylation (R17), cette différence d'affinité entre le peptide H3₁₋₃₄ K18ac et le peptide H3₁₋₄₁ K18ac met en évidence l'existence d'interactions à longue distance (par rapport au site de méthylation) entre le substrat et la protéine CARM1.

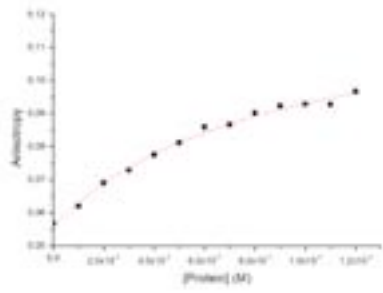
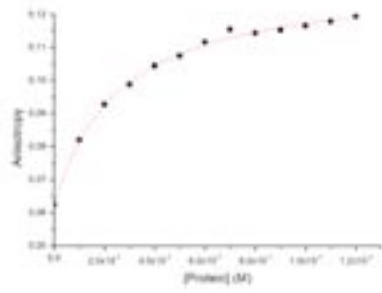
	*H3 ₁₋₃₄ K18ac	*H3 ₁₋₄₁ K18ac
[Peptide]	5 μ M	5 μ M
[SAH]	2 mM	2 mM
[AgCARM1 ₁₋₅₀₉]	0 - 120 μ M	0 - 120 μ M
Courbe expérimentale		
r_{libre}	0,056 \pm 0,001	0,062 \pm 0,001
$r_{\text{lié}}$	0,125 \pm 0,005	0,130 \pm 0,001
n	0,5	0,5
K_a	11821 \pm 1789 M ⁻¹	42253 \pm 3150 M ⁻¹
K_d	85 \pm 13 μ M	24 \pm 2 μ M

Tableau 17 - Estimation du K_d pour CARM1 de peptides dérivés de l'histone H3 par anisotropie de fluorescence
 Les mesures d'anisotropie ont été réalisées dans les conditions indiquées dans la partie « Matériel et méthodes ». Les données expérimentales ont été modélisées par l'équation qui y est décrite en ne fixant que la stœchiométrie.

Cependant, les courbes expérimentales obtenues ne permettent pas de définir une valeur de K_d fiable. En effet, une courbe classique d'observation de la formation d'un complexe en anisotropie présente un plateau lorsque le ligand est saturé en protéine. Au cours des différentes expériences d'anisotropie qui ont été réalisées avec CARM1, il n'a jamais été possible d'atteindre un tel plateau. Même en augmentant la concentration en protéine à plus de 200 μ M, l'anisotropie en solution continue d'augmenter. Ceci est peut-être dû à l'agrégation de la protéine au cours de l'expérience. En effet, l'échantillon reste à 20°C (température de l'expérience) pendant plus de 2 heures, le temps que les mesures soient faites pour les différentes concentrations de CARM1. Les K_d calculés à partir des données expérimentales sont donc certainement sur-estimés.

Les conditions expérimentales d'anisotropie n'étant sans doute pas optimales pour la protéine CARM1, nous nous sommes tournés vers une autre méthode pour caractériser

l'interaction entre CARM1 et des peptides substrats : la spectroscopie de corrélation de fluorescence, qui permet d'utiliser des concentrations en protéine plus basses.

2. CARACTÉRISATION PAR SPECTROSCOPIE DE CORRÉLATION DE FLUORESCENCE

Les expériences de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) ont également été réalisées en collaboration avec le laboratoire de « Biophotonique des interactions moléculaires et cellulaires » dirigé par Yves Mély. Le principe de la FCS est d'observer le mouvement de diffusion d'une sonde fluorescente en solution. Une petite molécule, dont le mouvement est rapide, sera caractérisée par un temps de diffusion court, tandis qu'une molécule de taille plus importante, dont le mouvement est plus lent, sera caractérisée par un temps de diffusion plus long. Il est ainsi possible d'observer la formation d'un complexe en marquant l'un des membres avec une sonde fluorescente.

Comme pour l'anisotropie de fluorescence, nous avons utilisé des peptides marqués à la fluorescéine à leur extrémité amino-terminale. Cependant, la concentration en fluorophore ne devant pas être très élevée pour les mesures de FCS, des versions non-marquées de ces peptides ont été utilisées pour compléter la concentration de peptide en solution. À l'état libre, la fraction de peptide fluorescent est caractérisé par un temps de diffusion assez bas. En augmentant la concentration de CARM1, augmentant ainsi la proportion de complexe, ce temps de diffusion augmente, jusqu'à atteindre un plateau lorsque tout le peptide en solution est lié à la protéine. La courbe obtenue permet ensuite de déduire une valeur de K_d .

Contrairement à l'anisotropie de fluorescence, la FCS ne nécessite pas autant de protéine (60 nmol par expérience d'anisotropie de fluorescence contre 30 nmol en FCS), et la solution stock ne doit pas être aussi concentrée (290 μ M en anisotropie de fluorescence contre 180 μ M en FCS). L'ensemble des expériences de FCS a donc été réalisé sur la protéine mCARM1₁₃₀₋₅₀₇, correspondant au domaine catalytique de la protéine CARM1 de souris.

En plus des 2 peptides déjà testés en anisotropie de fluorescence, 3 autres peptides issus de l'histone H3 ainsi qu'un peptide issu d'un autre substrat de CARM1, PABP1, ont été testés en FCS (Tableau 18). Les 3 nouveaux peptides issus de l'histone H3 ont été synthétisés afin de déterminer l'effet de modifications post-traductionnelles sur la reconnaissance du substrat par CARM1, comme la mono- et la diméthylation de l'arginine 17, ou encore l'acétylation de la lysine 18 [81]. Le peptide issu de PABP1 a quant à lui été synthétisé pour étudier la différence d'affinité entre différents substrats. Pour les mesures de FCS, l'ensemble de ces peptides a été synthétisé sous forme marquée et non-marquée.

Nom ^[a]	Séquence ^[b]	Constante de diffusion ^[c]
*H3₁₋₃₄ K18ac	*-ARTKQTARKS TGGKAPRK _{ac} QL ATKAARKSAP ATGG ₃₄	133 ± 2,9 μm ² .s ⁻¹
*H3₁₋₄₁ K18ac	*-ARTKQTARKS TGGKAPRK _{ac} QL ATKAARKSAP ATGGVKKPHR Y ₄₁	184 ± - μm ² .s ⁻¹
*H3₁₋₄₁	*-ARTKQTARKS TGGKAPRK _{ac} QL ATKAARKSAP ATGGVKKPHR Y ₄₁	135 ± - μm ² .s ⁻¹
*H3₁₋₄₁ R17me1 K18ac	*-ARTKQTARKS TGGKAPRme1K _{ac} QL ATKAARKSAP ATGGVKKPHR Y ₄₁	127 ± 2,9 μm ² .s ⁻¹
*H3₁₋₄₁ R17me2 K18ac	*-ARTKQTARKS TGGKAPRme2K _{ac} QL ATKAARKSAP ATGGVKKPHR Y ₄₁	138 ± - μm ² .s ⁻¹
*PABP₁₄₃₉₋₄₈₄	*-AQ GARPHPFQNM PGAI ₄₃₉ RPAA ₄₅₅ PP ₄₆₀ PFSTMRPAS SQVPRVMSTQ RVAN ₄₈₄	141 ± 2,5 μm ² .s ⁻¹

Tableau 18 - Peptides fluorescents utilisés pour les expériences de spectroscopie de corrélation de fluorescence

[a] Les noms de peptides précédés d'une étoile * correspondent à des peptides marqués à la fluorescéine.

[b] Le marquage à la fluorescéine est représenté par une étoile jaune *- au début ou à la fin de la séquence, en fonction de la localisation de la sonde fluorescente (respectivement à l'extrémité amino- ou carboxy-terminale). Les arginines devant être méthylées par CARM1 sont représentées en violet tandis que les autres résidus pouvant porter des modifications post-traductionnelles sont représentés en bleu.

[c] Les constantes de diffusion ont été déterminées en prenant la TMR comme référence.

La constante de diffusion des peptides a été déterminée à partir de la constante de diffusion de la tétraméthyl-rhodamine (TMR), par comparaison de leurs temps de diffusion (Tableau 18) (voir « Matériel et méthodes »). Pour chaque expérience, la constante de diffusion du complexe CARM1/peptide a été déterminée de la même façon, en prenant comme temps de diffusion la valeur moyenne du plateau. Les valeurs des constantes de diffusion étant stables d'une expérience à l'autre, lorsque l'affinité entre CARM1 et le peptide était trop basse pour atteindre une saturation du peptide, la constante de diffusion du complexe CARM1/peptide a été estimée en prenant les expériences avec le peptide H3₁₋₄₁ K18ac comme référence.

La comparaison des K_d mesurés pour les peptides H3₁₋₃₄ K18ac et H3₁₋₄₁ K18ac montre que la délétion des résidus 35 à 41 provoque une diminution importante de l'affinité (K_d respectifs de 39,8 μM et 4,40 μM) (Figure 46). Les mesures de FCS confirment donc ce qui avait été observé précédemment en anisotropie de fluorescence : la reconnaissance du substrat nécessite des interactions impliquant des résidus éloignés du site de méthylation (R17). Cependant, l'effet observé pour la délétion des résidus 35 à 41 est plus important que celui observé en anisotropie : le K_d du peptide H3₁₋₃₄ K18ac étant 9 fois supérieur à celui du peptide H3₁₋₄₁ K18ac (contre 3 fois en anisotropie de fluorescence).

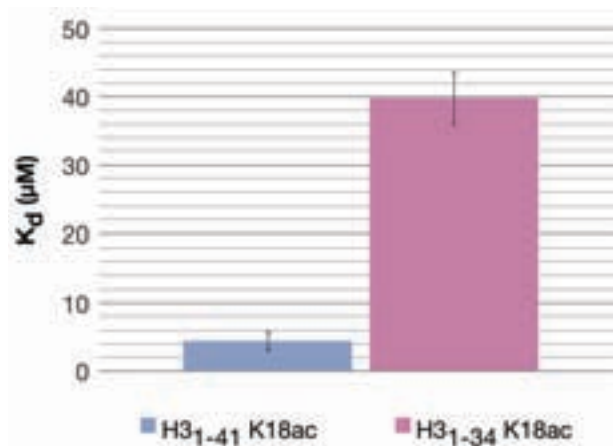


Figure 46 - Mise en évidence d'interactions à longues distances entre CARM1 et l'histone H3 par FCS

Les mesures de FCS ont été réalisées sur des solutions contenant 10 μM de peptide (300 nM de peptide marqué complété par 9,7 μM de peptide non-marqué), en présence de 2 mM de SFG, pour des concentrations croissantes de mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT.

Dans le cas du peptide non-acétylé (H3₁₋₄₁), l'affinité pour le substrat est 4,5 fois moins importante que pour le peptide acétylé (respectivement 19,72 μM et 4,40 μM) (Figure 47). Ces résultats mettent en avant l'importance de l'acétylation de la lysine 18 pour la reconnaissance de l'histone H3 par la protéine CARM1. Cela soutient les études de Daujat et collaborateurs qui ont montré que l'acétylation de la lysine 18 est pré-requise pour la méthylation de l'histone H3 par CARM1 [81].

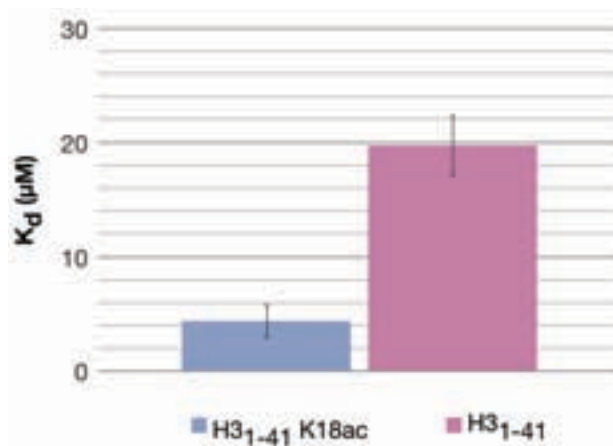


Figure 47 - Caractérisation de l'effet de l'acétylation de la lysine 18 sur l'interaction entre CARM1 et l'histone H3 par FCS

Les mesures de FCS ont été réalisées sur des solutions contenant 10 μM de peptide (300 nM de peptide marqué complété par 9,7 μM de peptide non-marqué), en présence de 2 mM de SFG, pour des concentrations croissantes de mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT.

Il est intéressant de noter que le K_d du peptide monométhylé (H3₁₋₄₁ R17me1/K18ac) est presque 3 fois supérieur à celui du peptide non-méthylé (H3₁₋₄₁ K18ac) (respectivement 12,47 μM et 4,40 μM) (Figure 48). La présence d'un groupement méthyle sur l'arginine 17 perturbe donc la fixation du peptide. Ce résultat suggère un mécanisme de diméthylation dans lequel le substrat ne serait pas libéré par la protéine après la première étape de méthylation. En

effet, si celui-ci était relâché, il y aurait peu de chance pour que la deuxième étape de méthylation ait lieu, puisque CARM1 se lierait préférentiellement à un substrat non-méthylé. Des études sur PRMT1 ont montré que dans le cas où le substrat monométhylé a moins d'affinité que le substrat non-méthylé, la réaction de méthylation est plus rapide envers le substrat monométhylé, pour que la diméthylation puisse avoir lieu [237]. Quoiqu'il en soit, le K_d du peptide diméthylé (H3₁₋₄₁ R17me2/K18ac) est largement supérieur à ceux des peptides non- ou monométhylé (25,9 μ M) (Figure 48), ce qui est cohérent avec le fait que ce soit le produit final de la réaction.

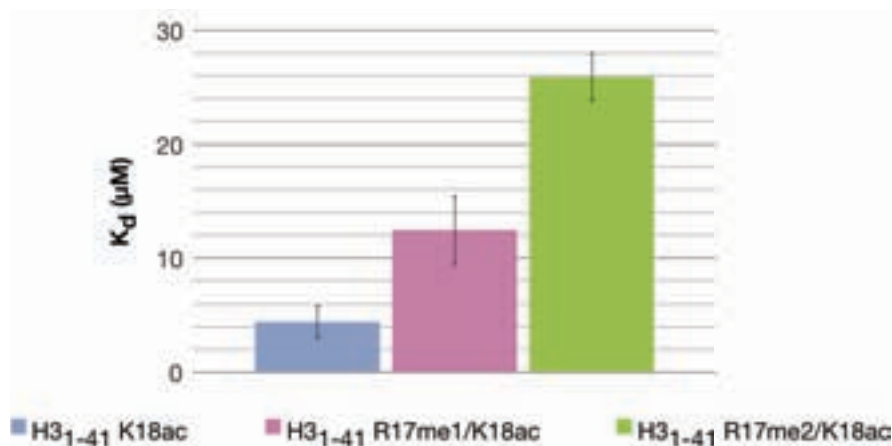


Figure 48 - Caractérisation de l'effet du degré de méthylation sur l'interaction entre CARM1 et l'histone H3 par FCS

Les mesures de FCS ont été réalisées sur des solutions contenant 10 μ M de peptide (300 nM de peptide marqué complété par 9,7 μ M de peptide non-marqué), en présence de 2 mM de SFG, pour des concentrations croissantes de mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT.

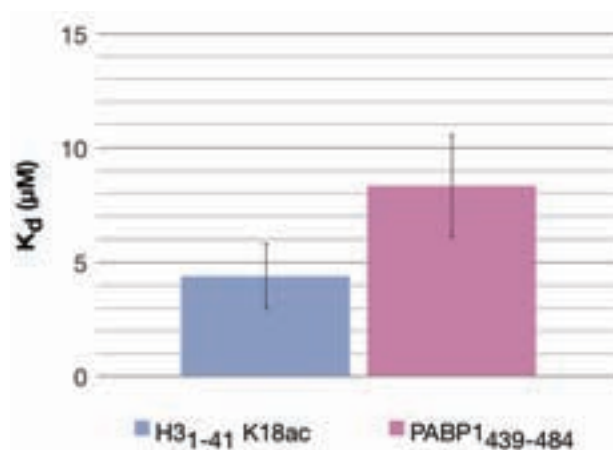


Figure 49 - Caractérisation de l'interaction entre CARM1 et différents substrats par FCS

Les mesures de FCS ont été réalisées sur des solutions contenant 10 μ M de peptide (300 nM de peptide marqué complété par 9,7 μ M de peptide non-marqué), en présence de 2 mM de SFG, pour des concentrations croissantes de mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT.

Le peptide dérivé de PABP1 (PABP1₄₃₉₋₄₈₄) a été conçu autour des deux arginines étant méthylées par CARM1, afin qu'il soit de longueur comparable au peptide long issu de l'histone H3 (H3₁₋₄₁ K18ac). Son affinité semble 2 fois moins bonne que pour H3₁₋₄₁ K18ac (K_d respectifs

de 8,32 μM et 4,40 μM) (Figure 49), ce qui met en évidence une reconnaissance préférentielle de CARM1 pour l'histone H3.

B. ÉTUDES DE DIFFÉRENTES CONSTRUCTIONS DE CARM1 ET DE MUTANTS PONCTUELS

L'effet d'une mutation sur l'activité catalytique peut-être expliqué de 4 manières : (i) le résidu est essentiel à la stabilité de l'enzyme, (ii) le résidu participe au mécanisme catalytique, (iii) le résidu est impliqué dans la fixation du cofacteur, (iv) le résidu est impliqué dans la fixation du substrat. Différents mutants ont été testés en FCS et par des tests d'affinité afin de caractériser le rôle des résidus correspondants dans la fonction de méthylation de CARM1 (Tableau 19).

Mutant	Caractéristiques	Référence
Références		
mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT	Domaine catalytique <i>Activité de méthylation maximale (comparable à l'activité de la protéine entière)</i>	-
Constructions plus courtes		
mCARM1₁₃₀₋₄₈₀ WT	Domaine catalytique tronqué à l'extrémité carboxy-terminale <i>Activité de méthylation faible</i>	-
mCARM1₁₄₀₋₄₈₀ WT	Domaine catalytique tronqué aux extrémités amino- et carboxy-terminales <i>Activité de méthylation nulle</i>	-
Mutants ponctuels		
mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ R141A	Rossmann fold - Hélice $\alpha\text{X}'$ <i>Stabilisation de la partie adénine du SAM</i>	-
mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ Q160N	Rossmann fold - Hélice αY <i>Stabilisation du groupement sulfonium du SAM</i>	-
mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ N162A	Rossmann fold - Hélice αY <i>Conservation chez CARM1, mais pas au sein des autres PRMT</i>	-
mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ R169A	Rossmann fold - Hélice αZ <i>Stabilisation du groupement carboxylate du SAM</i>	[151, 250]
mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ N266A/H/Q	Rossmann fold - Motif III <i>Conservation chez CARM1, mais pas au sein des autres PRMT</i>	-
mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ H415A/F/W	Tonneau β - Motif IV <i>Conservation au sein des PRMT</i>	-
mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ S448E	Tonneau β - Brin β14 <i>Site de phosphorylation</i>	[238]

Tableau 19 - Constructions et mutants de la protéine CARM1

1. CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION AVEC LE PEPTIDE H3 1-41 K18AC

L'interaction de la protéine CARM1 avec l'histone H3 a été caractérisée par des mesures de FCS de différents mutants du site catalytique. Le peptide H3₁₋₄₁ K18ac a été utilisé

comme substrat, puisqu'il a précédemment été caractérisé comme ayant la meilleure affinité parmi tous les peptides testés. La fixation du cofacteur étant nécessaire à la formation de la poche de fixation de l'arginine substrat [153], l'ensemble des mesures a été réalisé en présence d'un large excès de cofacteur (2 mM SFG). Pour un mutant donné, l'effet de la mutation sur la fixation du cofacteur (ici, en l'occurrence l'inhibiteur SFG) est ainsi minimisé, ainsi que l'effet indirect sur la reconnaissance du substrat qui en découle. L'effet direct de la mutation sur la fixation du peptide peut ainsi être observée de manière optimale. La construction mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT a été utilisée comme référence, puisqu'elle a précédemment été montrée comme suffisante pour avoir une activité de méthylation maximale [159].

De précédentes études ont montré l'importance des extrémités amino- et carboxy-terminales du domaine catalytique pour l'activité de méthylation [159]. Alors que la construction mCARM1₁₄₀₋₄₈₀ WT est totalement inactive ($k_{obs} < 0,001 \text{ min}^{-1}$), l'utilisation d'une construction comportant les résidus 481 à 507 (mCARM1₁₄₀₋₅₀₇ WT) permet de retrouver un peu d'activité ($k_{obs} = 0,004 \text{ min}^{-1}$; mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT $k_{obs} = 0,18 \text{ min}^{-1}$). Ceci a permis de mettre en évidence l'importance des résidus 130 à 139 ainsi que des résidus 481 à 507 pour la fonction de méthylation de CARM1. Les mesures de FCS corroborent ces résultats, puisque les résidus 481 à 507 semblent nécessaires à la fixation du peptide, la suppression de l'extrémité carboxy-terminale du site catalytique provoquant une augmentation de presque 2 fois du K_d (mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT : 4,40 μM ; mCARM1₁₃₀₋₄₈₀ WT : 8,27 μM) (Figure 50). En plus de l'implication évidente des résidus 130 à 139 dans la fixation du cofacteur [153, 159], les mesures de FCS ont permis de mettre en évidence l'importance de ces résidus dans la reconnaissance du substrat, puisque la suppression de l'extrémité amino-terminale du site catalytique provoque elle aussi une augmentation de presque 2 fois du K_d en présence d'un fort excès de cofacteur (mCARM1₁₃₀₋₄₈₀ WT : 8,27 μM ; mCARM1₁₄₀₋₄₈₀ WT : 15,63 μM) (Figure 50).

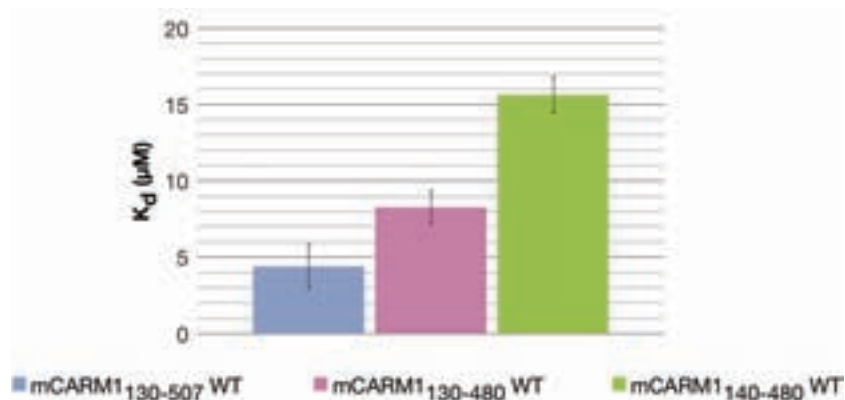


Figure 50 - Caractérisation de l'interaction entre différentes constructions de CARM1 et l'histone H3 par FCS

Les mesures de FCS ont été réalisées sur des solutions contenant 10 μM de peptide H3₁₋₄₁ K18ac (300 nM de peptide marqué complété par 9,7 μM de peptide non-marqué), en présence de 2 mM de SFG, pour des concentrations croissantes de mCARM1.

Un certain nombre de mutants ponctuels (R141A, Q160N et R169A) est impliqué dans la stabilisation du cofacteur. Bien que les mesures de FCS soient réalisées en présence d'un large excès de SFG, un effet sur la fixation du peptide est toujours visible. L'effet le plus important est celui de la mutation R169A, dont le K_d est presque 19 fois supérieur à celui de la protéine sauvage (mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT : 4,40 μ M ; mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ R169A : 82,5 μ M) (Figure 51). Le K_d pour ce mutant a également été mesuré en absence de SFG, et le fait qu'il soit du même ordre de grandeur laisse supposer que ce dernier est totalement incapable de fixer la SFG. Concernant les deux autres mutants, la variation de K_d observée est certainement due à une réorganisation locale du site catalytique suite aux mutations. En effet, comme le montre le modèle de CARM1 en complexe avec un peptide, ces résidus ne sont pas en contact direct avec le substrat.

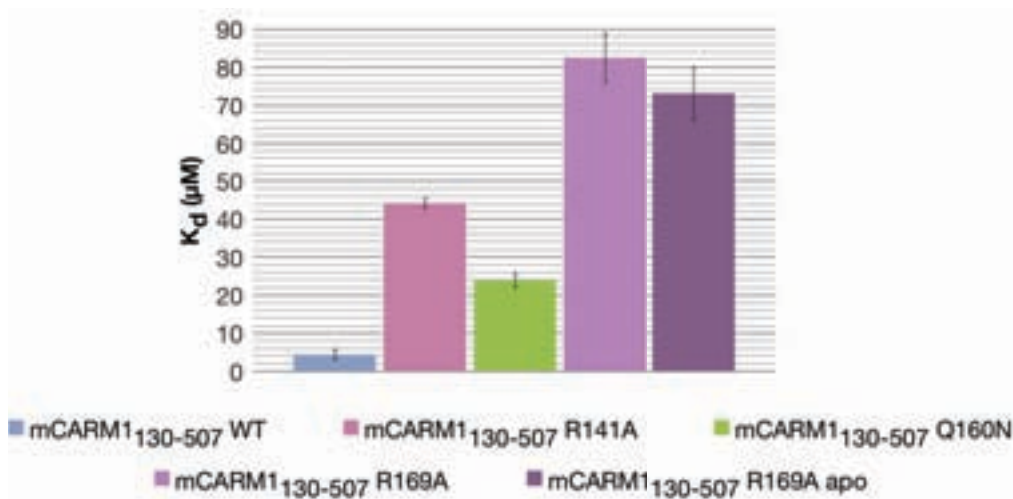


Figure 51 - Caractérisation de l'interaction entre différents mutants de la poche de fixation du cofacteur par FCS

Les mesures de FCS ont été réalisées sur des solutions contenant 10 μ M de peptide H3₁₋₄₁ K18ac (300 nM de peptide marqué complété par 9,7 μ M de peptide non-marqué), en présence de 2 mM de SFG, pour des concentrations croissantes de mCARM1.

[a] Mesures de FCS réalisées en absence de SFG.

Concernant les autres mutants (H415F, N266A et S448E), ceux-ci sont plutôt situés au niveau de la poche de fixation de l'arginine substrat, ou encore de la surface potentielle de reconnaissance du peptide (Figure 53). L'augmentation de 5 à 15 fois du K_d observée par rapport au K_d de la protéine sauvage montre que ces résidus participent à la fixation du substrat (mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT : 4,40 μ M ; mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ H415F : 53,1 μ M ; mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ N266A : 67,3 μ M ; mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ S448E : 22,6 μ M). La substitution du résidu S448 par un glutamate mime la phosphorylation de la sérine, de par la charge et l'encombrement stérique apportés. La phosphorylation du résidu S448 a été montré comme étant nécessaire à l'interaction avec le récepteur ER α dans le cadre de l'activation de la transcription hormone-indépendante [238]. Le fait que cette substitution influence négativement la reconnaissance de

l'histone H3 montre que cette phosphorylation n'est cependant pas nécessaire pour la fixation du substrat au cours de l'activité de méthylation.

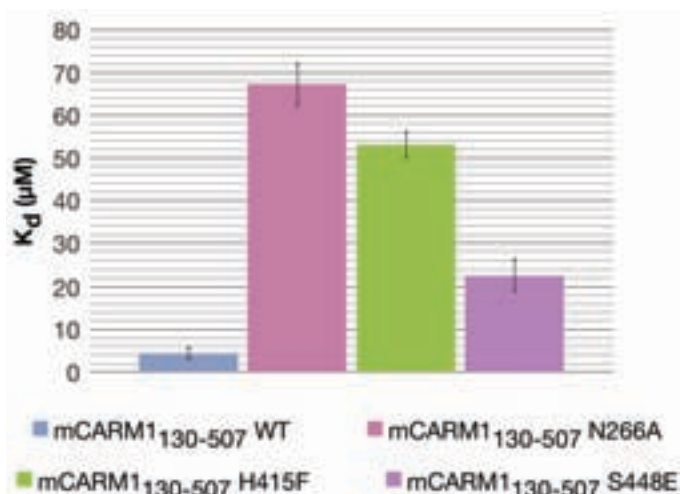


Figure 53 - Caractérisation de l'interaction entre différents mutants de la reconnaissance du substrat et l'histone H3 par FCS

Les mesures de FCS ont été réalisées sur des solutions contenant 10 μM de peptide H3₁₋₄₁ K18ac (300 nM de peptide marqué complété par 9,7 μM de peptide non-marqué), en présence de 2 mM de SFG, pour des concentrations croissantes de mCARM1.

En regardant de plus près les mesures de K_d obtenues en absence de cofacteur (Figure 54), les valeurs obtenues pour mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT en présence et en absence de SFG semblent proches (K_d respectifs de 4,40 μM et 9,25 μM). En effet, pour des constructions ou mutants fixant mal le cofacteur, comme mCARM1₁₄₀₋₄₈₀ WT ou encore mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ R169A, la valeur de K_d en absence de SFG est plus de 15 fois supérieure à la valeur de K_d pour mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT en présence de SFG. Bien qu'un effet direct de la modification apportée à CARM1 sur la fixation du peptide n'est pas à exclure, il semblerait que la valeur de K_d en absence de SFG pour mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT soit surestimée. Ceci peut être dû à la présence résiduelle de SAM ou SAH endogène, de manière culture-dépendante. En effet, en fonction des lots de CARM1 produite en cellules d'insecte, il est parfois possible d'observer un léger décalage du pic d'absorbance de la protéine entre 280 nm et 260 nm, même après la dernière étape de purification (ratio $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ de 0,62). Ce décalage peut être expliqué par la présence de SAM ou de SAH dans la protéine, dont la partie adénosine absorbe à 260 nm. Ce phénomène n'est pas observé pour la construction mCARM1₁₄₀₋₄₈₀ WT et le mutant mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ R169A qui fixent mal le cofacteur (ratios $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ respectifs de 0,54 et 0,55). Il serait donc plus juste de prendre la valeur de K_d du mutant R169A pour caractériser l'affinité du peptide en absence de cofacteur.

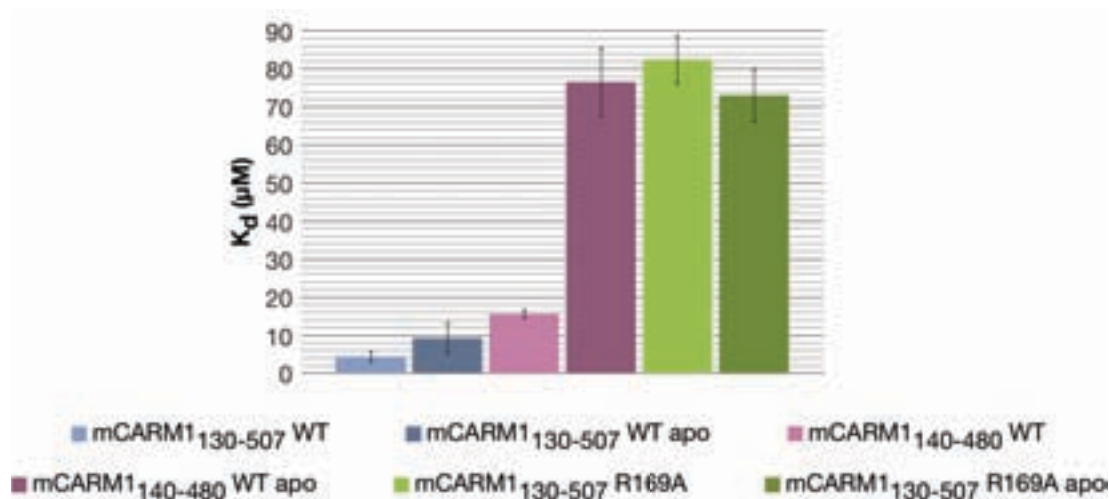


Figure 54 - Caractérisation de l'interaction entre CARM1 et l'histone H3 en absence de cofacteur par FCS
 Les mesures de FCS ont été réalisées sur des solutions contenant 10 μM de peptide H3₁₋₄₁ K18ac (300 nM de peptide marqué complété par 9,7 μM de peptide non-marqué), en présence de 2 mM de SFG, pour des concentrations croissantes de mCARM1.

2. TESTS D'ACTIVITÉ

En plus des mesures de K_d réalisées grâce aux expériences de FCS, des tests d'activité ont été réalisés afin de caractériser le rôle de différents acides aminés dans la reconnaissance du cofacteur SAM et du substrat ainsi que dans le mécanisme catalytique. Ceux-ci ont été réalisés en utilisant la protéine PABP1 comme substrat, et du SAM ¹⁴C comme cofacteur. Des concentrations variables en substrat et en cofacteur ont été utilisées, afin de définir les constantes cinétiques dépendant de ces derniers. Pour chaque mutant, des valeurs de K_m et de k_{cat} pour PABP1 et le SAM ont ainsi pu être calculées. Le K_m est une constante définissant l'affinité « apparente » de l'enzyme pour le substrat, alors que le k_{cat} est une constante cinétique caractérisant le « turnover » de l'enzyme. Le rapport entre ces deux paramètres permet ainsi de définir l'efficacité catalytique globale. Comme pour les mesures de FCS, la construction mCARM1₁₃₀₋₅₀₇ WT a été utilisée comme référence, puisqu'il a précédemment été montré que cette construction est suffisante pour avoir une activité de méthylation maximale [159].

L'analyse des données expérimentales pour la construction mCARM1₁₄₀₋₄₈₀ WT montre que la délétion des résidus 130 à 139 a un effet plus important sur la reconnaissance du substrat que sur la fixation du cofacteur (K_m pour PABP1 35,7 fois supérieur au K_m de référence, en comparaison au K_m pour le SAM qui est seulement 4,9 fois supérieur au K_m de référence) (Figure 55). Cependant, la réaction est plus rapide, avec un k_{cat} 2,4 fois supérieur au k_{cat} de référence (Figure 55). L'échange de molécules au niveau du site réactionnel est donc facilité lorsque l'extrémité amino-terminale du domaine catalytique est absente, possiblement grâce à une diminution des contraintes stériques à cet endroit. Cependant, le gain en rapidité

de réaction ne permet pas de compenser la perte d'affinité pour le substrat, l'efficacité de la protéine mCARM1₁₄₀₋₄₈₀ WT étant toujours plus de 14 fois supérieure à la protéine de référence (ratio k_{cat}/K_m respectifs de $2,07 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et $3,04 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

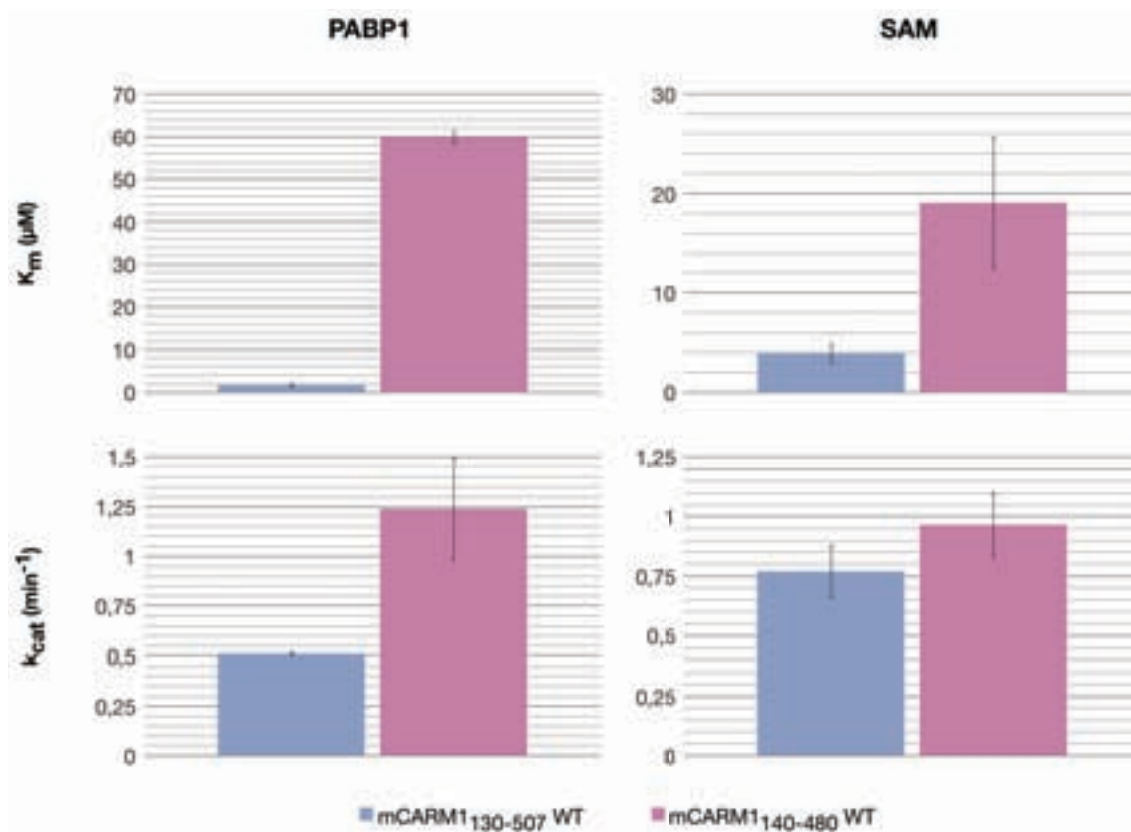


Figure 55 - Constantes cinétiques pour la construction mCARM1₁₄₀₋₄₈₀ WT

Caractérisation des constantes cinétiques pour PABP1 (substrat) : mesures réalisées en présence de 21 μM de SAM ¹⁴C pour différentes concentrations en PABP1. Caractérisation des constantes cinétiques pour le SAM (donneur de méthyle) : mesures réalisées en présence de 50 μM de PABP1 pour différentes concentrations en SAM ¹⁴C. Les valeurs présentées sont les résultats moyens d'au moins 2 expériences avec comme erreur la déviation standard correspondante.

Concernant le mutant R169A, aucune activité n'a pu être observée, quelle que soit les concentrations en PABP1 et en SAM utilisées (Figure 56). Ceci confirme donc l'incapacité de ce mutant à fixer le cofacteur. Pour les autres mutants de la poche de fixation du SAM (Q160N et N162A), les constantes cinétiques K_m et k_{cat} sont toujours de l'ordre de grandeur de celles de la protéine sauvage de référence, montrant que ces mutations n'ont pas d'influence significative sur les mécanismes de reconnaissance du substrat et catalytiques (Figure 56).

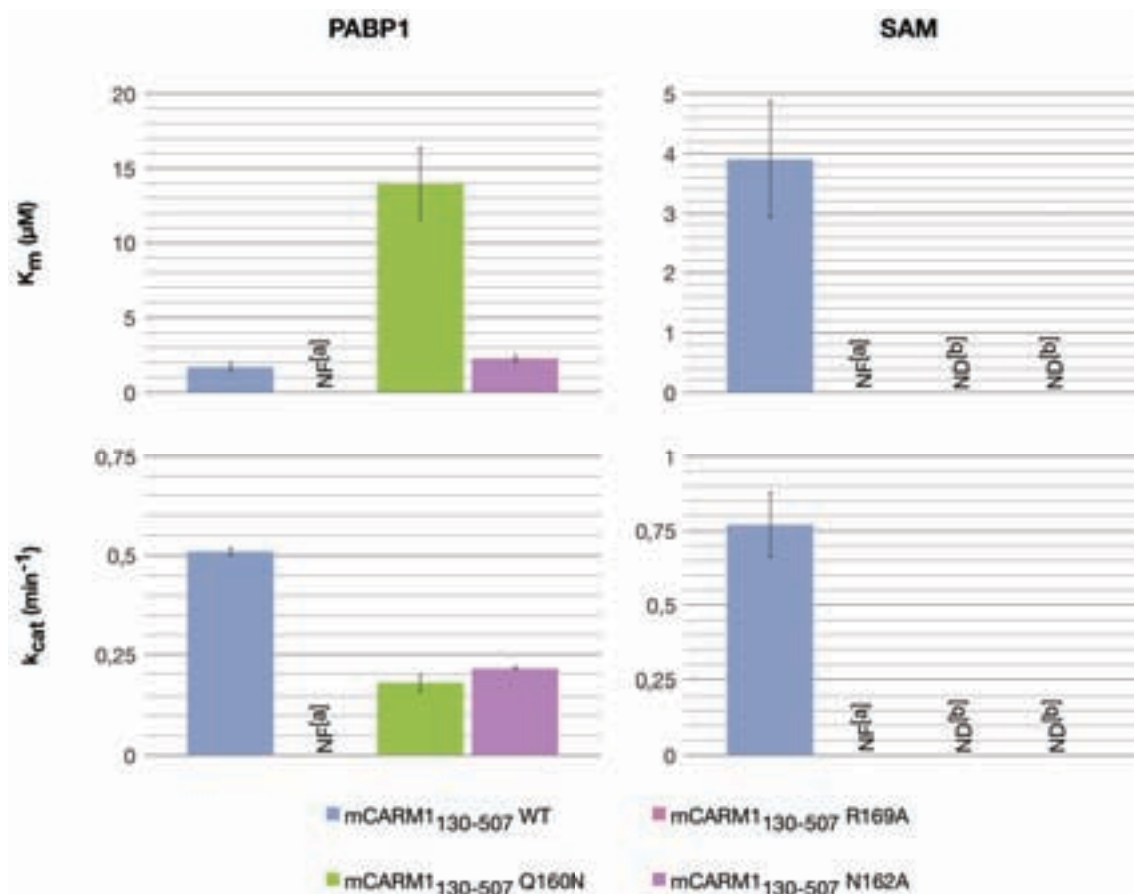


Figure 56 - Constantes cinétiques pour les mutants de la poche de fixation du SAM

Caractérisation des constantes cinétiques pour PABP1 (substrat) : mesures réalisées en présence de 21 μM de SAM ^{14}C pour différentes concentrations en PABP1. Caractérisation des constantes cinétiques pour le SAM (donneur de méthyle) : mesures réalisées en présence de 50 μM de PABP1 pour différentes concentrations en SAM ^{14}C . Les valeurs présentées sont les résultats moyens d'au moins 2 expériences avec comme erreur la déviation standard correspondante.

[a] Non-fonctionnel.

[b] Non-déterminé.

Le mutant H415F, situé au niveau de la poche de fixation de l'arginine substrat, montre un K_m pour PABP1 significativement supérieur à celui de la protéine sauvage (K_m respectifs de 17,2 μM et 1,68 μM) (Figure 57), mais l'effet de la mutation est principalement visible au niveau de la vitesse de réaction. En effet, le k_{cat} de la protéine mutante est plus de 20 fois supérieur à celui de la protéine sauvage (k_{cat} respectifs de 0,022 min^{-1} et 0,51 min^{-1}) (Figure 57). Ces résultats traduisent donc une implication du résidu H415 à la fois dans la reconnaissance du substrat et dans le mécanisme catalytique. La mutation de ce même résidu en tryptophane a un effet similaire mais moins important (Figure 57).

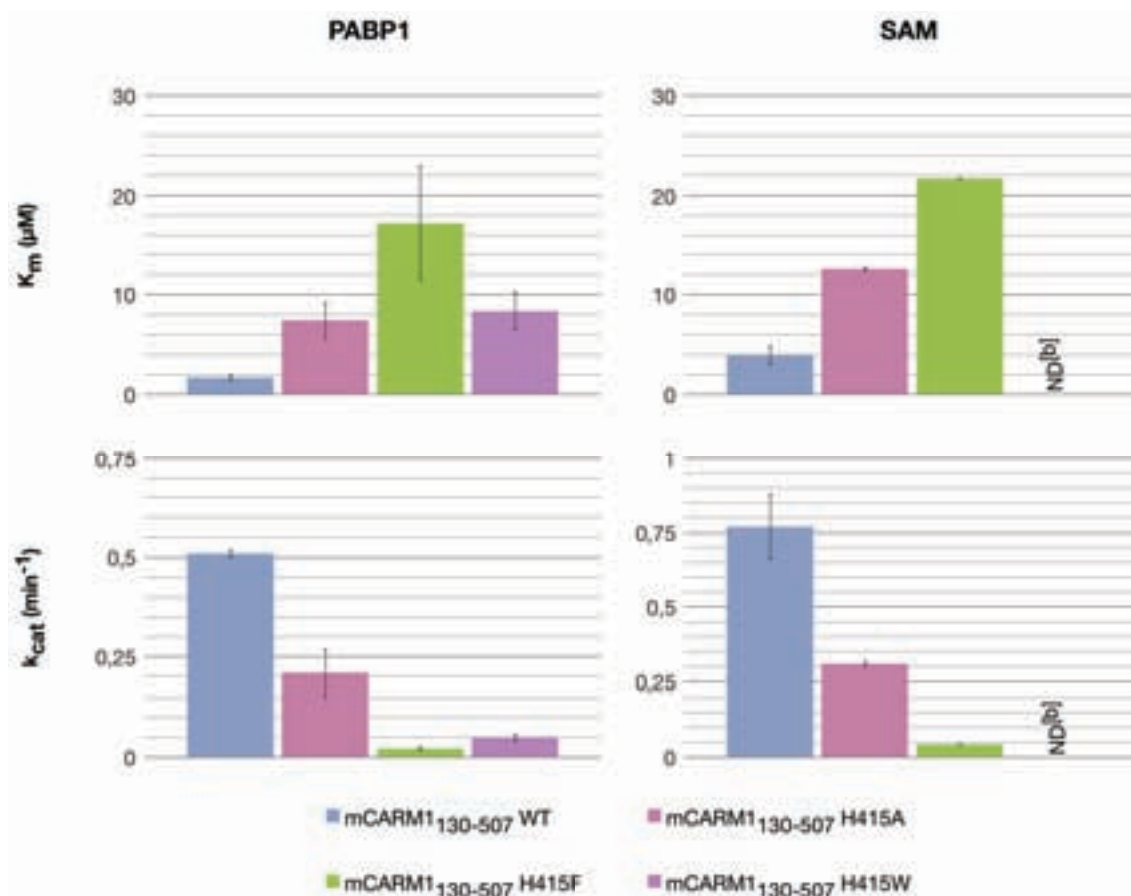


Figure 57 - Constantes cinétiques pour les mutants de l'histidine H415

Caractérisation des constantes cinétiques pour PABP1 (substrat) : mesures réalisées en présence de 21 μM de SAM ^{14}C pour différentes concentrations en PABP1. Caractérisation des constantes cinétiques pour le SAM (donneur de méthyle) : mesures réalisées en présence de 50 μM de PABP1 pour différentes concentrations en SAM ^{14}C . Les valeurs présentées sont les résultats moyens d'au moins 2 expériences avec comme erreur la déviation standard correspondante.

[b] Non-déterminé.

La mutation du résidu N266 en alanine semble quant à elle influencer l'ensemble des constantes cinétiques : le K_m pour PABP1 est plus de 20 fois supérieur à celui de la protéine sauvage, celui pour le SAM plus de 10 fois supérieur, et il en est de même pour les valeurs de k_{cat} (Figure 58). Étant donné la distance séparant ce résidu de la poche de fixation du cofacteur, il se peut que la variation de K_m observée pour le SAM soit due à l'importante perturbation de la reconnaissance du substrat. En effet, si l'affinité du mutant N266A pour PABP1 est aussi mauvaise que ce qui a été montré pour l'histone H3 en FCS, alors la concentration en substrat utilisée pour les mesures de constantes cinétiques du SAM n'était peut-être pas suffisamment élevée pour saturer la protéine en substrat. Le même effet n'est pas observé pour les mutations N266H et N266Q (Figure 58). Alors que la mutation N266H est une mutation conservatrice (conservation de la position de l'atome d'azote), la mutation N266Q augmente les contraintes stériques (la chaîne latérale d'une glutamine contient 1 carbone de plus que la chaîne latérale d'une asparagine). L'absence d'effet de ces mutations montre que l'importance de l'asparagine N266 est liée à son groupement amine terminal.

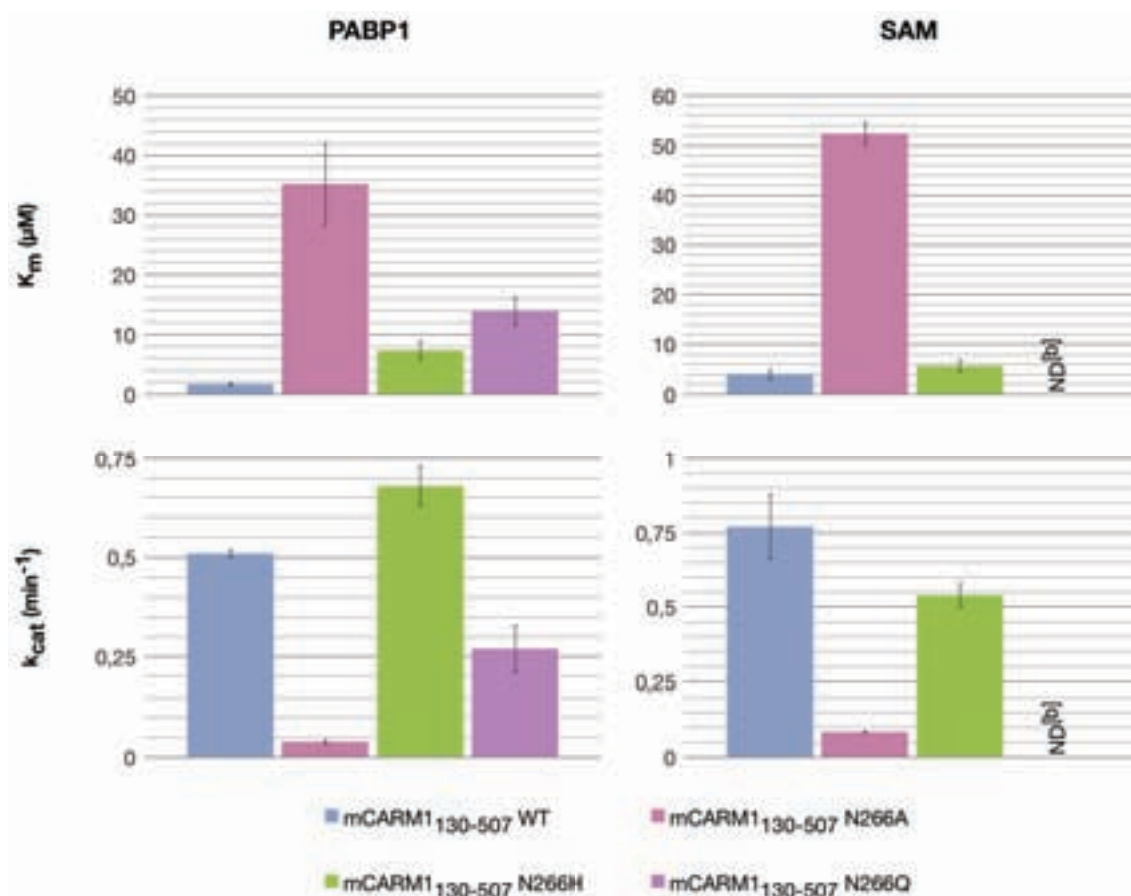


Figure 58 - Constantes cinétiques pour les mutants de l'asparagine N266

Caractérisation des constantes cinétiques pour PABP1 (substrat) : mesures réalisées en présence de 21 µM de SAM ¹⁴C pour différentes concentrations en PABP1. Caractérisation des constantes cinétiques pour le SAM (donneur de méthyle) : mesures réalisées en présence de 50 µM de PABP1 pour différentes concentrations en SAM ¹⁴C. Les valeurs présentées sont les résultats moyens d'au moins 2 expériences avec comme erreur la déviation standard correspondante.
[b] Non-déterminé.

Concernant la mutation mimant la phosphorylation de la sérine S448 (S448E), le même effet de perturbation de la reconnaissance du substrat est observé que pour les mesures de FCS (K_m pour PABP1 16,5 fois supérieur à celui de référence) (Figure 59). Au-delà de cet effet sur la fixation de PABP1, cette mutation semble également affecter la vitesse de méthylation (k_{cat} 10 fois supérieur à celui de la protéine sauvage) (Figure 59), traduisant sans doute une réorganisation de l'environnement autour de ce résidu. La triple mutation Y262F/Y417F/Y477F ne semble quant à elle pas perturber de manière significative le mécanisme catalytique de CARM1 (Figure 7).

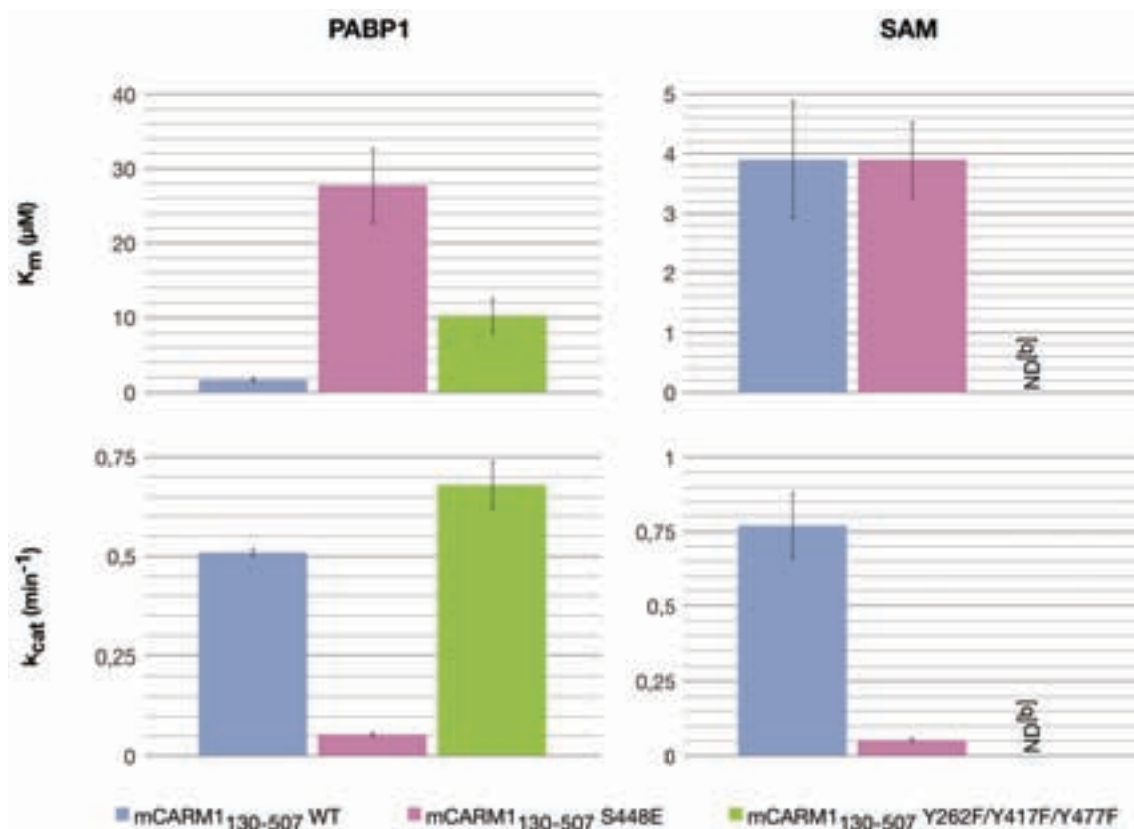


Figure 59 - Constantes cinétiques pour les mutants de la surface de reconnaissance du substrat

Caractérisation des constantes cinétiques pour PABP1 (substrat) : mesures réalisées en présence de 21 μM de SAM ^{14}C pour différentes concentrations en PABP1. Caractérisation des constantes cinétiques pour le SAM (donneur de méthyle) : mesures réalisées en présence de 50 μM de PABP1 pour différentes concentrations en SAM ^{14}C . Les valeurs présentées sont les résultats moyens d'au moins 2 expériences avec comme erreur la déviation standard correspondante.

[b] Non-déterminé.

3. CARACTÉRISATION STRUCTURALE

Afin de vérifier que l'effet de la mutation N266A sur l'ensemble des constantes cinétiques n'est pas dû à une complète déstabilisation de CARM1, la structure de la protéine mutante a été résolue. Cette structure a permis de mettre en évidence l'importance de ce résidu dans la formation de la poche de fixation de l'arginine. En effet, l'asparagine 266 stabilise la position du glutamate E267 par le biais d'une molécule d'eau (Figure 60A). Lorsque ce résidu est muté en alanine, et qu'il ne peut donc pas former de liaison hydrogène avec une molécule d'eau, la chaîne latérale du glutamate est décalée vers la sortie de la poche de fixation de l'arginine substrat (Figure 60A). Cependant, étant donné l'effet drastique de la mutation N266A sur la fixation du peptide H3 (K_d 15 fois supérieur à celui de la protéine sauvage), il est possible que la chaîne latérale de ce résidu soit également impliquée dans des interactions avec le peptide substrat, éventuellement avec l'extrémité de la chaîne latérale de la lysine acétylée (Figure 60B).

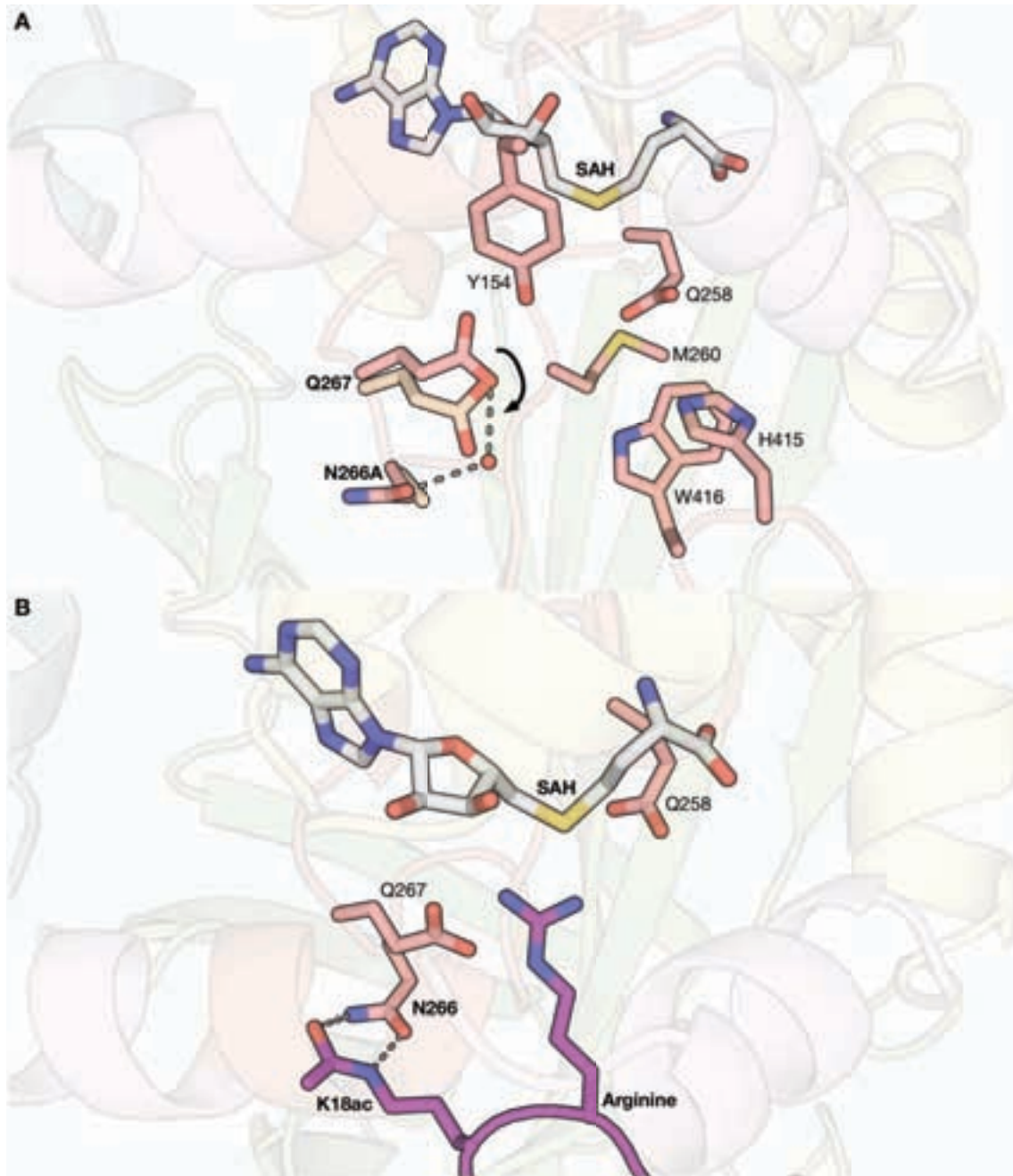


Figure 60 - Importance du résidu N266 pour les mécanismes de reconnaissance et de méthylation du substrat
 Dans ces figures, le SAH est représenté en blanc et les résidus de CARM1 en saumon.
 (A) Effet de la mutation N266A sur l'organisation de la poche de fixation de l'arginine substrat (résidus variants de la structure du mutant couleur blé). Figure issue des structures CARM1_SAH (sauvage) et CARM1_M266A (mutant N266A) (statistiques en annexes).
 (B) Modèle de reconnaissance du résidu K18ac de l'histone H3 (en violet) par l'asparagine 266

**Modèle mécanistique
de la reconnaissance et de la méthylation par CARM1**

CHAPITRE V - MODÈLE MÉCANISTIQUE DE LA RECONNAISSANCE ET DE LA MÉTHYLATION PAR CARM1

A. ORDRE DE LA FIXATION ET DE LA LIBÉRATION DU COFACTEUR ET DU SUBSTRAT

Différentes études ont déjà été menées, visant à élucider le mécanisme de méthylation catalysé par les PRMT. En 2008, l'équipe de Thompson, dans une étude sur PRMT1, a proposé un mécanisme aléatoire, où l'ordre de fixation cofacteur/substrat ne serait pas important [239] : la fixation du substrat et du SAM, ainsi que la libération du peptide méthylé et du SAH se produiraient sans ordre déterminant. Cependant, la même année, l'équipe de Frankel, dans une étude sur PRMT6 cette fois-ci, a proposé un mécanisme de type séquentiel, où la fixation du SAM précéderait la fixation du substrat [240]. Ces résultats sont appuyés par les travaux de Zheng et collaborateurs, dont l'étude sur PRMT1 a montré que cette enzyme serait aussi impliquée dans un mécanisme séquentiel, où le peptide serait éjecté du site catalytique après la réaction de méthylation [241].

Les données structurales de CARM1 soutiennent ce mécanisme séquentiel. En effet, les structures publiées en 2007 ont mis en évidence une transition désordre-ordre lors de la fixation du cofacteur, nécessaire à la formation de la poche de fixation de l'arginine substrat [153]. Cette caractéristique soutient donc l'hypothèse que le SAM vienne se fixer avant le substrat. De son côté, l'organisation des PRMT sous forme de dimères permettrait de ne pas avoir à libérer le substrat après l'étape de monométhylation, l'étape de diméthylation pouvant avoir lieu dans le deuxième site actif du dimère. En effet, le modèle réalisé pour CARM1 en présence d'un peptide montre que l'étranglement de la cavité du dimère permet un retournement du peptide autour de la position de l'arginine méthylée d'un monomère à l'autre, tout en restant en contact par ses extrémités avec le premier monomère. Ces mécanismes ne sont pour l'instant que des hypothèses devant être confirmées.

Une structure a récemment été résolue au sein de l'équipe, présentant une forme décarboxylée du SAH. Il faut noter que le SAH dégradé n'adopte pas la conformation habituelle du cofacteur dans le site catalytique de CARM1. En effet, la partie méthionine, à laquelle il manque ici le groupement carboxyle, est logée dans la poche de fixation de l'arginine. De manière générale, cette conformation particulière n'induit pas de changement drastique dans l'organisation du site catalytique de CARM1 (Figure 61). La seule différence flagrante concerne le glutamate E258 qui, au lieu d'être orienté vers la poche de fixation de l'arginine (Figure 61A), est retournée vers la poche où se trouve normalement la partie méthionine du cofacteur (Figure 61B). Cependant, cette conformation est peu concevable

pour une molécule de SAM non dégradé. En effet, le groupement carboxyle de la partie méthionine du cofacteur serait en conflit avec les charges négatives présentes dans la poche de fixation de l'arginine de l'enzyme. Cette structure montre que le site catalytique peut accommoder plusieurs conformations possibles de la partie méthionine du SAM, pouvant éventuellement correspondre à un chemin pour l'entrée/sortie du cofacteur.

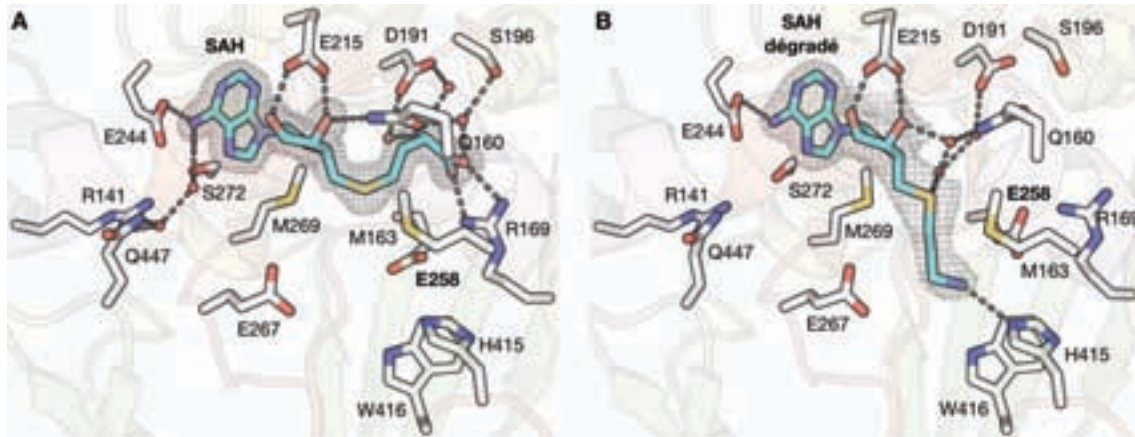


Figure 61 - Mouvement du résidu E258 pour des conformations différentes du SAH

Les résidus de mCARM1 formant le site actif sont représentés en blanc, tandis que le SAH (intègre et décarboxylé) est représenté en cyan. La densité électronique $2F_o - F_c$ est représentée autour du SAH (intègre et décarboxylé) avec un contourage à $1,0 \sigma$.

(A) Site catalytique de CARM1 en présence de SAH. Figure issue de la structure CARM1_SAH résolue à $1,77 \text{ \AA}$ avec un R_{free} de $21,0\%$ (statistiques en annexes).

(B) Site catalytique de CARM1 en présence de SAH dégradé. Figure issue de la structure SAH_décarboxylé résolue à $2,3 \text{ \AA}$ avec un R_{free} de $25,72\%$ (statistiques en annexes).

B. MÉCANISME CATALYTIQUE DE LA RÉACTION DE MÉTHYLATION

Le modèle CARM1/peptide réalisé à partir des structures cristallographiques de CARM1 montre que les deux résidus glutamate E258 et E267 du site actif stabilisent le groupement guanidinium plan de l'arginine substrat grâce à des liaisons hydrogène (Figure 62). L'implication de ces résidus dans le mécanisme catalytique a été confirmée par des études de mutagenèse, montrant que la mutation en glutamine de ces 2 résidus provoque une perte d'activité, chez PRMT1 comme chez CARM1 [151, 152, 242].

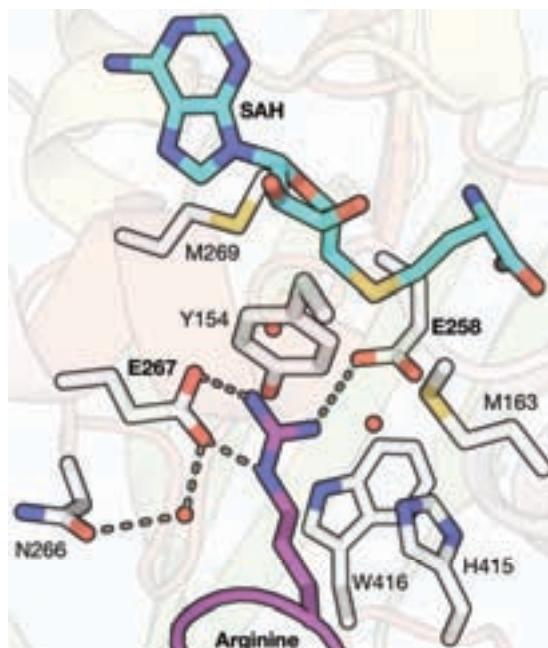


Figure 62 - Stabilisation potentielle du groupement guanidinium de l'arginine substrat par 2 glutamates du site actif de CARM1

Modèle de peptide docké dans le site catalytique de CARM1. Le SAH est représenté en cyan, l'arginine en violet et les résidus du site catalytique de CARM1 en blanc.

De façon intéressante, la guanidinoacétate méthyltransférase (GAMT), catalysant le transfert du groupement méthyle du SAM sur l'azote N_E d'un guanidinoacétate pour former la créatine, possède un mécanisme d'ancrage du substrat dans son site actif similaire à celui des PRMT. En effet, les structures de GAMT montrent que le groupement guanidinium du substrat est stabilisé par le glutamate E45 d'un côté, et l'aspartate D134 de l'autre (Figure 63) [243]. Un mécanisme réactionnel basé sur les données structurales de la GAMT fut proposé par la suite [244, 245]. Alors que le groupement guanidinium est maintenu par le glutamate E45, l'aspartate D134 capte le proton de l'azote N_E de la guanidinoacétate permettant à cet atome de récupérer le groupement méthyle du soufre positivement chargé appartenant au SAM. Les simulations thermodynamiques soutiennent un mécanisme concerté, où le transfert du proton aurait lieu simultanément au transfert du groupement méthyle (Figure 65), plutôt qu'un mécanisme progressif, où il y aurait d'abord transfert du proton, et seulement ensuite transfert du groupement méthyle (Figure 64) [244, 245].

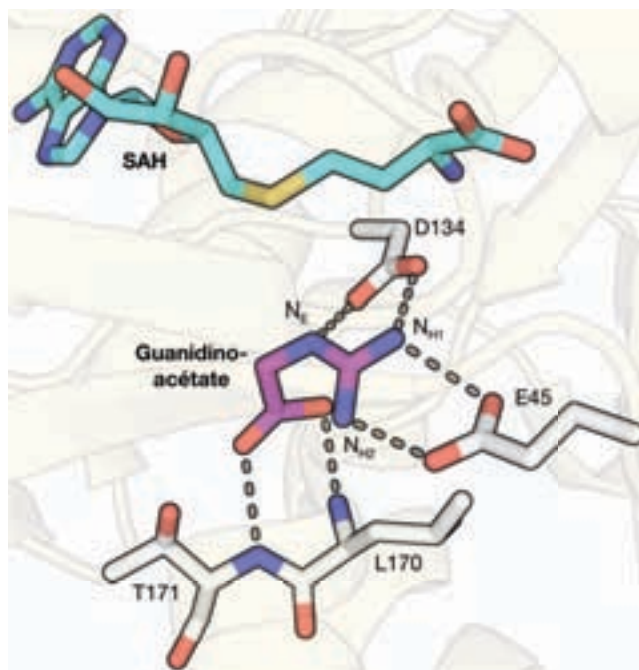


Figure 63 - Stabilisation du groupement guanidinium du guanidinoacétate par 2 résidus acides du site actif de la GAMT

Le SAM est représenté en cyan, le guanidinoacétate en violet et les résidus du site catalytique de la protéine GAMT en blanc. Figure issue de la structure 1XCJ (PDB) [243].

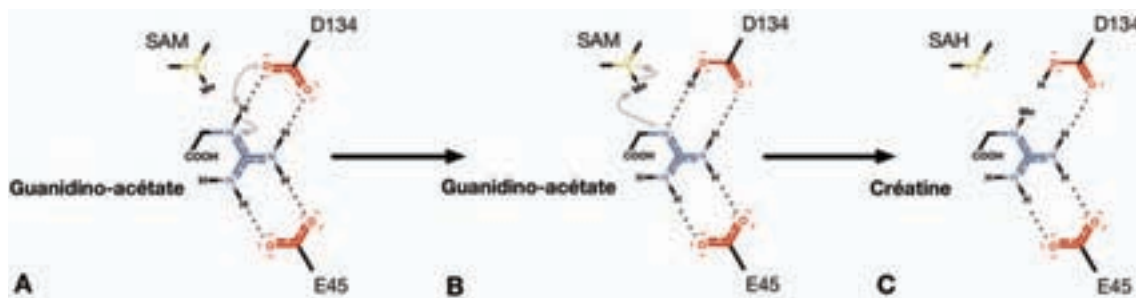


Figure 64 - Modèle mécanistique progressif pour la réaction de méthylation par la GAMT

(A) Ancre du groupement guanidinium du guanidinoacétate par le glutamate E45 et déprotonation par l'aspartate D134.

(B) Attaque nucléophile de l'azote déprotoné sur le groupement méthyle du SAM.

(C) Production de créatine et de SAH.

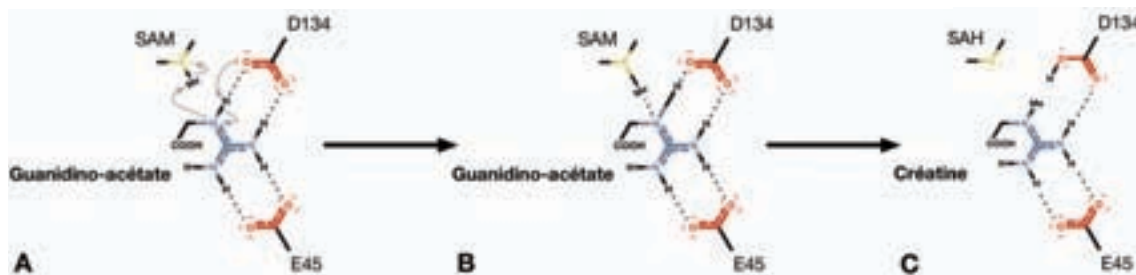


Figure 65 - Modèle mécanistique concerté pour la réaction de méthylation par la GAMT

(A) Ancre du groupement guanidinium du guanidinoacétate par le glutamate E45, et transfert simultané du proton vers l'aspartate D134 et du groupement méthyle depuis le SAM vers le guanidinoacétate.

(B) Intermédiaire réactionnel. La liaison soufre-méthyle du SAM s'allonge proportionnellement à la liaison azote-hydrogène du guanidinoacétate.

(C) Production de créatine et de SAH.

Le même genre de modèle mécanistique peut être imaginé pour CARM1, où le glutamate E267 permettrait d'ancrer l'arginine substrat dans le site actif, tandis que le glutamate E258 servirait de « pompe à proton » (Figure 66A). Ainsi, l'azote du groupement guanidinium de l'arginine substrat pourrait arracher le groupement méthyle du cofacteur SAM, tout en cédant son proton au glutamate E258 (Figure 66B), afin de former une arginine monométhylée (Figure 66C). Une fois la réaction de monométhylation réalisée, l'arginine substrat peut être transférée vers le 2^e site catalytique du dimère, afin que la 2^e réaction de méthylation puisse avoir lieu. La deuxième étape de méthylation se déroulerait de façon identique à la première, avec le glutamate E267 qui ancre l'arginine substrat monométhylée dans le site actif, et le glutamate E258 qui fait office de pompe à proton (Figure 66D). Ainsi, l'azote du groupement guanidinium monométhylé pourrait arracher le groupement méthyle du cofacteur SAM, tout en cédant son 2^e proton au glutamate E258 (Figure 66E), afin de former une arginine diméthylée asymétrique (Figure 66F). La position de la méthionine M269 impose des contraintes stériques obligeant l'arginine monométhylée à se placer de façon à ce que son groupement méthyle soit dirigé vers l'histidine H415. C'est ce qui assure une diméthylation asymétrique. Une fois l'arginine diméthylée, le substrat est finalement libéré du dimère.

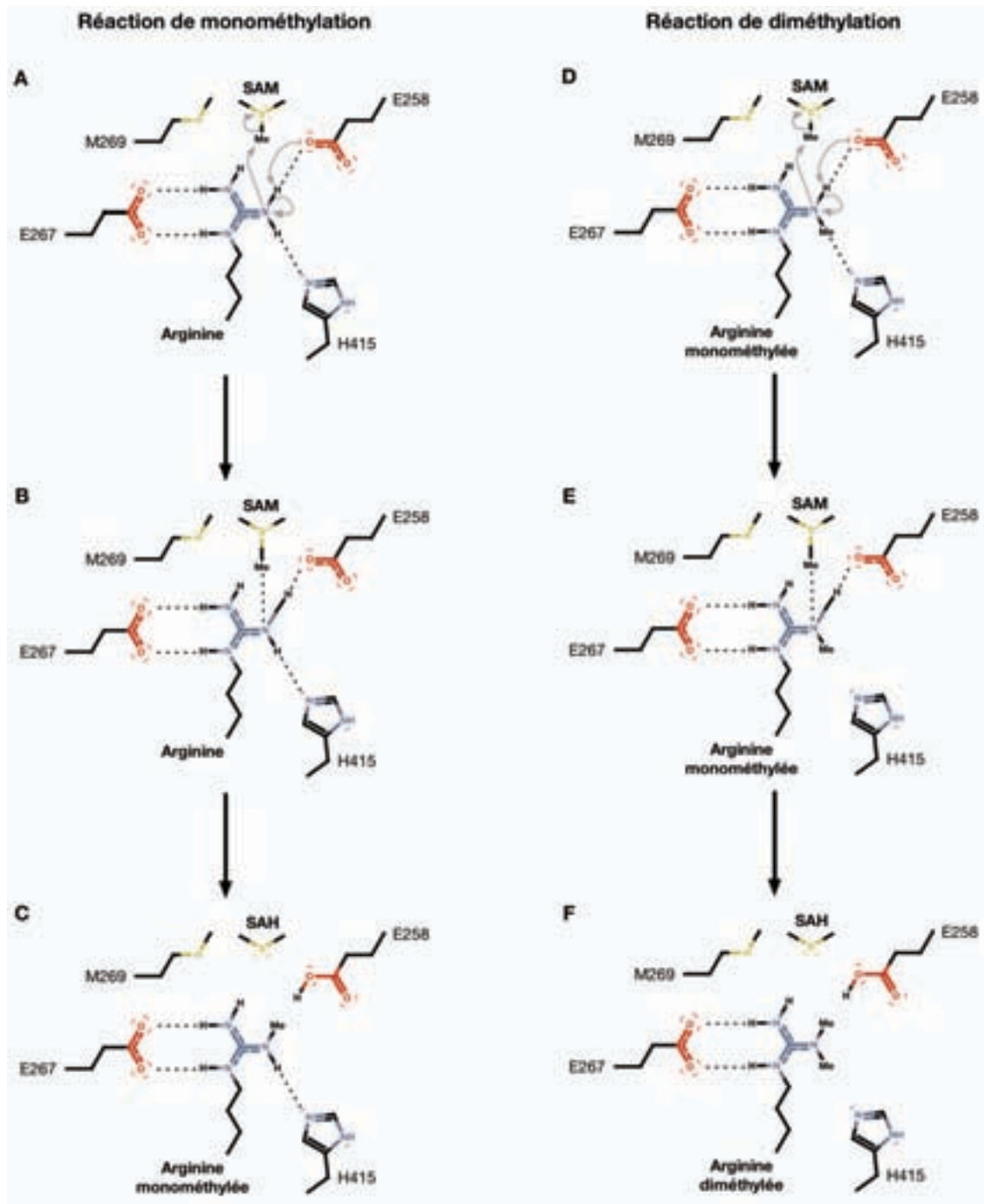


Figure 66 - Modèle mécanistique pour la réaction de méthylation par CARM1

La réaction de monométhylation (étapes A, B et C) a lieu dans un monomère, tandis que la réaction de diméthylation (étapes D, E et F) a lieu dans l'autre monomère.

(A) Ancrage du groupement guanidinium de l'arginine substrat par le résidu E267 et déprotonation par le résidu E258.

(B) Attaque nucléophile de l'azote déprotoné sur le groupement méthyle du SAM.

(C) Production d'arginine monométhylée et de SAH.

(D) Ancrage du groupement guanidinium de l'arginine substrat monométhylée par le résidu E267 et déprotonation par le résidu E258.

(E) Attaque nucléophile de l'azote déprotoné sur le groupement méthyle du SAM.

(F) Production d'arginine diméthylée et de SAH.

Ouverture aux autres PRMT

CHAPITRE VI - OUVERTURE AUX AUTRES PRMT

Afin d'appliquer la stratégie développée pour CARM1 à d'autres PRMT, notre équipe a démarré l'étude de deux autres membres de la famille : PRMT5 qui est une PRMT de type II, et PRMT6 qui est une PRMT de type I [53]. Au début du projet, les structures de ces protéines étaient encore inconnues. Les travaux réalisés sur ces deux PRMT ont permis la détermination à moyenne résolution (3,3 Å et 4,3 Å) de la structure de PRMT5 seule et en complexe avec un de ses partenaires (MEP50), ainsi que la détermination à très haute résolution (de 1,34 Å à 2,19 Å) de la structure de PRMT6.

A. PRMT5

Contrairement à CARM1, PRMT5 est une PRMT de type II, et catalyse la formation d'arginine diméthylée symétrique. La résolution de sa structure pourrait donc permettre de mettre en évidence ce qui différencie les PRMT de type I des PRMT de type II. Dans son contexte biologique, PRMT5 fait partie d'un complexe protéique appelé méthylosome, dans lequel PRMT5 est associée à la protéine MEP50, ainsi qu'à un autre partenaire variable gouvernant sa spécificité de substrat [110, 112, 115]. Nous avons donc poussé les études structurales dans ce sens, afin de caractériser l'interaction entre PRMT5 et ses partenaires.

Il a été montré que chez les plantes PRMT5 participe à la floraison et est nécessaire au passage de la phase végétative à la phase reproductive des végétaux. En plus de la protéine PRMT5 humaine, nous nous sommes donc également intéressés à la protéine PRMT5 chez *Arabidopsis thaliana*. Contrairement à la protéine PRMT5 humaine dont l'activité est faible en absence de MEP50 [156], il a été montré que la protéine PRMT5 d'*A. thaliana* est totalement active seule [246]. La résolution de la structure de la protéine PRMT5 d'*A. thaliana* pourrait donc permettre d'expliquer la différence de fonctionnement entre ces deux homologues.

1. CARACTÉRISATION STRUCTURALE DE LA PROTÉINE PRMT5 D'ARABIDOPSIS THALIANA

a. Matériel et méthodes

❖ Clonage, expression et purification

La protéine PRMT5 d'*A. thaliana* (AtPRMT5) a été produite dans des cellules de la souche BL21(DE3) d'*E. coli* sous forme de fusion avec une étiquette poly-histidine et un site de coupure TEV à son extrémité amino-terminale. L'expression de la protéine a été induite 18 heures à 18°C avec 1 ng.ml⁻¹ d'IPTG dans du milieu LB. Les cellules ont ensuite été récoltées par centrifugation à 4000 g et re-suspendues dans du tampon de lyse contenant

50 mM TrisHCl pH8,0, 300 mM NaCl, 5% Glycérol, 0,01% NP40. Après sonication et centrifugation à 30000 g pendant 45 minutes, le surnageant a été incubé 2 heures à 4°C avec 3 ml de résine NiNTA superflow (Qiagen®), puis chargé sur une colonne Econo (Bio-Rad®). Après lavage avec 10 ml de tampon de lyse, les billes ont été re-suspendues dans 2 ml de ce même tampon et incubées pendant 16 heures à température ambiante avec 10000 unités de TEV. Après élution de la protéine coupée avec du tampon de lyse, les fractions contenant la protéine ont été identifiées par mesure de l'absorbance à 280 nm et rassemblées, afin d'être chargée sur une colonne échangeuse d'anions HiTrap Q-HP 5 ml (GE Healthcare®) préalablement équilibrée avec du tampon A (20 mM TrisHCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5% Glycérol, 2 mM TCEP). Une fois la protéine éluée par gradient de sels, les fractions contenant AtPRMT5 ont été rassemblées et concentrées afin d'être injectées sur une colonne HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare®) équilibrée auparavant avec du tampon contenant 20 mM TrisHCl pH 8,0, 100 mM NaCl et 2 mM TCEP. Enfin, les fractions contenant la protéine ont été rassemblées et concentrées sur Amicon Ultra avec une limite d'exclusion de 50 kDa (Amicon Ultra 50) (Millipore®) jusqu'à une concentration de 4,5 mg.ml⁻¹.

❖ *Cristallisation*

Le criblage des conditions de co-cristallisation avec 1 mM SFG (Sigma-Aldrich®) a été réalisé par diffusion de vapeur en goutte assise. Les gouttes ont été préparées en mélangeant des volumes équivalents (200 nl + 200 nl) des solutions protéiques et de cristallisation grâce à un robot Mosquito (TTP Labtech). Les premiers essais de cristallisation ont été réalisés en utilisant des matrices commerciales de 96 solutions d'agents précipitants (Classics, Index, JCSG, The Pegs et Wizard). Des pistes ont rapidement été obtenues dans différents PEG. Les boîtes de cristallisation ont été placées dans une enceinte de stockage Rock Imager (Formulatrix) tempérée à 20°C, permettant une observation périodique des gouttes de cristallisation. Les hits initiaux ont été affinés par diffusion de vapeur en gouttes suspendues (1 µl + 1 µl) en faisant varier la nature des PEG, les sels et les tampons. Des cristaux de taille intéressante ont été obtenus dans des gouttes dont la solution de cristallisation contenait 100 mM MES pH 6,5, 200 mM Na-citrate, 10-14% PEG20000 et 5% Glycérol.

❖ *Collecte des données de diffraction aux rayons X et résolution de la structure*

En préparation à la collecte de données, les cristaux ont été congelés dans l'azote liquide. Malgré des soucis dus à la valeur élevée d'un des paramètres de maille, un jeu de données a pu être collecté à 3,3 Å au synchrotron SLS (Villigen, Suisse) à partir d'un cristal orienté de manière à ce que la rotation au cours de la collecte se fasse autour du grand axe. Les données de diffraction collectées ont été traitées avec le programme HKL2000 [221]. Le cristal appartient au groupe d'espace P3₁21 (a = 107,9 Å, b = 107,9 Å, c = 287,0 Å), avec 2 molécules d'AtPRMT5 dans l'unité asymétrique. Peu après l'obtention du jeu de données, la

structure de PRMT5 de *Caenorhabditis elegans* (CePRMT5) a été publiée par une autre équipe [155]. La structure d'AtPRMT5 a donc été résolue par remplacement moléculaire à partir de cette structure (PDB : 3UA3). Les différents cycles de construction du modèle et d'affinement ont été réalisés grâce aux logiciels COOT [247] et PHENIX [224]. Les statistiques de cette structure sont décrites en annexes.

b. Structure de la protéine PRMT5 d'*Arabidopsis thaliana* à moyenne résolution

En plus du domaine catalytique classique des PRMT, la structure d'AtPRMT5 comporte un domaine amino-terminal additionnel adoptant un repliement de type « TIM-barrel » (Figure 67A). Le dimère observé pour AtPRMT5 dans l'unité asymétrique est stabilisé par l'interaction entre le TIM-barrel d'un monomère et le repliement de type « Rossmann fold » de l'autre monomère (Figure 67B). L'organisation dimérique de PRMT5 est donc différente de celle précédemment observée pour les autres PRMT, puisqu'elle n'implique pas le bras de dimérisation. Dans la structure de *C. elegans* publiée par Sun et collaborateurs [155], la boucle du bras de dimérisation est beaucoup plus longue, les deux bras viennent donc interagir entre eux, obturant la cavité centrale du dimère (Figure 68A). Des interactions supplémentaires peuvent également être observées entre le bras de dimérisation d'un monomère et le TIM-barrel de l'autre monomère (Figure 68B).

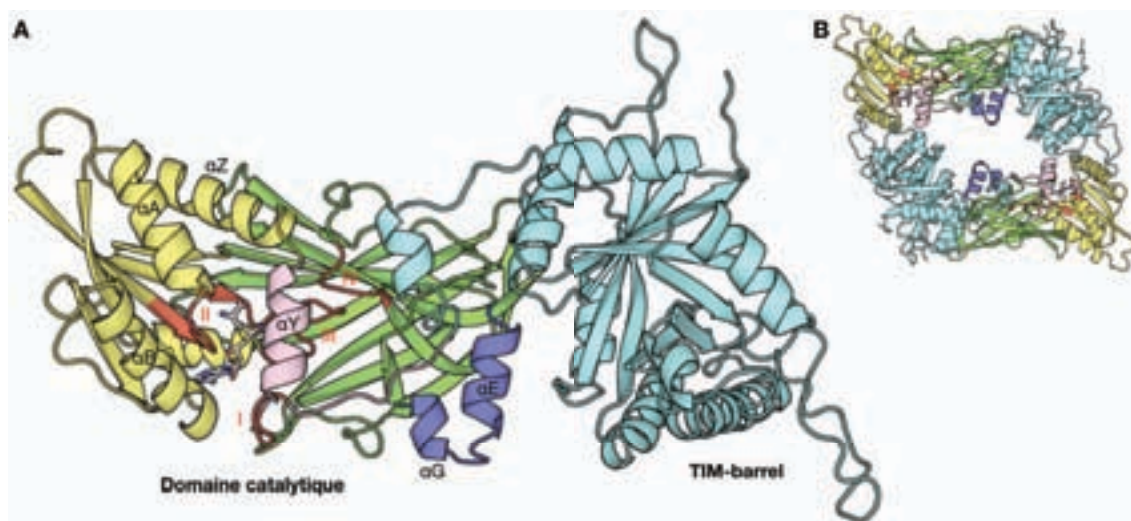


Figure 67 - Structure de la protéine PRMT5 d'*Arabidopsis thaliana* (3,3 Å)

Figures issues de la structure AtPRMT5 résolue à 3,3 Å avec un R_{free} de 23,9% (statistiques présentées en annexes). Les motifs I, II, III et IV caractéristiques des PRMT sont représentés en rouge, les hélices amino-terminales en rose, le Rossmann fold en jaune, le tonneau β en vert et le bras de dimérisation en bleu. Le domaine amino-terminal est représenté en cyan et la SFG en blanc.

(A) Organisation générale du monomère.

(B) Organisation générale du dimère, retrouvé dans l'unité asymétrique.

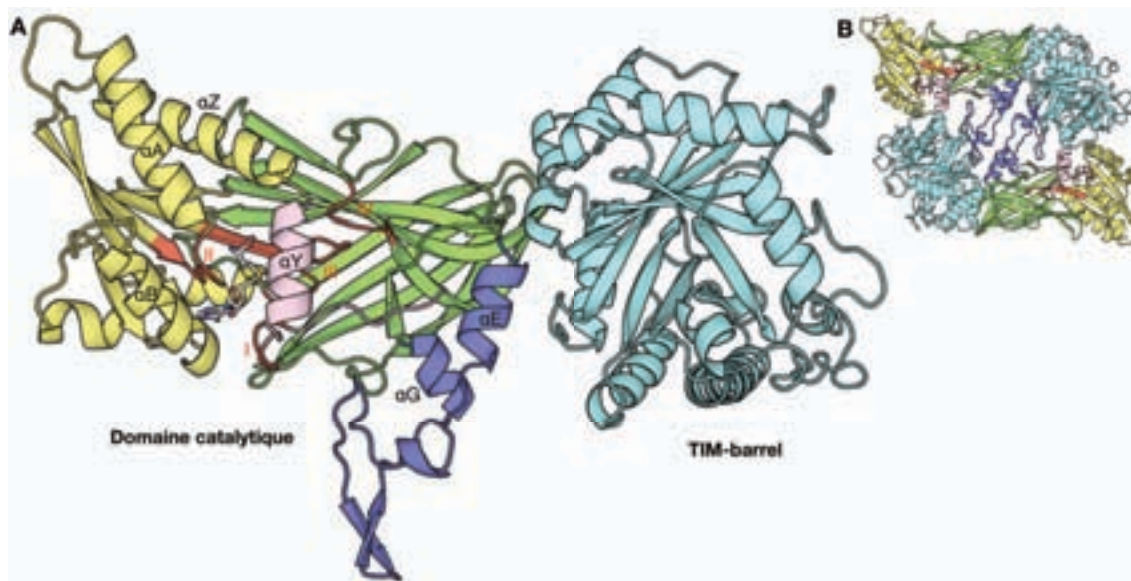


Figure 68 - Structure de la protéine PRMT5 de *Caenorhabditis elegans* [155]

Figures issues de la structure 3UA3 (PDB). Les motifs I, II, III et IV caractéristiques des PRMT sont représentés en rouge, les hélices amino-terminales en rose, le Rossmann fold en jaune, le tonneau β en vert et le bras de dimérisation en bleu. Le domaine amino-terminal est représenté en cyan et la SAH en blanc.

(A) Organisation générale du monomère.

(B) Organisation générale du dimère, retrouvé dans l'unité asymétrique.

Alors que l'organisation sous forme de dimère peut être observée dans l'unité asymétrique, il est possible de reconstituer un tétramère par symétrie, consistant en l'empilement de 2 dimères. La formation du tétramère implique de nombreuses interactions polaires et hydrophobes entre les TIM-barrel et les domaines catalytiques des monomères adjacents le long des axes a et b. Peu d'interactions participent à l'empilement des dimères le long de l'axe c, ce qui explique les problèmes de collecte auxquels nous avons dû faire face : les faibles interactions entre les molécules le long du grand axe rendent les cristaux fragiles à ce niveau.

Malgré un domaine amino-terminal supplémentaire et une organisation en dimère différente, le repliement global et le positionnement relatif du Rossmann fold et du tonneau β formant le domaine catalytique d'AtPRMT5 sont similaires à ceux des PRMT de type I dont la structure a déjà été résolue. L'hélice αY et la boucle qui la précède sont positionnée de manière à emprisonner le cofacteur (ou ici la SFG) : la partie adénosine est stabilisée par des interactions avec l'acide aspartique D426, tandis que les groupements hydroxyle de la partie ribose forment des liaisons hydrogènes avec l'acide glutamique E398 et la tyrosine Y330. De son côté, la partie méthionine est stabilisée par son groupement carboxylate grâce à la tyrosine Y340 et à la lysine K339 (Figure 69). Alors que les acides glutamiques responsables de la stabilisation de l'arginine substrat (E442 et E451) sont également retrouvés chez les PRMT de type I, certains résidus spécifiques aux PRMT de type II peuvent être observés (F333, K339, S446, S583, respectivement substitués par M, R, Y et H chez les PRMT de type I). Dans leurs

travaux sur CePRMT5, Sun et collaborateurs ont montré que la mutation de la phénylalanine F379 (équivalente de F333 chez AtPRMT5) en méthionine (retrouvée chez les PRMT de type I) permet à l'enzyme de catalyser à la fois la formation d'arginine diméthylée symétrique et asymétrique [155]. Ces résidus spécifiques aux PRMT de type II sont donc probablement responsables de la spécificité de réaction de diméthylation. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre ce qui différencie précisément les PRMT de type I des PRMT de type II.

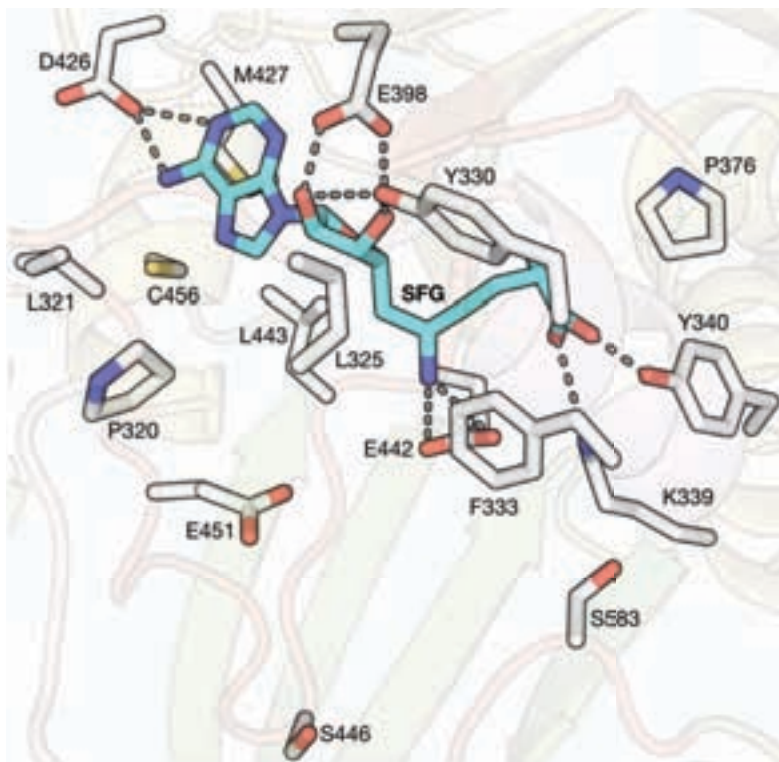


Figure 69 - Site catalytique de la protéine PRMT5 d'Arabidopsis thaliana occupé par de la SFG
 Figure issue de la structure AtPRMT5 résolue à 3,3 Å avec un R_{free} de 23,9% (statistiques présentées en annexes). Les résidus d'AtPRMT5 formant le site actif sont représentés en blanc, tandis que la SFG est représentée en cyan.

2. CARACTÉRISATION STRUCTURALE DU COMPLEXE PRMT5/MEP50 HUMAIN

a. Matériel et méthodes

❖ Clonage, expression et purification

La protéine PRMT5 humaine (hPRMT5) a été co-exprimée avec son partenaire MEP50 (hMEP50) en cellules d'insecte Sf21 grâce au système baculovirus sous forme de fusion avec la GST et un site de coupure TEV à son extrémité amino-terminale. Les cellules ont été récoltées 48 heures après infection par centrifugation à 350 g et re-suspendues dans du tampon de lyse contenant 50 mM TrisHCl pH 8,5, 300 mM NaCl, 5% Glycérol, 10 mM DTT et 0,01% NP40. Après sonication et centrifugation à 30000 g pendant 30 minutes, le surnageant

a été incubé 2 heures à 4°C avec 2 ml de résine glutathion-sépharose (« Glutathion Sepharose 4B » de GE Healthcare®), puis chargé sur une colonne Econo (Bio-Rad). Après 2 lavages consécutifs avec 10 ml de tampon de lyse, les billes ont été re-suspendues dans 2 ml de ce même tampon et incubées pendant 16 heures à température ambiante avec 4000 unités de TEV. Après élution de la protéine coupée avec du tampon de lyse, les fractions contenant la protéine ont été identifiées par mesure de l'absorbance à 280 nm et rassemblées, afin d'être chargée sur une colonne échangeuse d'anion HiTrap Q-HP 5 ml (GE Healthcare®) préalablement équilibrée avec du tampon A (20 mM TrisHCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5% Glycérol, 10 mM DTT). Une fois la protéine éluée par gradient de sels, les fractions contenant le complexe hPRMT5/hMEP50 ont été rassemblées et concentrées afin d'être injectées sur une colonne GF Superose 6 (GE Healthcare®) équilibrée auparavant avec du tampon contenant 20 mM TrisHCl pH 8,0, 200 mM NaCl 5% Glycérol et 10 mM DTT. Enfin, les fractions contenant la protéine ont été rassemblées et concentrées sur Amicon Ultra 50 (Millipore®) jusqu'à une concentration de 3,25 mg.ml⁻¹.

❖ *Cristallisation*

Le criblage des conditions de co-cristallisation avec 0,5 mM SAH (Sigma-Aldrich®) a été réalisé par diffusion de vapeur en goutte assise. Les gouttes ont été préparées en mélangeant des volumes équivalents (200 nl + 200 nl) des solutions protéiques et de cristallisation grâce à un robot Mosquito (TTP Labtech®). Les boîtes de cristallisation ont été placées dans une enceinte de stockage Rock Imager (Formulatrix®) tempérée à 20°C, permettant une observation périodique des gouttes de cristallisation. Les premiers essais de cristallisation ont été réalisés sur le complexe purifié en utilisant des matrices commerciales de 96 solutions d'agents précipitants (Classics, Index, JCSG), ainsi que des cribles systématiques de concentrations croissantes en différents PEG (PEG 1500, PEG 3350 et PEG 8000), à des pH différents (6, 7, 8 et 9) et à des concentrations croissantes en NaCl. Un grand nombre d'essais a dû être effectué avant que des microcristaux aient pu être obtenus en PEG 3350 à pH 7,0 en présence de 200 mM de NaCl. Les hits initiaux ont été affinés par diffusion de vapeur en gouttes suspendues (1 µl + 1 µl) en variant la température de cristallisation, ainsi qu'en ajoutant divers additifs et en modifiant la concentration en protéine. Des cristaux de taille intéressante ont été obtenus dans des gouttes dont la solution de cristallisation contenait 100 mM BTP pH 7,0, 200 mM NaCl, 13% PEG3350, 5% Glycérol et 20 mM TCEP.

❖ *Collecte des données de diffraction aux rayons X et résolution de la structure*

En préparation à la collecte de données, les cristaux ont été congelés dans l'azote liquide après avoir été trempés dans la solution de cristallisation complétée par 15% PEG400 comme agent cryo-protecteur. Un jeu de données a pu être collecté à 4,3 Å à l'ESRF (Grenoble) sur la ligne de lumière ID29, et les données de diffraction ont été traitées avec le

programme HKL2000 [221]. Le cristal appartient au groupe d'espace H32 ($a = 190,9 \text{ \AA}$, $b = 190,9 \text{ \AA}$, $c = 394,8 \text{ \AA}$), avec une molécule du complexe hPRMT5/hMEP50 dans l'unité asymétrique. La structure du complexe a été résolue par remplacement moléculaire à partir de modèles des domaines amino-terminal et catalytique de la protéine hPRMT5, définis à partir de la structure précédemment résolue de CePRMT5. Des essais de remplacements moléculaires ont également été réalisés avec un modèle de hMEP50, défini à partir d'un domaine WDR (« WD-repeat »), mais ceux-ci ont été peu concluants. Les différents cycles de construction du modèle et d'affinement ont été réalisés grâce aux logiciels COOT [247] et PHENIX [224]. Les statistiques pour les différents jeux sont décrites en annexes. Entre le début des essais de cristallisation et la résolution de la structure du complexe hPRMT5/hMEP50, celle-ci a été publiée à plus haute résolution ($2,06 \text{ \AA}$) par une autre équipe [156]. L'utilisation de la structure publiée comme modèle (PDB : 4GQB) a permis de nettement améliorer les cartes de densité électronique. Notre structure du complexe hPRMT5/hMEP50 montre une organisation identique à celle de la structure publiée par Antonysamy et collaborateurs.

b. Structure du complexe PRMT5/MEP50 humain à moyenne résolution

Comme pour AtPRMT5 et CePRMT5, une organisation en tétramère, impliquant 2 dimères, est retrouvée par symétrie pour le complexe hPRMT5/hMEP50, avec MEP50 disposé au niveau de la surface extérieure du tétramère (Figure 70A et 70B). En plus des interactions entre le TIM-barrel d'un monomère et le domaine catalytique d'un autre monomère (Figure 70C), le dimère de hPRMT5 est stabilisé par des ponts salins entre l'arginine R488 d'un monomère, et l'aspartate D491 de l'autre monomère (Figure 70D). Ainsi, les boucles d'un dimère s'empilent avec les boucles équivalentes de l'autre dimère adjacent, au cœur du tétramère (Figure 70C).

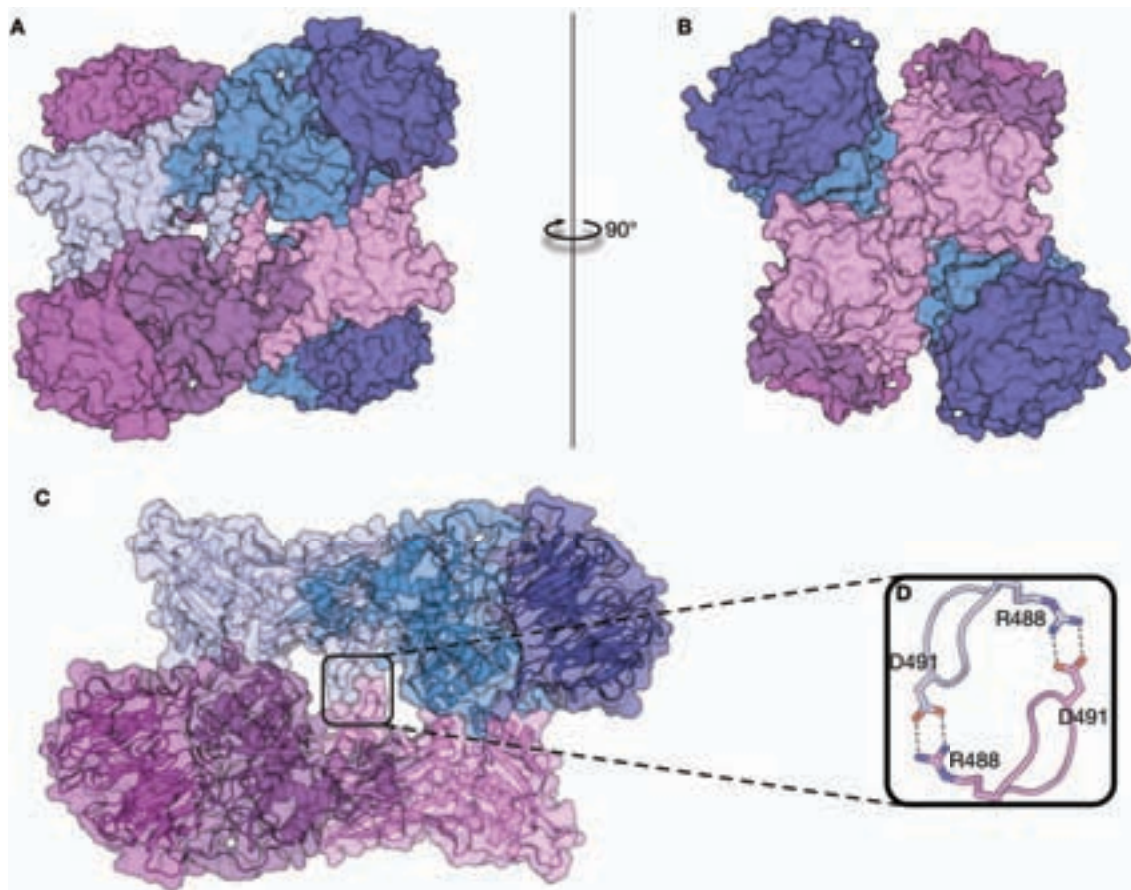


Figure 70 - Oligomérisation du complexe PRMT5/MEP50 humain

Figures issues de la structure hPRMT5/hMEP50 résolue à 4,3 Å avec un R_{free} de 39,5% (statistiques en annexes).

(A) Tétramère reconstitué par symétrie, vu de face. Cette orientation met en évidence la formation du tétramère à partir de 2 dimères empilés. Pour chaque dimère, un monomère est représenté en bleu (domaine catalytique en bleu clair, domaine amino-terminal en bleu marine, MEP50 en bleu foncé) et l'autre en violet (domaine catalytique en rose, domaine amino-terminal en pourpre, MEP50 en violet).

(B) Tétramère reconstitué par symétrie, vu de côté. Cette orientation met en évidence les contacts entre monomères équivalents des deux dimères, retournés dos-à-dos.

(C) Dimère reconstitué par symétrie.

(D) Ponts salins entre l'arginine R488 de la boucle du bras de dimérisation d'un monomère et l'aspartate D491 de l'autre.

La protéine MEP50 adopte la structure classique des domaines WDR en forme de « β -propeller », composée de 6 feuillets à 4 brins β antiparallèles et d'un dernier feuillet comportant seulement 3 brins. MEP50 interagit avec les boucles situées entre le brin β_2 et l'hélice α_2 , ainsi qu'entre le brin β_5 et l'hélice α_5 du TIM-barrel par la face où se situent les boucles liants les brins extérieurs des feuillets aux brins intérieurs des feuillets suivants (Figure 71). Dans la structure d'AtPRMT5, où MEP50 est absent, la boucle β_5 - α_5 du TIM-barrel n'est pas définie et la boucle β_2 - α_2 interagit elle avec l'autre monomère.

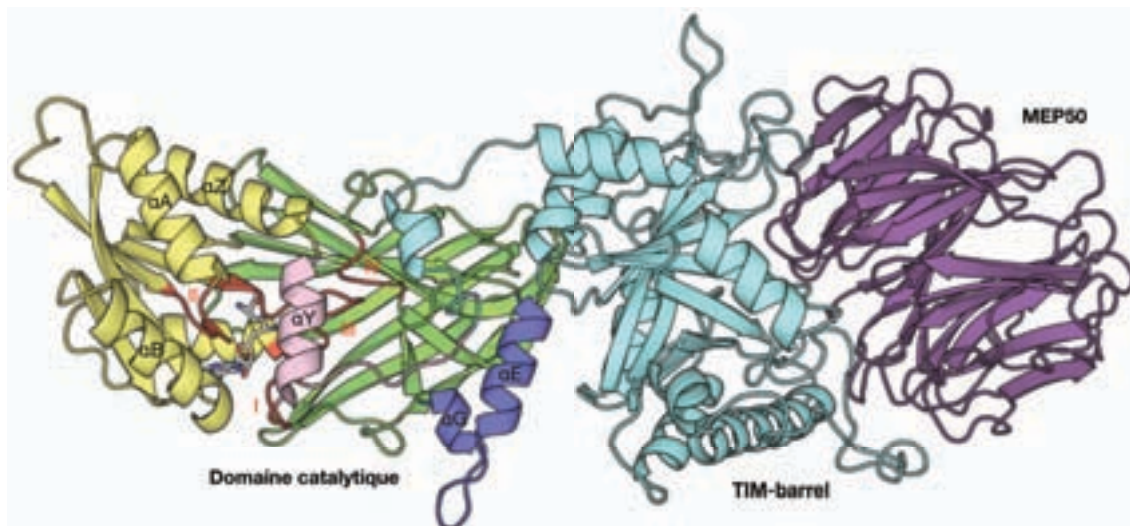


Figure 71 - Structure du complexe PRMT5/MEP50 humain (4,3 Å)

Figure issue de la structure hPRMT5/hMEP50 résolue à 4,3 Å avec un R_{free} de 39,5% (statistiques en annexes). Les motifs I, II, III et IV caractéristiques des PRMT sont représentés en rouge, les hélices amino-terminales en rose, le Rossmann fold en jaune, le tonneau β en vert et le bras de dimérisation en bleu. Le domaine amino-terminal est représenté en cyan, MEP50 en violet et la SFG en blanc.

Au niveau du site catalytique, le cofacteur est ancré de la même manière que pour AtPRMT5 : la partie adénine est stabilisée par l'aspartate D419, la partie ribose par le glutamate E392 et la tyrosine Y324, et enfin la partie méthionine par la tyrosine Y334 (Figure 72B). La structure publiée par Antonysamy et collaborateurs [156] présente également un peptide dérivé de l'extrémité amino-terminale de l'histone H4 lié au complexe PRMT5/MEP50 (Figure 72A). Cette structure met en évidence un sillon à la surface du tonneau β du site catalytique de hPRMT5 où vient se loger le peptide. La majeure partie des interactions entre le peptide substrat et hPRMT5 se fait par des liaisons hydrogène entre les groupements carbonyle et les groupements amine des chaînes principales. La chaîne latérale de l'arginine substrat pénètre elle dans un tunnel étroit donnant accès au site actif, dont l'entrée est formée par la leucine L312, la phénylalanine F327 et le tryptophane W579 (Figure 72B). Des liaisons hydrogène entre les acides glutamiques E435 et E444 et le groupement guanidinium de l'arginine permettent de positionner cette dernière correctement pour que le transfert du groupement méthyle depuis le cofacteur puisse avoir lieu (Figure 72B). La présence de la phénylalanine F327 restreint l'espace autour de l'atome d'azote devant être déprotoné par le glutamate E435, empêchant la présence à cet endroit d'un azote méthylé, et favorisant ainsi la formation d'arginine diméthylée symétrique. Ces données confirment le modèle mécanistique de la méthylation présenté précédemment pour CARM1.

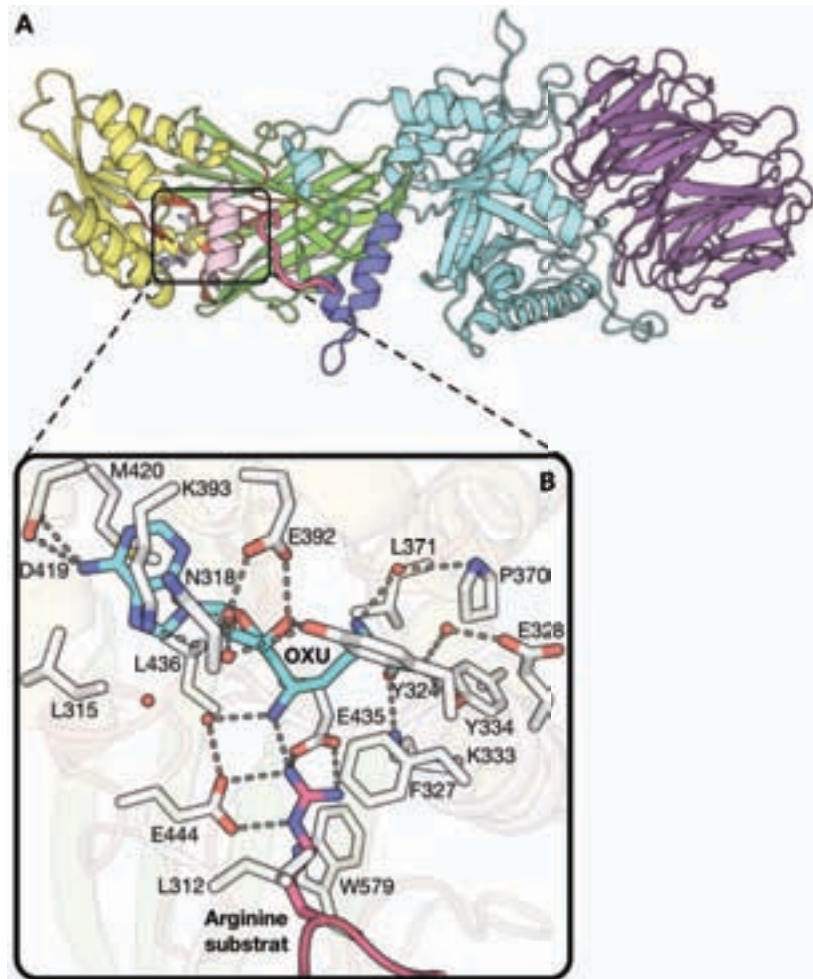


Figure 72 - Reconnaissance d'un peptide substrat issu de l'histone H4 par le complexe PRMT5/MEP50 humain [156]

Figures issues de la structure 4GQB (PDB) [156].

(A) Structure du complexe hPRMT5/hMEP50/peptide. Les motifs I, II, III et IV caractéristiques des PRMT sont représentés en rouge, les hélices amino-terminales en rose, le Rossmann fold en jaune, le tonneau β en vert et le bras de dimérisation en bleu. Le domaine amino-terminal est représenté en cyan, MEP50 en violet, le peptide dérivé de l'extrémité amino-terminale de l'histone H4 en magenta et le composé A9145C (analogue de la SFG) en blanc.

(B) Les résidus de hPRMT5 formant le site actif sont représentés en blanc, tandis que le composé A9145C est représenté en cyan et l'arginine substrat en magenta.

La structure de PRMT5 en complexe avec MEP50 ne permet pas d'expliquer pourquoi PRMT5 est plus active en présence de son partenaire [156]. En effet, l'organisation structurale de PRMT5 est la même dans les structures d'AtPRMT5 et CePRMT5 seuls et de hPRMT5 en complexe avec hMEP50. Il est possible que MEP50 ne soit pas impliqué dans la structuration du domaine catalytique, mais plutôt au niveau du recrutement du substrat ou de partenaires additionnels.

B. ÉTUDE STRUCTURALE DE LA PROTÉINE PRMT6

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

a. Clonage, expression et purification

Le gène de la protéine PRMT6 de souris (mPRMT6) a été cloné dans un vecteur pNEA-vHis [248] et utilisé pour transformer des cellules de la souche BL21(DE3)-pRARE2 d'*E. coli*. L'expression de la protéine a été induite pendant 4 heures à 37°C avec 0,1 mM d'IPTG dans du milieu LB. Les cellules ont été récoltées par centrifugation et re-suspendues dans du tampon de lyse contenant 50 mM TrisHCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoéthanol et 20 mM Imidazole pH 8,0, complété avec 1 mM PMSF. Après sonication, le lysat a été centrifugé à 40000 g pendant 25 minutes à 4°C. Pour chaque litre de culture, le surnageant a été incubé 1 heure à 4°C avec 0,5 ml de résine NiNTA superflow (Qiagen®), puis chargé sur une colonne Econo (Bio-Rad®). Après lavage avec 10 volumes colonne de tampon de lyse, la protéine liée a été éluée avec 5 volumes colonne de tampon de lyse complété par 500 mM Imidazole pH 8,0. Les fractions contenant la protéine recombinante ont été identifiées par la méthode de Bradford, rassemblées et complétées avec de la TEV. L'échantillon a été dialysé avec une membrane de limite d'exclusion 12-14 kDa (Spectrum®) dans 1 litre de tampon contenant 50 mM TrisHCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 7 mM β -mercaptoéthanol et 1 mM EDTA pendant 16 heures à 4°C. L'échantillon dialysé a ensuite été chargé sur une colonne HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare®) préalablement équilibrée avec du tampon contenant 20 mM TrisHCl pH 8,0, 150 mM NaCl et 1 mM DTT. Pour finir, la protéine a été concentrée sur Amicon Ultra avec une limite d'exclusion de 10 kDa (Amicon Ultra 10) (Millipore®) jusqu'à une concentration de 5 mg.ml⁻¹. Les échantillons ont soit été utilisés directement, soit congelés dans l'azote liquide par aliquotes de 25 μ l et stockés à -80°C.

b. Cristallisation

Le criblage des conditions de cristallisation a été réalisé par diffusion de vapeur en goutte assise. Les gouttes ont été préparées en mélangeant des volumes équivalents (200 nl + 200 nl) des solutions protéiques et de cristallisation grâce à un robot Mosquito (TTP Labtech®). Les boîtes de cristallisation ont été placées dans une enceinte de stockage Rock Imager (Formulatrix®) tempérée à 20°C, permettant une observation périodique des gouttes de cristallisation. Les hits initiaux ont été affinés par diffusion de vapeur en gouttes suspendues (1 μ l + 1 μ l). De gros cristaux (0,4 x 0,2 x 0,2 mm³) ont été obtenus au bout de 3 semaines dans des gouttes dont la solution de cristallisation contenait soit 100 mM TrisHCl pH 7,5 soit 100 mM HEPES-NaOH pH 8,0 comme tampon, 200 mM MgCl₂ ou CaCl₂ comme sel, et 20% PEG1500, PEG3350 ou PEG6000 comme agent précipitant. Des essais de co-cristallisation

ont été réalisés avec du SAH et de la SFG (Sigma Aldrich) pour des concentrations finales en ligand de 1 mM. Pour obtenir la structure de la forme réduite de PRMT6, la concentration en DTT de la solution protéique a été augmentée jusqu'à 5 mM.

c. Collecte des données de diffraction aux rayons X et résolution de la structure

En préparation à la collecte de données, les cristaux ont été trempés dans la solution de cristallisation complétée par 15% PEG400 comme agent cryo-protecteur et congelés dans l'azote liquide. Les jeux de données ont été collectés soit sur la ligne Proxima1 à SOLEIL (Gif-sur-Yvette) équipée d'un détecteur PILATUS 6M (Dectris), soit sur la ligne ID23-2 à l'ESRF (Grenoble) équipée d'un détecteur MAR CCD-225 (Mar Research), et traités avec le programme autoPROC [249]. Les cristaux appartiennent au groupe d'espace $I4_1$, avec une molécule de PRMT6 par unité asymétrique lorsqu'un pont disulfure est présent, ou au groupe d'espace $P2_12_12$ avec 2 molécules de PRMT6 dans l'unité asymétrique pour la forme réduite. Les structures ont été résolues par remplacement moléculaire à partir de la structure de CARM1 (PDB : 3B3F) privée de son bras de dimérisation. Les différents cycles de construction du modèle et d'affinement ont été réalisés grâce aux logiciels COOT [247] et PHENIX [224]. Les statistiques pour les différents jeux sont décrites en annexes.

2. STRUCTURE DE LA PROTÉINE PRMT6 DE SOURIS À TRÈS HAUTE RÉOLUTION

Différentes structures de la protéine PRMT6 de souris entière ont pu être résolues, seule ou en complexe avec du SAH ou de la SFG (statistiques en annexes). La séquence de la protéine de souris est très proche de la séquence de la protéine humaine, avec 91,5% d'identité. Dans toutes les structures résolues, les résidus 1 à 41 ne sont pas visibles (Figures 73A et 74A), car l'extrémité amino-terminale se dégrade spontanément. Ceci a été confirmé par l'analyse d'une digestion partielle en spectrométrie de masse, qui a mis en évidence un fragment stable correspondant aux résidus 42 à 378 de PRMT6. Les structures de PRMT6 révèlent une organisation du domaine catalytique similaire à celle des autres PRMT : un domaine de type Rossmann-fold à l'extrémité amino-terminale, suivi d'un tonneau β associé à un bras de dimérisation d'une soixantaine de résidu, inséré entre les brins β_6 et β_7 du tonneau β (Figures 73A et 74A).

Dans la majorité des structures, l'association de PRMT6 sous forme de dimère peut être reconstituée par symétrie (Figure 73B). Ce dimère présente un pont disulfure entre la cystéine C53 du domaine de type Rossmann-fold d'un monomère, et la cystéine C232 du bras de dimérisation de l'autre monomère (Figure 73C), empêchant la formation de l'hélice α_X (Figure 73A). Lorsque la concentration en agent réducteur est augmentée, le pont disulfure ne

se forme pas et l'hélice αX vient se replier sur la poche de fixation du cofacteur (Figure 74A). Ceci n'empêche pas pour autant l'association de PRMT6 sous forme de dimère (Figure 74B). Pour la forme réduite de PRMT6, le dimère est par ailleurs directement visible dans l'unité asymétrique.

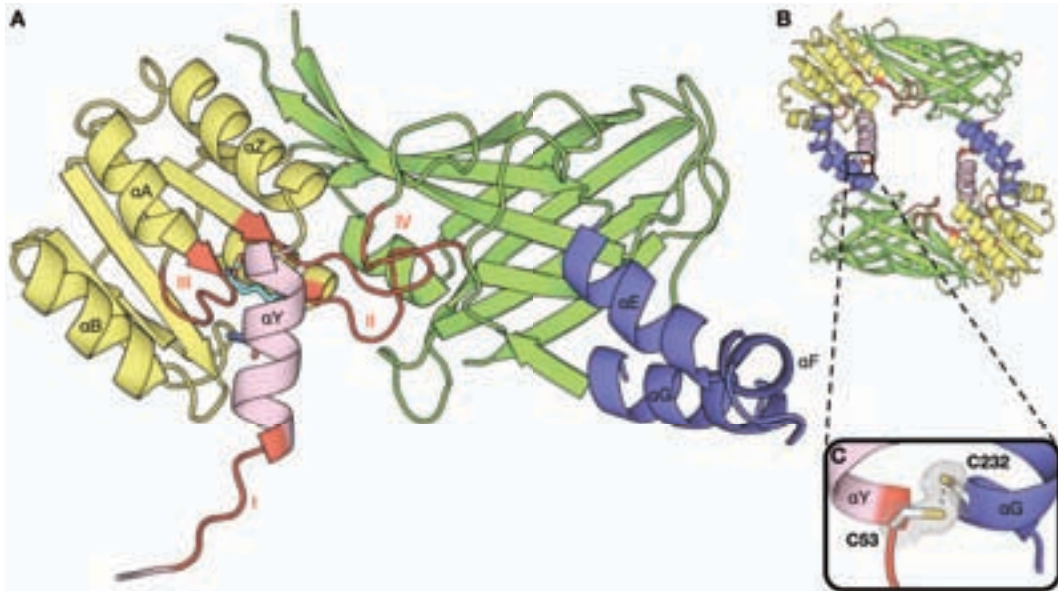


Figure 73 - Structure de la forme non-réduite la protéine PRMT6 de souris 1,6 Å

Figures issues de la structure PRMT6_SFG résolue à 1,6 Å avec un R_{free} de 18,6% (statistiques en annexes). Les motifs I, II, III et IV caractéristiques des PRMT sont représentés en rouge, les hélices amino-terminales en rose, le Rossmann fold en jaune, le tonneau β en vert et le bras de dimérisation en bleu. La SFG est représentée en cyan.

(A) Organisation générale du monomère.

(B) Organisation générale du dimère, reconstitué par symétrie.

(C) Mise en évidence du pont disulfure stabilisant le dimère entre l'hélice αX d'un monomère et l'hélice αG de l'autre. La densité électronique 2Fo-Fc est représentée autour des deux cystéines (C53 et C232) avec un contourage à 1,0 σ .

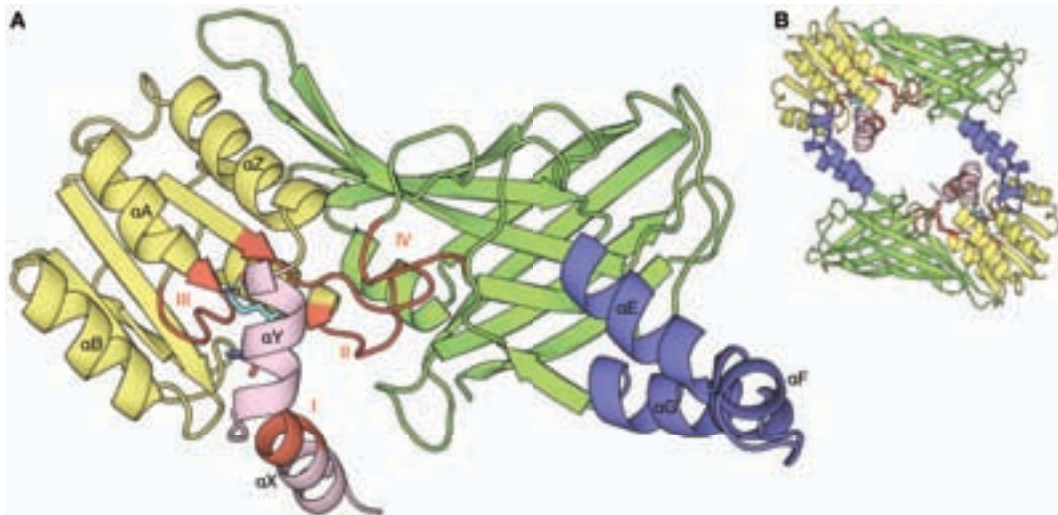


Figure 74 - Structure de la forme réduite la protéine PRMT6 de souris (1,6 Å)

Figures issues de la structure PRMT6_SFG_réduite résolue à 1,6 Å avec un R_{free} de 20,3% (statistiques en annexes). Les motifs I, II, III et IV caractéristiques des PRMT sont représentés en rouge, les hélices amino-terminales en rose, le Rossmann fold en jaune, le tonneau β en vert et le bras de dimérisation en bleu. La SFG est représentée en cyan.

(A) Organisation générale du monomère.

(B) Organisation générale du dimère, retrouvé dans l'unité asymétrique.

En absence de pont disulfure, les tyrosines Y50 et Y54 de l'hélice αX permettent de stabiliser le glutamate E167 et de l'orienter vers la poche de fixation de l'arginine substrat (Figure 75A). Dans le cas des structures où le pont disulfure entre l'hélice αY et le bras de dimérisation est présent, l'hélice αX n'est pas présente et la stabilisation du glutamate E167 par les tyrosines Y50 et Y54 ne peut pas se faire (Figure 75B). L'orientation du glutamate E167 étant essentielle au mécanisme catalytique, ceci montre que la formation du pont disulfure induit une conformation non-physiologique.

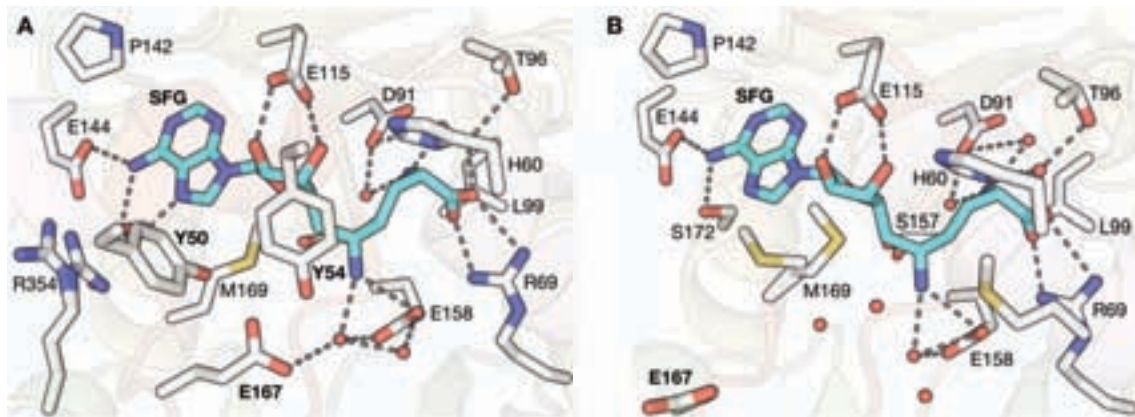


Figure 75 - Importance de l'hélice αX pour la formation de la poche de l'arginine substrat

Les résidus de PRMT6 formant le site actif sont représentés en blanc, tandis que la SFG est représentée en cyan.

(A) Organisation du site catalytique de la forme réduite de PRMT6 en présence de SFG. Figure issue de la structure PRMT6_SFG_réduite résolue à 1,6 Å avec un R_{free} de 20,3% (statistiques en annexes).

(B) Organisation du site catalytique de la forme non-réduite de PRMT6 en présence de SFG. Figure issue de la structure PRMT6_SFG résolue à 1,6 Å avec un R_{free} de 18,6% (statistiques en annexes).

De manière intéressante, en absence de cofacteur (SFG ou SAH), un atome de calcium ou de magnésium (en fonction des conditions de cristallisation) totalement hydraté vient se placer au niveau du glutamate E158 et permet de stabiliser le site catalytique (Figure 76).

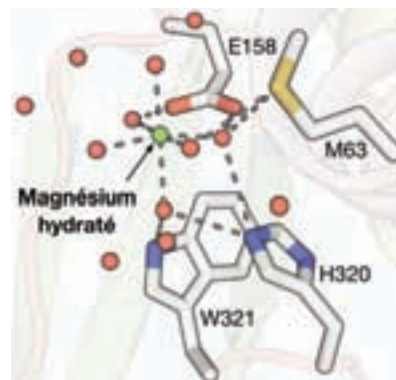


Figure 76 - Stabilisation de mPRMT6 sous sa forme apo par un ion magnésium hydraté

Les résidus de PRMT6 formant le site actif sont représentés en blanc, tandis que l'ion magnésium et les molécules d'eau qui l'entourent sont respectivement représentés en vert et rouge. Figure issue de la structure PRMT6_apo résolue à 1,6 Å avec un R_{free} de 19,5% (statistiques en annexes).

En comparaison aux autres PRMT, le dimère de PRMT6 semble assez « ouvert », avec une cavité centrale large (Figure 77A). Contrairement à PRMT10, dont la largeur de la cavité centrale est due à la longueur de son bras de dimérisation, il semblerait que pour PRMT6 l'ouverture du dimère soit plutôt due à l'orientation de ce bras, qui s'écarte beaucoup plus du cœur catalytique en comparaison aux autres PRMT (Figure 77B).

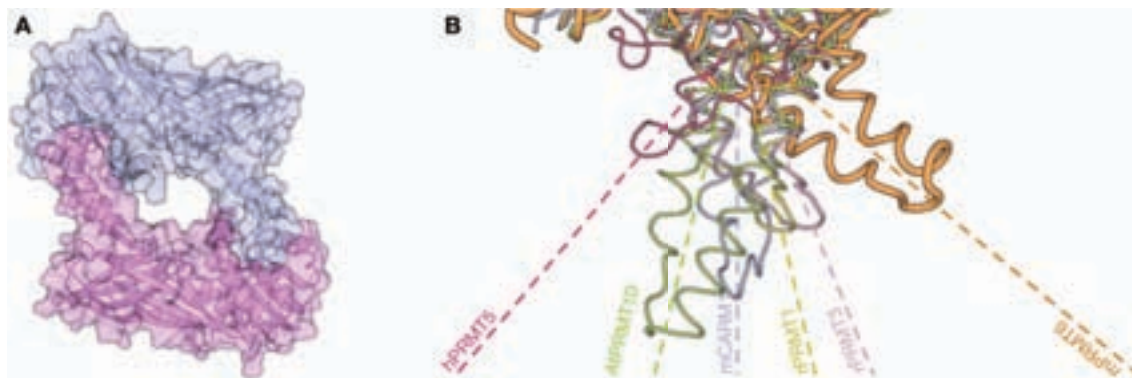


Figure 77 - Cavité dimérique importante de PRMT6 due à l'orientation de son bras de dimérisation

(A) Organisation générale du dimère, retrouvé dans l'unité asymétrique.

(B) La superposition des domaines catalytiques des différentes PRMT dont la structure a été résolue met en évidence une orientation variable du bras de dimérisation d'une PRMT à l'autre. Figure issue des structure 1ORI pour rPRMT1 (en jaune), 1F3L pour rPRMT3 (en rose clair), 3B3F pour mCARM1 (en bleu clair), 4GQB pour hPRMT5 (en rose foncé), PRMT6_SFG_réduite pour PRMT6 (en orange) et 3R0Q pour PRMT10 (en vert clair).

Les travaux qui ont été menés sur PRMT6 ont permis la résolution de la structure de souris à très haute résolution, seule ou en complexe avec différents ligands, comme le SAH et la SFG. Ces données à haute résolution pourront servir de modèle pour le développement rationnel de nouveaux inhibiteurs, visant spécifiquement PRMT6. Étant donné la facilité de cristallisation de la protéine et les données à haute résolution qu'il est possible d'obtenir, le développement de nouveaux ligands pourra également être réalisé par criblage de banques de petits fragments, afin d'explorer d'autres poches de la protéine que celles fixant le cofacteur et l'arginine substrat.

Conclusions et perspectives

CHAPITRE VII - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les PRMT sont impliquées dans divers processus biologiques, comme la transcription, la traduction, la transduction du signal, l'épissage des ARNm ou encore la réparation de l'ADN. La dérégulation de ces mécanismes a été impliquée dans un ensemble de maladies telles que certains cancers, la compréhension à l'échelle atomique du mode d'action des PRMT est importante à la fois au niveau fondamental, mais également à des fins pharmacologiques. Bien que les PRMT soient au cœur de nombreuses études, et que plusieurs structures de PRMT aient été résolues par diffraction aux rayons X, le mode de reconnaissance et de méthylation des substrats a été peu caractérisé au niveau structural. La faible stabilité des complexes impliquant ces enzymes et leurs substrats et le comportement des PRMT sous forme de gros oligomères en solution est probablement à l'origine de ces difficultés.

Mes travaux de thèse ont comporté deux objectifs scientifiques majeurs : (i) révéler à l'échelle atomique les liens de coopérativité liant l'activité de méthylation et les reconnaissances macromoléculaires dans lesquelles la protéine CARM1 est impliquée, (ii) découvrir des modulateurs de CARM1 pouvant donner lieu au développement d'inhibiteurs spécifiques. Dans ce but, mes travaux ont comporté deux aspects : des études structurales par diffraction des rayons X sur des monocristaux et des études biophysiques sur les interactions entre CARM1 et ses substrats (ou analogues de substrats). Afin d'étendre les travaux développés pour CARM1 à d'autres PRMT, nous avons également étudié les protéines PRMT5 et PRMT6.

Afin de palier au problème de faible affinité des complexes PRMT/substrat, notre approche a été de concevoir et synthétiser des analogues du SAM et des mimes de l'état de transition, où un substrat est lié de manière covalente à un analogue du cofacteur SAM, en combinant chimie, modélisation moléculaire et cristallographie aux rayons X. Trois classes de ligands ont ainsi été synthétisés et testés : (i) des analogues du SAM, (ii) des mimes SAM-arginine, (iii) des mimes SAM-peptide. Au cours de ces études, un total de 56 composé a été conçu et synthétisé, 51 ont été caractérisés fonctionnellement sur CARM1 (et dans certains cas PRMT1), 28 ont été poussés jusqu'à l'étape de co-cristallisation avec CARM1, permettant l'obtention de la structure de 13 d'entre eux (résolutions allant de 2,0 Å à 2,7 Å). Seulement la moitié des composés co-cristallisés ont pu aboutir à une structure car nous avons été confrontés à deux problèmes. Le premier concerne la qualité globalement médiocre des cristaux de CARM1. Pour tous les cristaux produits, les expériences de diffraction nécessitent l'utilisation systématique du rayonnement synchrotron car la limite de diffraction est mauvaise avec la source de rayons X de notre laboratoire. Même avec un rayonnement synchrotron

(ESRF (Grenoble), SOLEIL (Paris)), seuls 5 à 10 % des cristaux permettent la collecte de données utiles à une résolution atomique. Pour un essai donné, il a fallu tester de très nombreux cristaux. Nous avons aussi été confrontés à des problèmes de dégradation des composés.

Les structures de CARM1 en complexe avec des analogues du SAM qui ont pu être résolues nous ont permis de définir quelle était la meilleure « base » pour la conception de mimes SAM-arginine ou SAM-peptide. Les composés développés entrant en compétition avec le cofacteur SAM, leur affinité a été évaluée par mesure de leur capacité d'inhibition envers l'activité de méthylation de CARM1 et de PRMT1. Grâce à ces expériences, nous avons montré que l'ajout de petites modifications chimiques aux analogues du SAM suffisent à favoriser la sélectivité envers CARM1 plutôt que PRMT1. Ces composés ont donc permis de mettre en évidence des propriétés de reconnaissance différentes d'une PRMT à l'autre.

Afin de définir l'environnement du groupement guanidinium de l'arginine substrat dans le site catalytique de CARM1, et ainsi de mieux comprendre la réaction de méthylation, des mimes de l'état de transition SAM-arginine ont été conçus à partir des analogues du SAM décrits précédemment, synthétisés et caractérisés fonctionnellement et structuralement avec CARM1. Les structures qui ont pu être résolues mettent en évidence une stabilisation du groupement guanidinium de la chaîne latérale de l'arginine substrat par les glutamates E258 et E267 du site catalytique de CARM1.

Pour caractériser les interactions entre CARM1 et un substrat au niveau du site de méthylation, une 3^e classe de ligands, les mimes SAM-peptides, a été développée. Des analogues du SAM comportant une extrémité réactive ont été conçus à partir des connaissances que nous avons déjà acquises grâce aux analogues du SAM non-réactifs et des mimes SAM-arginine. Ces analogues du SAM réactifs ont été synthétisés et caractérisés fonctionnellement et structuralement avec CARM1. Deux types d'analogues du SAM réactifs ont été développés : (i) des analogues du SAM électrophiles, capables de réagir avec un arginine naturelle, ou encore une lysine ou une cystéine (qui sont aussi nucléophiles), (ii) des analogues du SAM à fonction azoture, capables de réagir avec un acide aminé modifié portant une fonction alcyne. Les structures qui ont été résolues nous ont permis de définir les candidats les plus compatibles avec l'environnement du site catalytique de CARM1.

Des essais de co-cristallisation avec de petits peptides ou des acides aminés libres ont ensuite été réalisés pour les composés réactifs ayant le meilleur potentiel. Cependant, ces essais n'ont pas été productifs, puisqu'aucune structure de CARM1 en complexe avec un produit de la réaction SAM-peptide n'a pu être résolue, soit parce qu'aucun cristal n'a pu être obtenu pour certains cas, soit parce que la diffraction des cristaux n'était pas de qualité

suffisante (résolution supérieure à 3 Å), ou encore parce que le peptide était absent dans les structures obtenues.

Un ensemble de produits de la réaction entre un analogue du SAM à fonction azoture et un peptide ou acide aminé modifié portant une fonction alcyne ont été synthétisés chimiquement et caractérisés fonctionnellement et structuralement avec CARM1, afin de déterminer leur compatibilité avec l'environnement du site catalytique. La structure de deux de ces produits de la réaction en complexe avec CARM1 a ainsi pu être obtenue (résolutions allant de 2,3 Å à 2,4 Å). Ces structures montrent que le groupement triazole des mimes SAM-peptide vient se placer au niveau des deux glutamates E258 et E267 de CARM1. Ces composés sont donc compatibles avec l'environnement du site catalytique. Cependant, la ramification ajoutée à la partie SAM des composés n'est pas suffisamment longue pour sortir de la poche de fixation de l'arginine substrat. De nouveaux essais devraient donc être réalisés à partir d'acides aminés modifiés à fonction alcyne avec une chaîne carbonée plus longue, afin de pouvoir atteindre la sortie de la poche.

Des expériences d'anisotropie de fluorescence et de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) ont montré que CARM1 avait moins d'affinité pour un peptide correspondant aux résidus 1 à 34 de l'histone H3 (H31-34 K18ac), plutôt que pour un peptide comprenant les résidus 1 à 41 (H31-41 K18ac). Ceci a permis de mettre en évidence l'implication des résidus 35 à 41 de l'histone H3 dans la reconnaissance par CARM1. Ces résultats révèlent donc l'existence d'interactions à longue distance, impliquant des résidus du substrat éloignés du site de méthylation dans la stabilisation du complexe CARM1/substrat.

Les études fonctionnelles sur CARM1 nous ont permis d'élargir nos connaissances quant aux mécanismes de reconnaissance et de méthylation du substrat. Certains résidus de CARM1 semblent cruciaux pour la reconnaissance du substrat. Par exemple, la mutation de l'asparagine N266 provoque une chute de l'affinité de CARM1 pour le substrat. D'après les modèles construits à partir des structures cristallographiques de CARM1, ce résidu est vraisemblablement impliqué dans la reconnaissance de la lysine K18 acétylée de l'histone H3, dont la modification post-traductionnelle a été montrée comme pré-requise pour que la méthylation de l'arginine R17 puisse avoir lieu. D'autre part, nos études de FCS montrent que la mutation de l'arginine R169, résidu essentiel à la fixation du cofacteur, diminue drastiquement l'affinité de CARM1 pour le substrat, indiquant que le cofacteur SAM doit se fixer préalablement à celui-ci. Ces expériences corroborent les études réalisées précédemment au sein de notre équipe, révélant que la fixation du cofacteur SAM est nécessaire à la formation de la poche de fixation de l'arginine substrat.

Concernant le mécanisme de méthylation, les travaux réalisés pendant la thèse de Pierre Hassenboehler, ont mis en évidence l'implication des glutamates E258 et E267 dans la réaction de méthylation. Les différentes structures obtenues pour les mimes SAM-arginine confirment ceci, puisque les deux résidus participent à la stabilisation du groupement guanidinium de l'arginine substrat. En s'appuyant sur les études publiées sur la guanidinoacétate méthyltransférase (GAMT), un mécanisme de méthylation propre à CARM1 peut être proposé, où le glutamate E267 permet d'ancrer le groupement guanidinium de l'arginine, alors que le glutamate E258 sert lui de « pompe à proton », captant l'atome d'hydrogène de l'azote méthylé. Concernant la 2^e étape de méthylation, qui permet la production d'arginine diméthylée asymétrique, les expériences de FCS ont révélé que CARM1 avait une moins bonne affinité pour un substrat monométhylé que pour un substrat non-méthylé. Ces données favorisent un mécanisme de diméthylation où le substrat ne serait pas libéré après la monométhylation. La 2^e réaction de méthylation nécessitant une nouvelle molécule de SAM ainsi qu'un glutamate E258 déprotoné, et l'unité biologique de CARM1 étant un dimère, ceci suggère que la 2^e réaction de méthylation doit vraisemblablement avoir lieu dans la 2^e sous-unité de CARM1.

En réunissant l'ensemble des connaissances que nous avons acquies sur CARM1, nous avons proposé un nouveau modèle mécanistique de la reconnaissance et de la méthylation du substrat par CARM1. Dans un premier temps, le cofacteur SAM se lierait à CARM1, permettant une structuration supplémentaire de l'enzyme nécessaire à la formation de la poche de fixation de l'arginine substrat. Le substrat peut ensuite être recruté, grâce à des interactions spécifiques telles que la reconnaissance de la lysine K18 acétylée de l'histone H3 par l'asparagine N266. Une fois le substrat fixé, le transfert du premier groupement méthyle depuis le cofacteur SAM sur l'arginine substrat peut avoir lieu dans le site catalytique du premier monomère, catalysé par les glutamates E258 et E267. L'arginine substrat est ensuite « transférée » vers le site catalytique du 2^e monomère pour y être diméthylée. Après le transfert du 2^e groupement méthyle sur l'arginine, le substrat est finalement libéré.

En plus de la protéine CARM1, les structures d'autres PRMT ont été résolues au sein de notre équipe : PRMT5 et PRMT6. Contrairement à CARM1, PRMT5 est une PRMT de type II catalysant la formation d'arginine diméthylée symétrique. De plus, PRMT5 fait partie d'un complexe appelé méthylosome, au sein duquel il est associé à la protéine MEP50, ainsi qu'à un autre partenaire variable gouvernant sa spécificité de substrat. Nos travaux ont permis de déterminer la structure de deux homologues de PRMT5 (chez l'humain et chez *Arabidopsis thaliana*) à moyenne résolution (entre 3,3 Å et 4,3 Å), seule ou en complexe avec son partenaire MEP50. Ces structures montrent un site catalytique plus contraint que celui des PRMT de type I, ce qui explique en partie la capacité de PRMT5 à catalyser la formation d'arginine diméthylée

symétrique et non pas asymétrique. La résolution de la structure du complexe binaire PRMT5/MEP50 est une première étape vers la résolution de complexes impliquant PRMT5 et d'autres protéines régulatrices. Parallèlement aux études par diffraction des rayons X, des études de microscopie ont également été réalisées. L'enveloppe du complexe obtenue (8 Å) concorde avec les données cristallographiques. Des études de complexes comprenant PRMT5 et MEP50 qu'un ou plusieurs autres partenaires sont déjà en cours, à la fois par microscopie électronique et par cristallographie.

Plusieurs structures de la protéine PRMT6 de souris ont pu être obtenues à haute résolution (de 1,34 Å-1.7Å). PRMT6 pouvant être produite dans *E. coli*, et les données de diffraction étant de meilleure qualité que pour CARM1, PRMT6 semblerait être un meilleur modèle d'étude que CARM1. En effet, le développement de ligands nécessite de grandes quantités de protéine, à la fois pour la caractérisation en solution et pour la caractérisation structurale. En comparaison à la production en cellules d'insectes par le système baculovirus, la production dans *E. coli* est moins «demandeuse» mais également moins coûteuse. De plus, le développement de ligands nécessite une bonne qualité de données de diffraction, afin de pouvoir déterminer les interactions participant à la stabilisation du composé, entre autre par le biais des molécules d'eau. La stratégie et les outils qui ont été développés sur CARM1 va donc être étendue à PRMT6. La haute résolution des structures obtenues pour PRMT6 ouvre également la porte au criblage de banques de petits fragments, qui nous permettra d'explorer d'autres poches de la protéine que celles fixant le cofacteur et l'arginine substrat dans le cadre du développement d'inhibiteurs.

Pour pallier à la nature transitoire des interactions entre les PRMT et leurs substrats, la caractérisation structurale des interactions à longue distance pourrait être facilitée par un double-ancrage du peptide étudié. En plus d'être lié de façon covalente à un analogue du SAM, le peptide substrat serait également lié de façon covalente à l'enzyme, permettant de stabiliser doublement le complexe. Des expériences de FCS ainsi que des tests d'activité ont également permis de montrer l'implication dans la reconnaissance et la fixation du substrat de régions de CARM1 éloignées du centre catalytique. Une fois le double-ancrage maîtrisé pour des peptides, cette méthode pourrait être appliquée à des substrats entiers, afin de caractériser les interactions à « très longue » distance, vraisemblablement nécessaires à la spécificité de méthylation des PRMT. Cette technique pourrait permettre de caractériser l'effet des différentes modifications post-traductionnelles auxquelles sont soumis les substrats des PRMT (comme les histones), afin de définir la dynamique de ces modifications au cours des processus cellulaires dans lesquels les PRMT sont impliquées.

En plus de PRMT5 et PRMT6, trois autres PRMT ont récemment commencé à être étudiées au sein de l'équipe : PRMT2 et PRMT8 qui sont des PRMT de type I très proche de

PRMT1, et PRMT7 qui est soit une PRMT de type II ou de type III et dont le domaine catalytique est double. La résolution des structures de ces protéines, qui restent pour l'instant inconnues, permettra d'avoir une image plus complète de la famille des PRMT et de comprendre les origines structurales de la spécificité et de la sélectivité des PRMT.

Annexes

ANNEXES

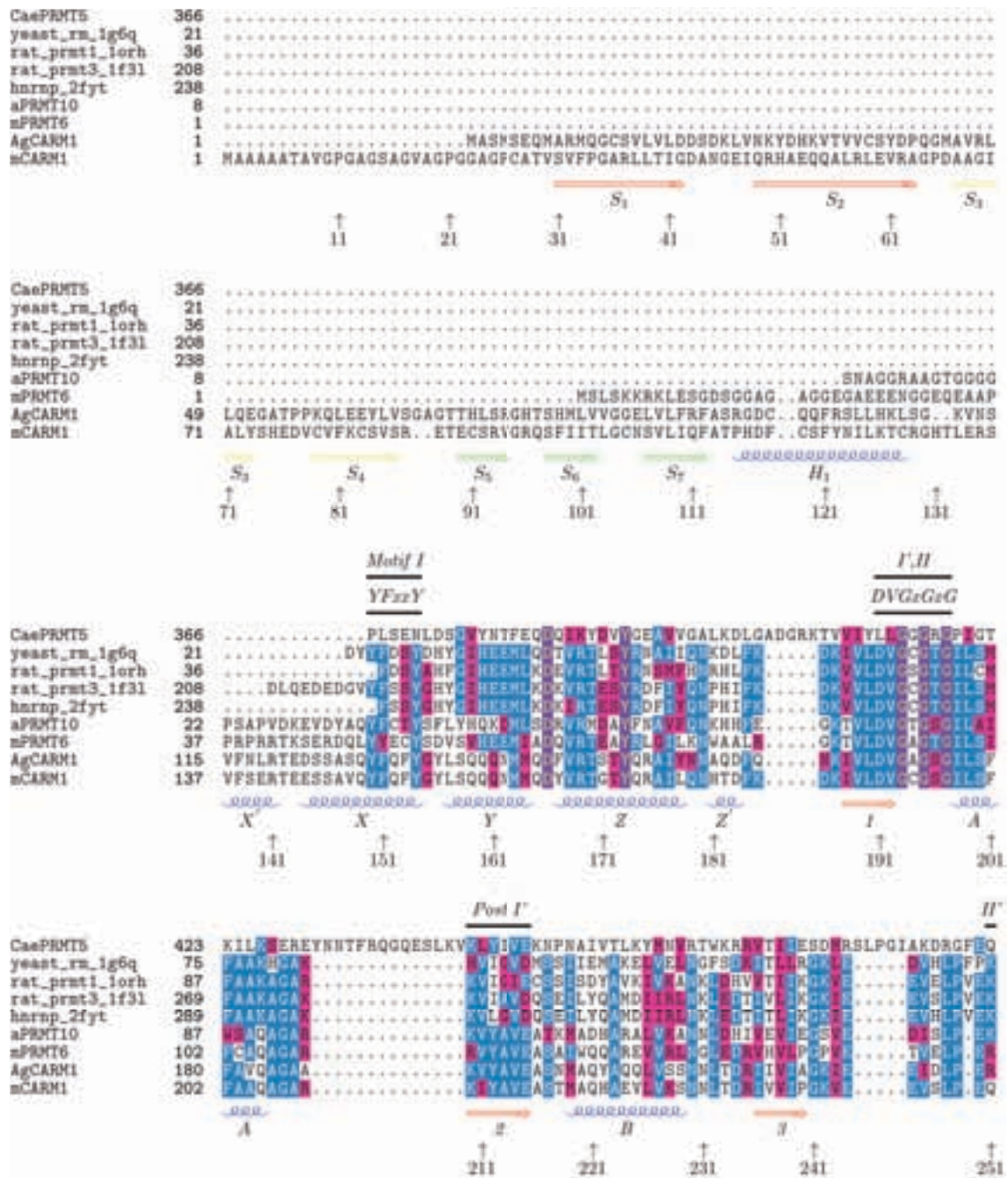


Figure 78 - Alignement structural de plusieurs PRMT

Mis à part AgCARM1, les séquences de l'alignement sont issues des PRMT dont la structure est connue : [CaePRMT5] protéine PRMT5 de *Caenorhabditis elegans* (PDB : 3UA3), [yeast_rm_1g6q] protéine HMT1 de levure (PDB : 1G6Q), [rat_prmt1-1orh] protéine PRMT1 de rat (PDB : 1ORH), [rat_prmt3_1f3l] protéine PRMT3 de rat (PDB : 1F3L), [hnrrnp_2fyt] protéine PRMT3 humaine (PDB : 2FYT), [aPRMT10] protéine PRMT10 d'*Arabidopsis thaliana* (PDB : 3R0Q), [mPRMT6] protéine PRMT6 de souris dont la structure a été résolue dans notre équipe, [AgCARM1] protéine CARM1 d'*Anopheles gambiae* dont la structure n'a pas été résolue, [mCARM1] protéine CARM1 de souris dont la structure a été résolue au sein de notre équipe. En-dessous des alignements la numérotation ainsi que la structure secondaire de mCARM1 sont indiquées.

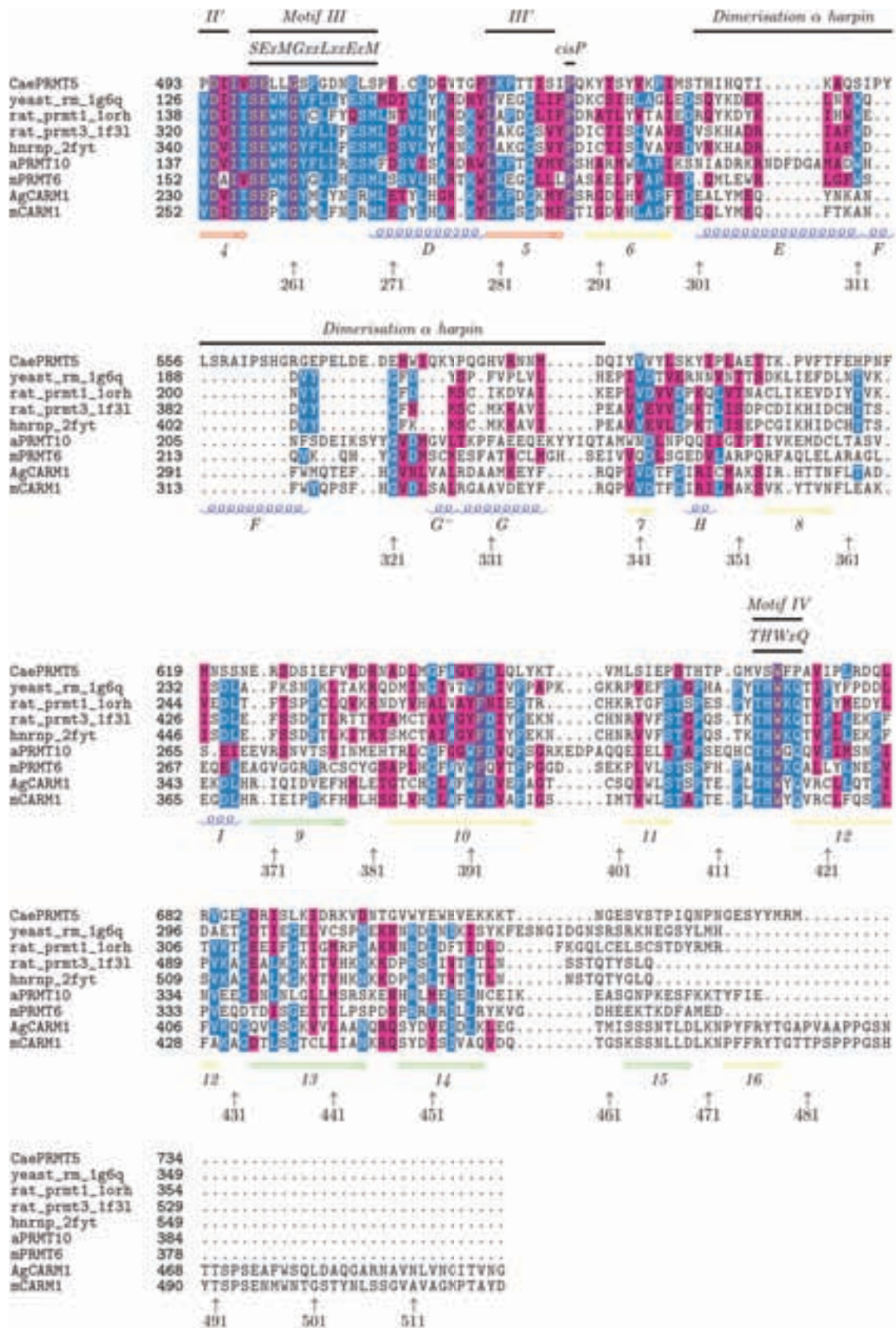


Figure 78 - Alignment structural de plusieurs PRMT (suite)

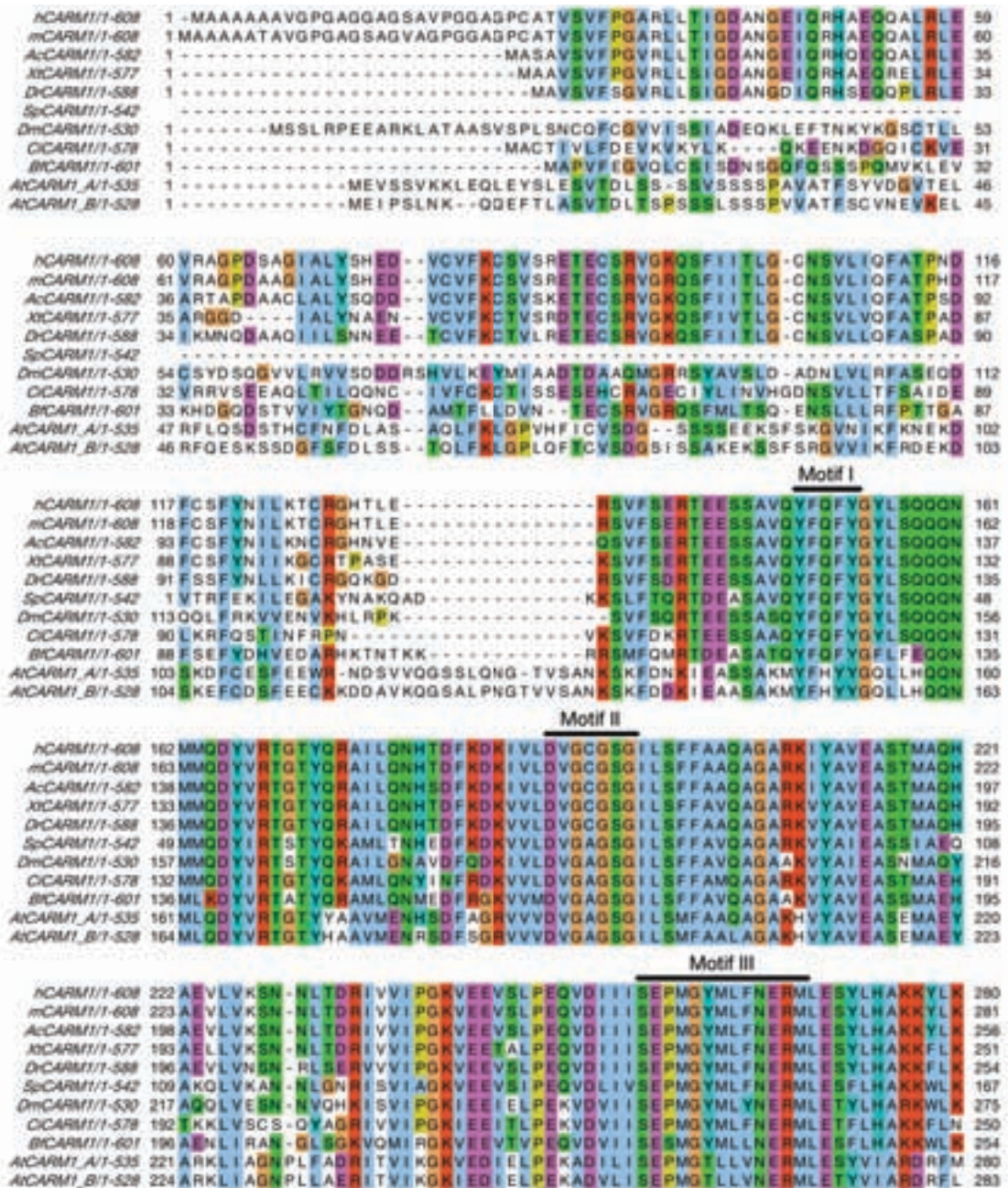


Figure 79 - Alignement de séquences correspondants aux différents homologues de la protéine CARM1
 Chaque séquence est identifiée par le nom de la protéine (CARM1), précédé d'une ou deux lettres codant pour l'organisme à laquelle elle appartient : [h] *Homo sapiens* (humain), [m] *Mus musculus* (souris), [Ac] *Anolis carolinensis* (lézard), [Xt] *Xenopus tropicalis* (grenouille), [Dr] *Danio rerio* (poisson zèbre), [Ci] *Ciona intestinalis* (ascidie), [Bf] *Branchiostoma floridae* (amphioxiforme), [Sp] *Strongylocentrotus purpuratus* (oursin), [Dm] *Drosophila melanogaster* (drosophile), [At] *Arabidopsis thaliana* (arabette des dames). Dans le cas où plusieurs versions de la protéine sont présentes chez un même organisme, celles-ci sont différenciées par une lettre à la fin de leur identifiant (typiquement A et B).

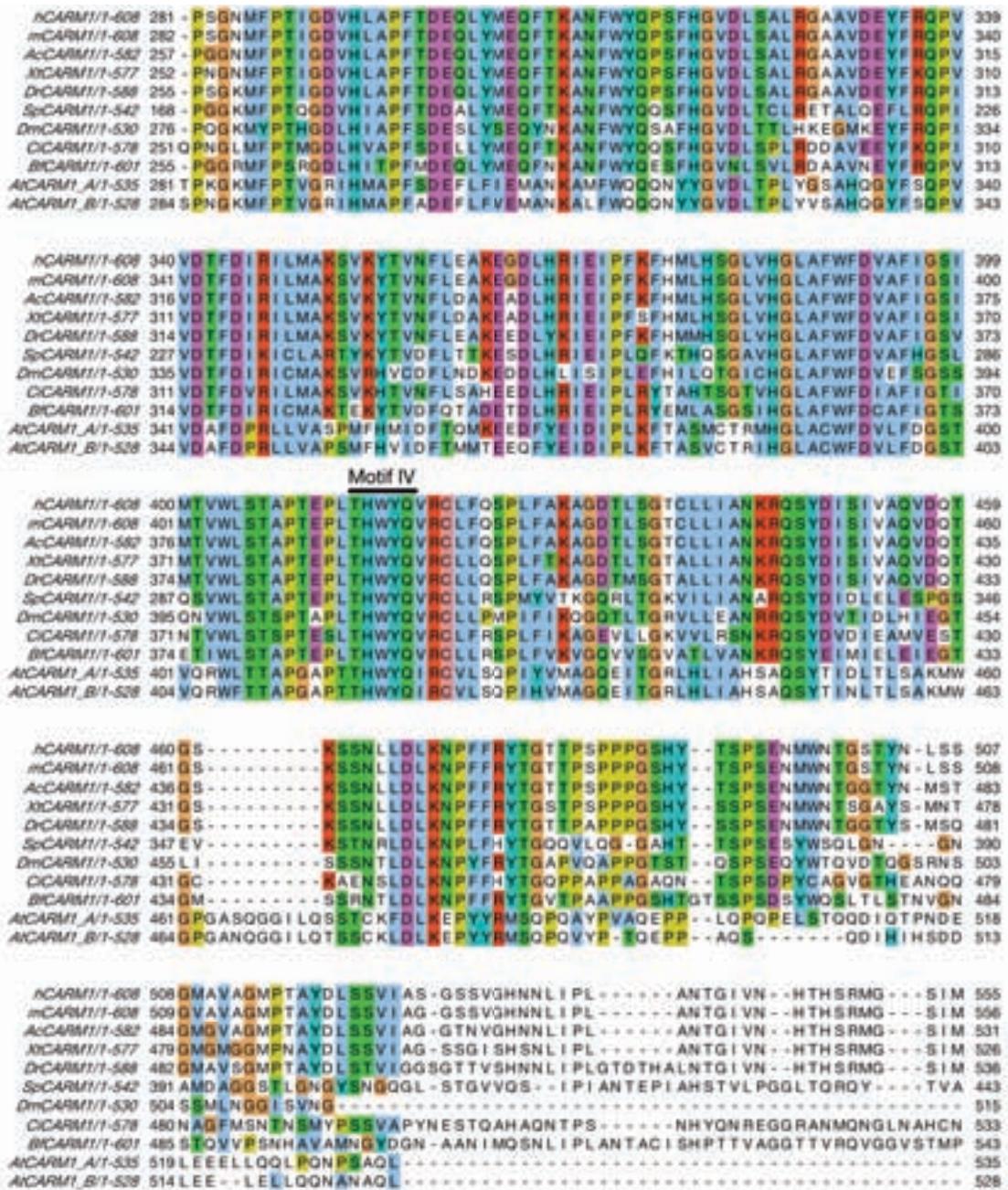


Figure 79 - Alignement de séquences correspondant aux différents homologues de la protéine CARM1 (suite)

```

hCARM1/1-608 556 STG I VQGSSGAQGS --GGGSTSAHYAVNSCF TMGGPA I SMASPMS I PTNTMHYGS ----- 608
mCARM1/1-608 557 STG I VQGSSGAQG ---GGGSSSAHYAVNCF TMGGPA I SMASPMS I PTNTMHYGS ----- 608
AcCARM1/1-582 532 STG I VQGSSSGQS ---GGTSSTHYPVNSCF TMGGPA I SMASPMS I TTNTMHYGS ----- 582
XtCARM1/1-577 527 STG I VQGSAGQA ---ASNTTSHYPVNSCF TMGGPA I SMASPMS I TTNTMHYGS ----- 577
DnCARM1/1-588 537 STG I VQGATT AQQ ---GPSSASLHYPV TNCF TMGGPA I SMASPMA I PSNTMHYGS ----- 588
SpCARM1/1-542 444 I P85VGGAMSSLCFTN5SNQSSGHCSSGQYQQQQQQQQQQGPOGQQTQAQQHQPGRMSH 503
DmCARM1/1-530 516 ----- I G I G M O I T H G L M H P H ----- 530
CiCARM1/1-578 534 TVPLL SGG I PYPG -----TVSN S K S L F HNDCHVQDDHPTPAQNGPNLYY----- 578
BnCARM1/1-601 544 TPCS I GGG I SPAAFTNQTTNANMNY SAGGQYGFQGGMMQMSAQGGAGLPGQQ----- 595
AxCARM1_A/1-535 -----
AxCARM1_B/1-528 -----

hCARM1/1-608 .....
mCARM1/1-608 .....
AcCARM1/1-582 .....
XtCARM1/1-577 .....
DnCARM1/1-588 .....
SpCARM1/1-542 504 SSSGSRQGGHMMVDQMGVYVGGVQGGHRHNYG SQGMN ..... 542
DmCARM1/1-530 .....
CiCARM1/1-578 .....
BnCARM1/1-601 596 -----VDGLNH----- ..... 601
AxCARM1_A/1-535 -----
AxCARM1_B/1-528 -----

```

Figure 79 - Alignement de séquences correspondants aux différents homologues de la protéine CARM1 (suite)

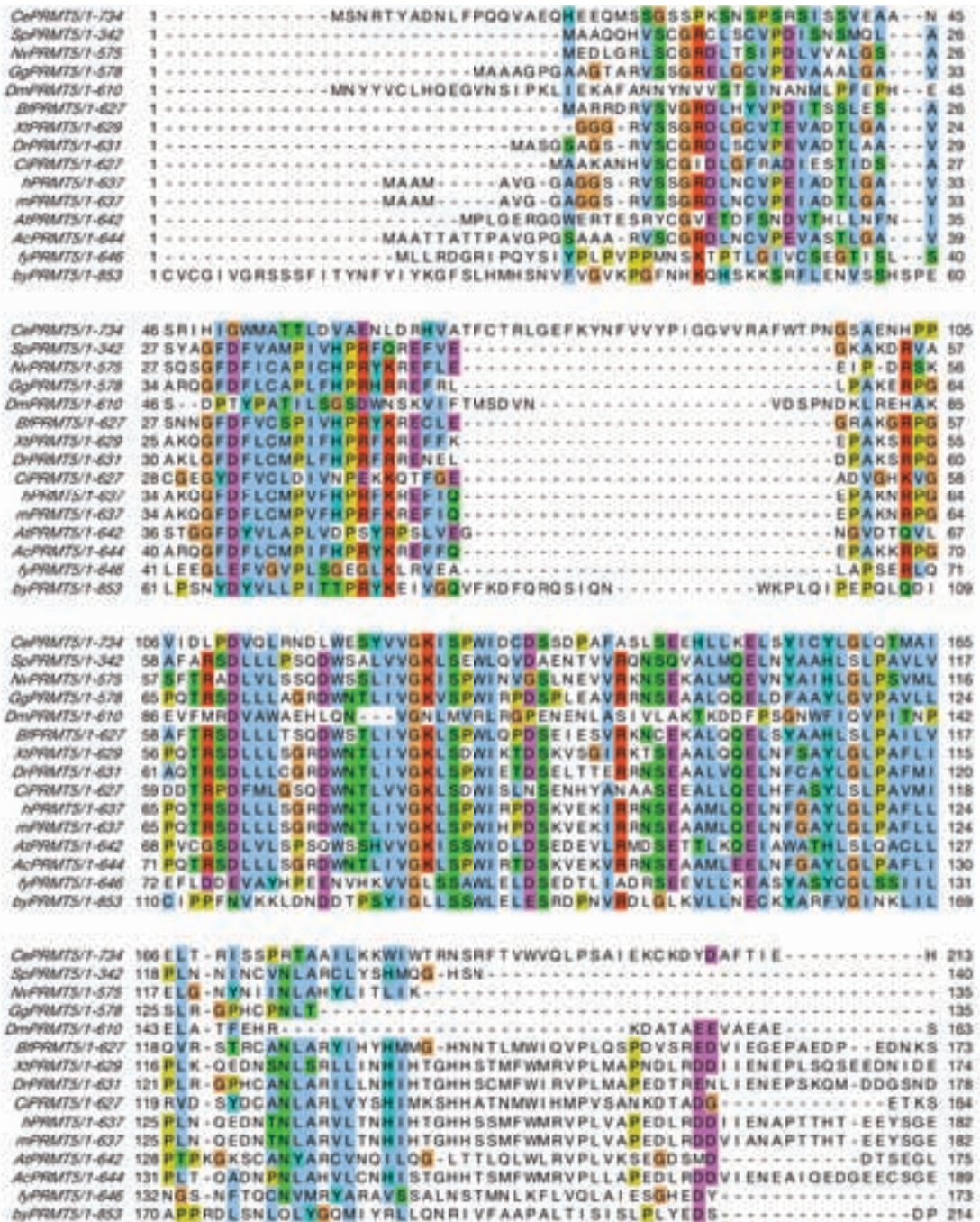


Figure 80 - Alignement de séquences correspondants aux différents homologues de la protéine PRMT5
 Chaque séquence est identifiée par le nom de la protéine (PRMT5), précédé d'une ou deux lettres codant pour l'organisme à laquelle elle appartient : [h] *Homo sapiens* (humain), [m] *Mus musculus* (souris), [Gg] *Gallus gallus* (poulet), [Ac] *Anolis carolinensis* (lézard), [Xt] *Xenopus tropicalis* (grenouille), [Dr] *Danio rerio* (poisson zèbre), [Ci] *Ciona intestinalis* (ascidie), [Bf] *Branchiostoma floridae* (amphioxiforme), [Sp] *Strongylocentrotus purpuratus* (oursin), [Dm] *Drosophila melanogaster* (drosophile), [Ce] *Caenorhabditis elegans* (ascaris), [Nm] *Nematostella vectensis* (anémone de mer), [fy] *Schizosaccharomyces pombe* (levure « à fission »), [by] *Saccharomyces cerevisiae* (levure « bourgeonnante »), [At] *Arabidopsis thaliana* (arabette des dames).

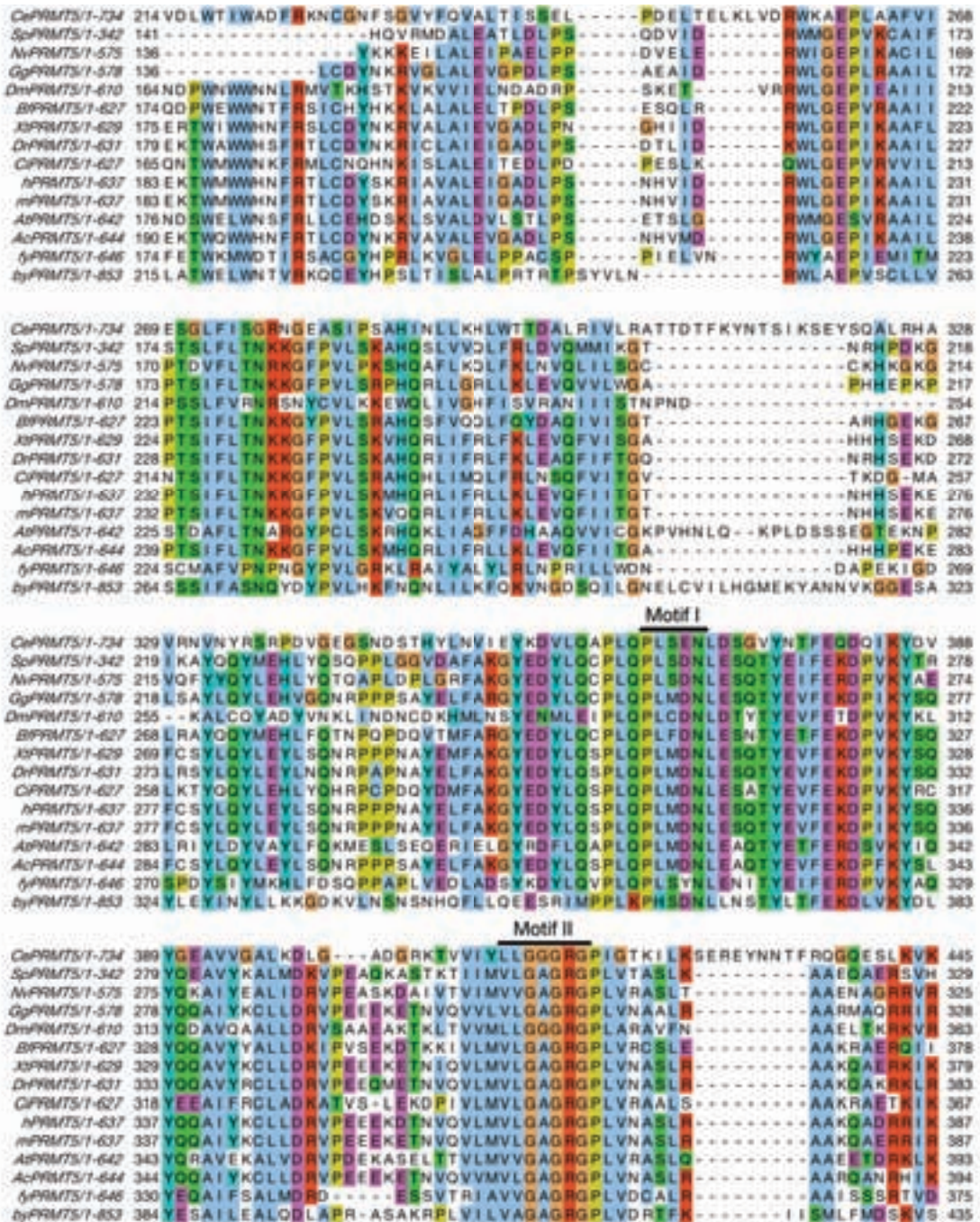


Figure 80 - Alignement de séquences correspondants aux différents homologues de la protéine PRMT5 (suite)

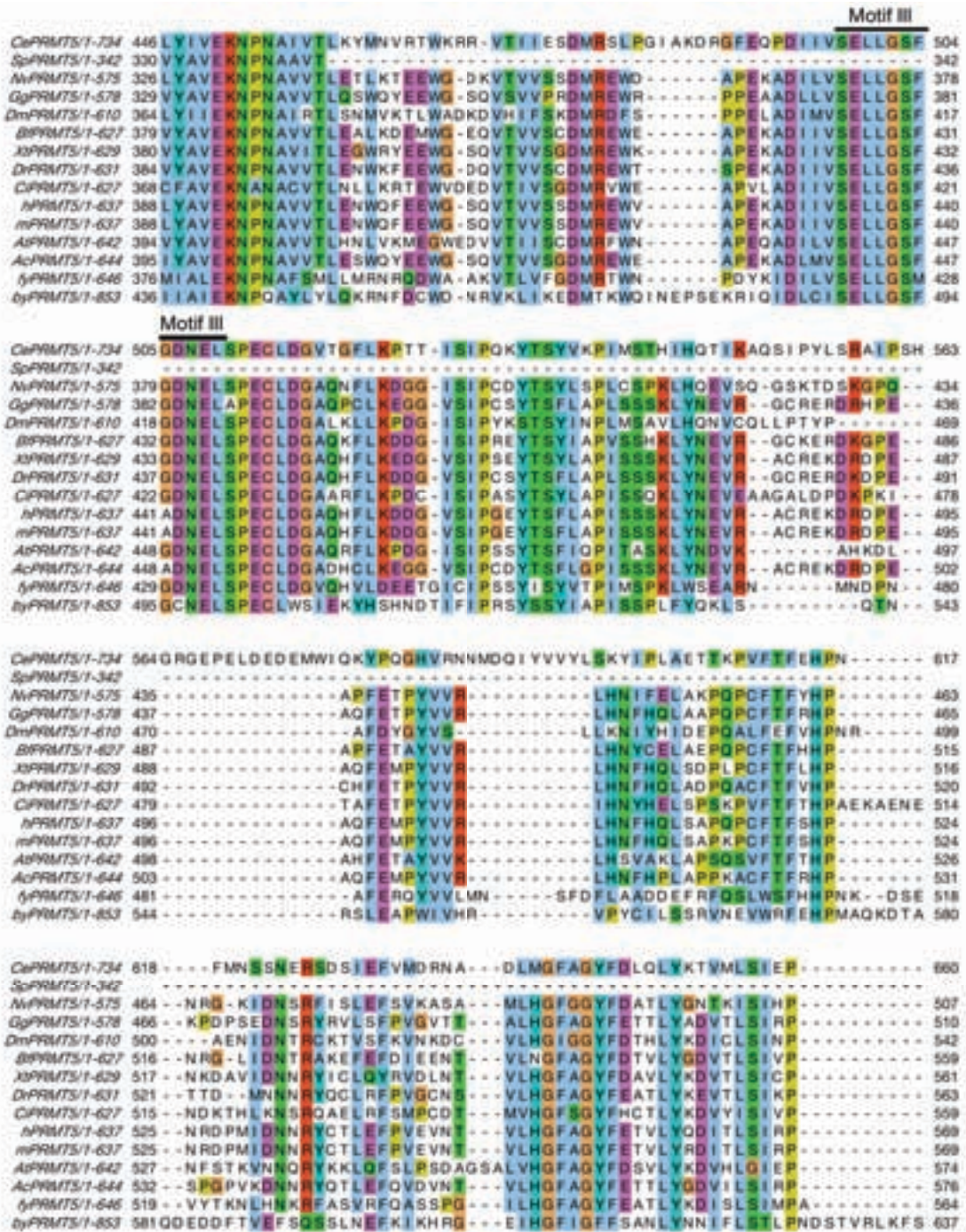


Figure 80 - Alignement de séquences correspondants aux différents homologues de la protéine PRMT5 (suite)

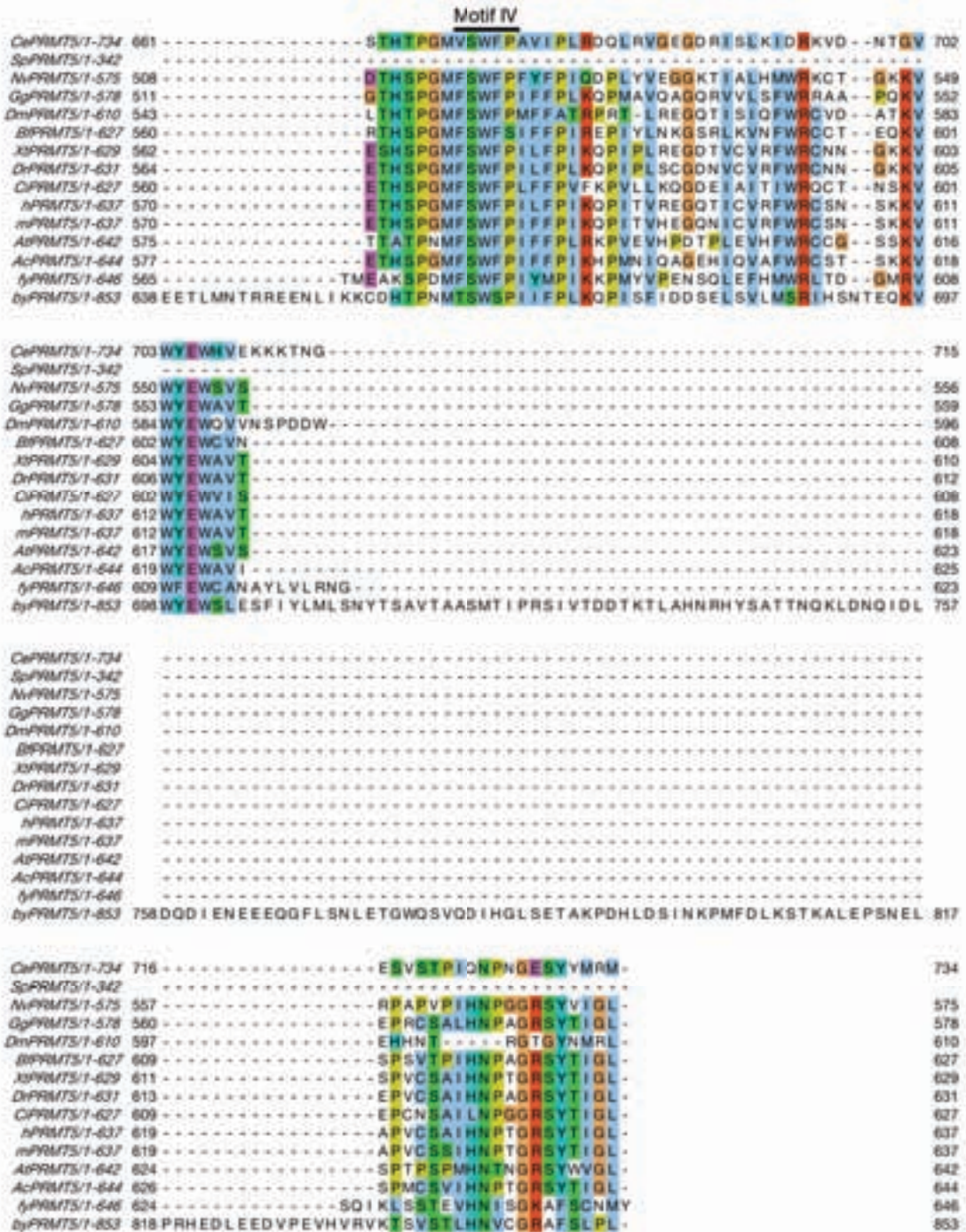


Figure 80 - Alignement de séquences correspondant aux différents homologues de la protéine PRMT5 (suite)

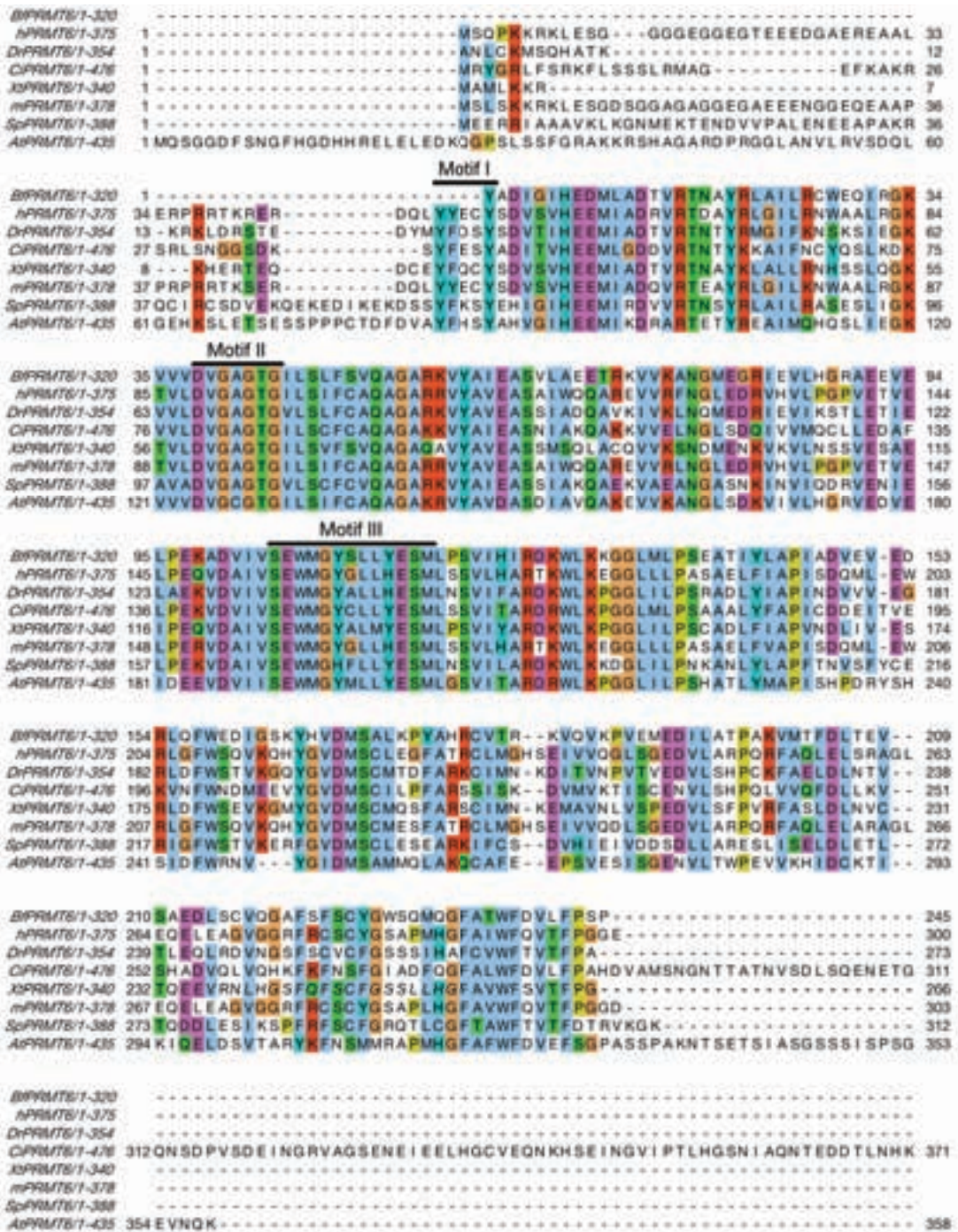


Figure 81 - Alignement de séquences correspondants aux différents homologues de la protéine PRMT6
 Chaque séquence est identifiée par le nom de la protéine (PRMT6), précédé d'une ou deux lettres codant pour l'organisme à laquelle elle appartient : [h] *Homo sapiens* (humain), [m] *Mus musculus* (souris), [Xt] *Xenopus tropicalis* (grenouille), [Dr] *Danio rerio* (poisson zèbre), [Ci] *Ciona intestinalis* (ascidie), [Bf] *Branchiostoma floridae* (amphioxiforme), [Sp] *Strongylocentrotus purpuratus* (oursin), [At] *Arabidopsis thaliana* (arabette des dames).

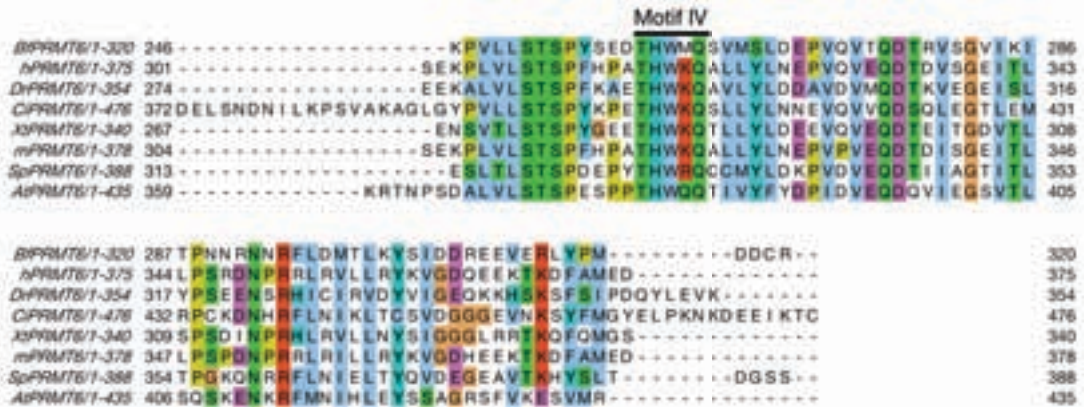
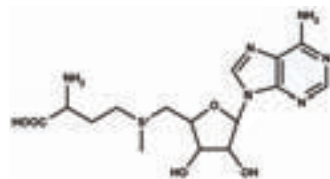


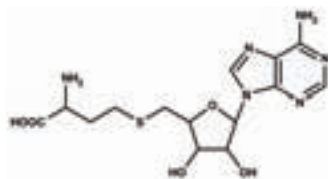
Figure 81 - Alignement de séquences correspondant aux différents homologues de la protéine PRMT6 (suite)

Références

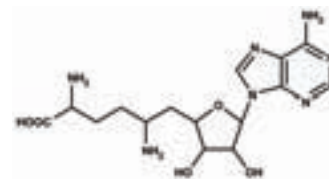
SAM



SAH

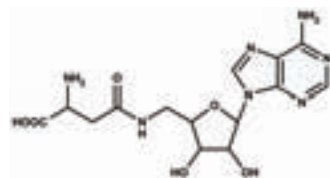


SFG

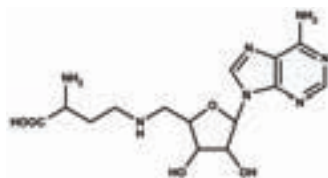


Analogues du SAM

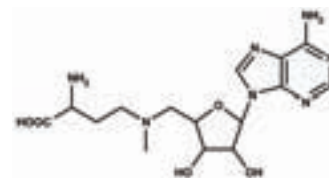
SA106



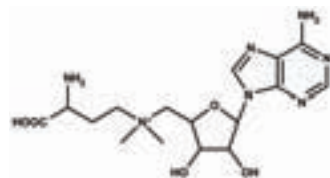
SA107



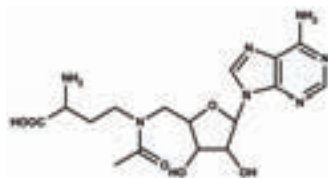
SA221



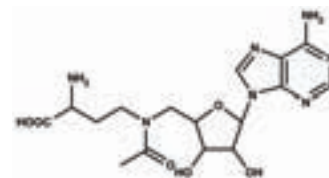
SA227



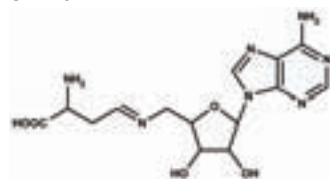
SA268



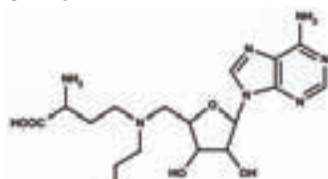
SA269



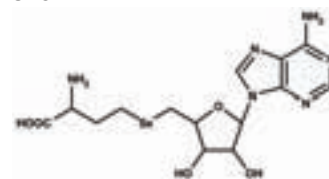
SA270



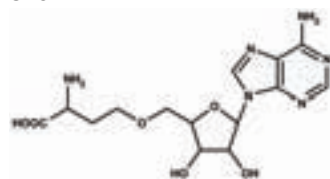
SA275



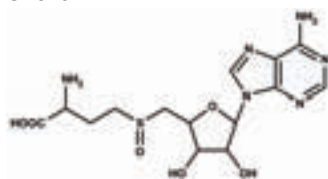
SA372



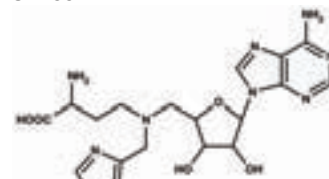
SA377



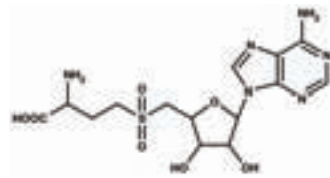
SA379



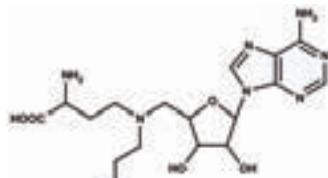
SA435



SA505



SA580



SA599

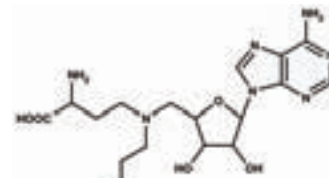
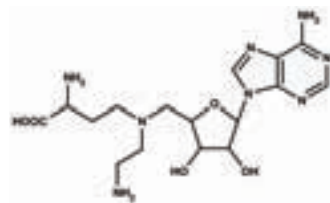
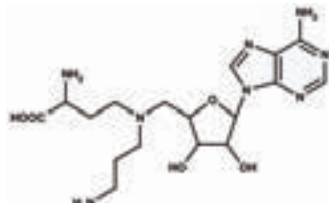
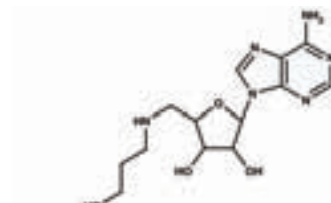
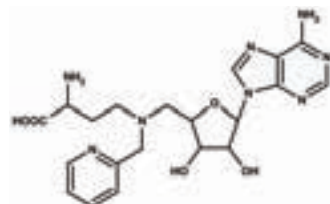
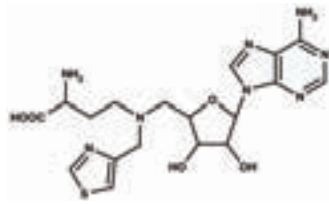
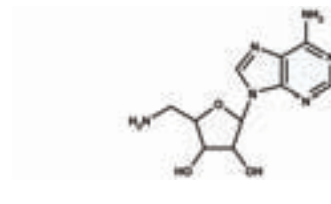
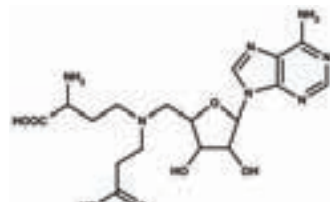


Tableau 20 - Récapitulatif des analogues du SAM et des mimes SAM/Arginine ou SAM/Peptide

Les composés sont classés en fonction de leur classe et par ordre alphabétique. Les noms accordés aux composés sont arbitraires.

Analogues du SAM

SA678**SA707****SA814****SA838****SA842****SA920****SA930**

Mimes SAM/Arginines

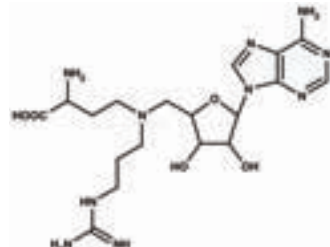
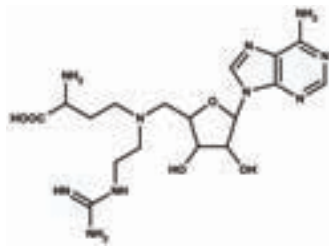
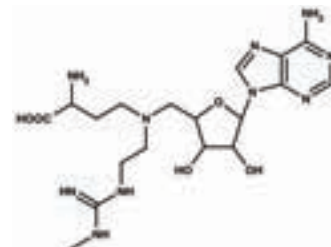
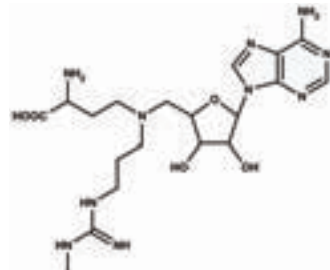
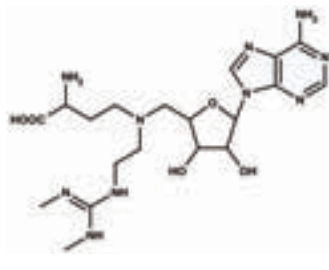
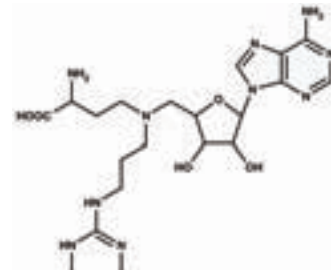
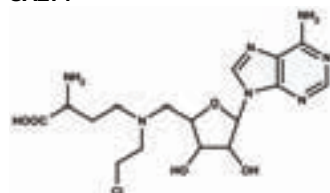
SA649**SA684****SA714****SA752****SA757****SA760**

Tableau 20 - Récapitulatif des analogues du SAM et des mimes SAM/Arginine ou SAM/Peptide (suite)

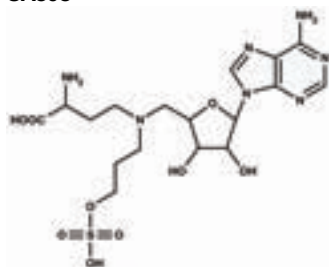
Les composés sont classés en fonction de leur classe et par ordre alphabétique. Les noms accordés aux composés sont arbitraires.

Analogues du SAM électrophiles

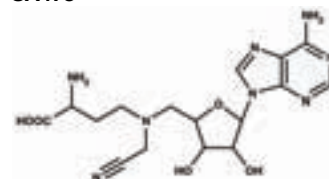
SA271



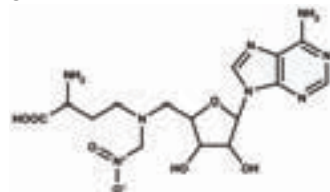
SA398



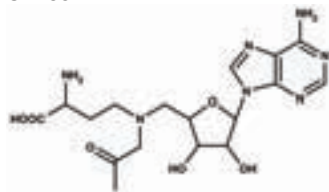
SA473



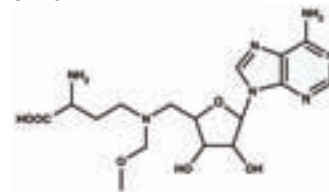
SA474



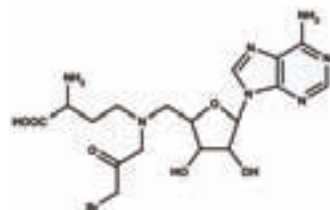
SA483



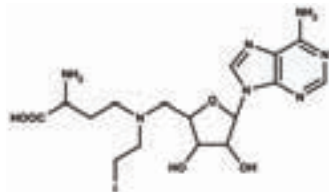
SA484



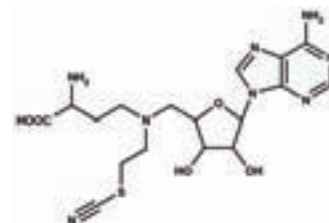
SA491



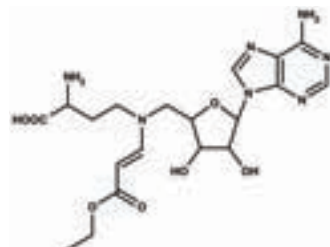
SA493



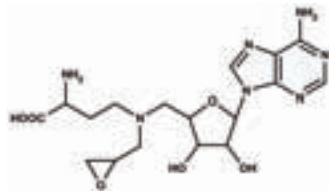
SA507



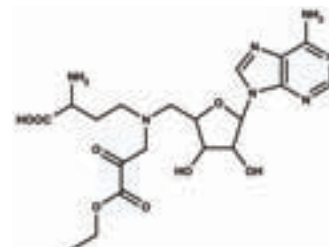
SA581



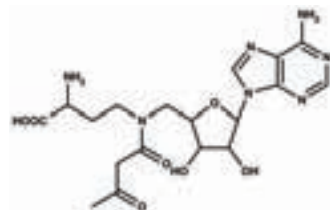
SA586



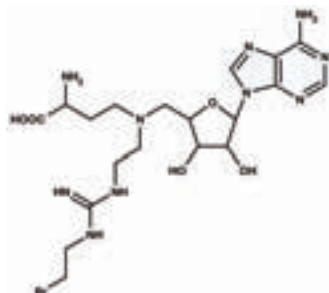
SA592



SA598



SA751



SA765

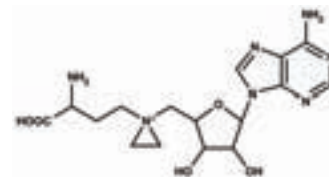
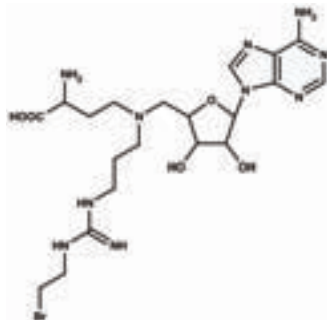


Tableau 20 - Récapitulatif des analogues du SAM et des mimes SAM/Arginine ou SAM/Peptide (suite)

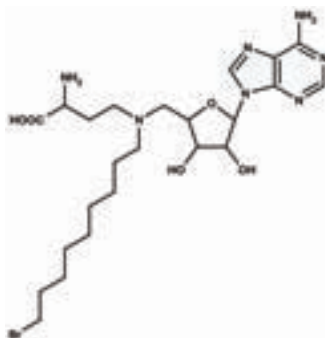
Les composés sont classés en fonction de leur classe et par ordre alphabétique. Les noms accordés aux composés sont arbitraires.

Analogues du SAM électrophiles

SA1231

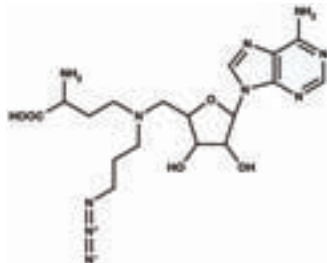


SA1320

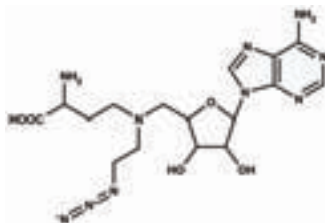


Analogues du SAM à fonction azoture

SA401

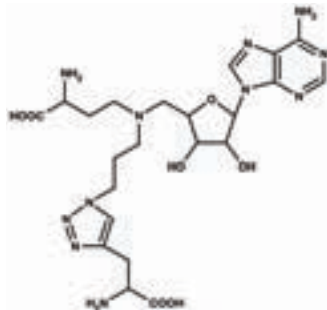


SA705

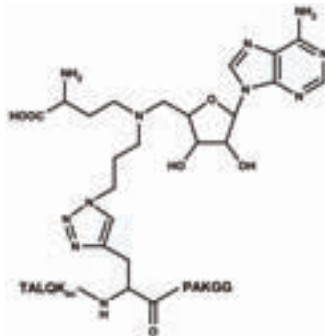


Produits de la réaction de cycloaddition avec un acide aminé ou un peptide à fonction alcyne

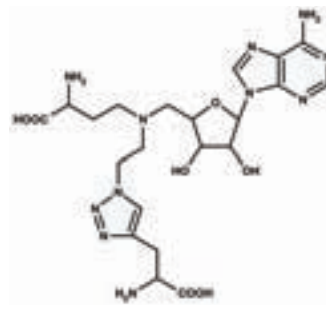
SA375



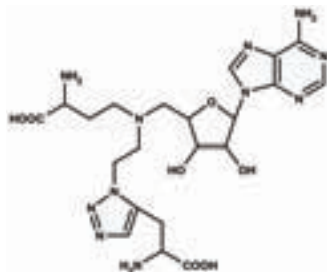
SA528



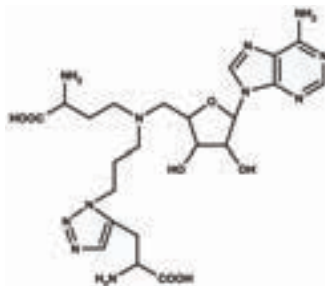
SA769



SA770



SA870



SA1056

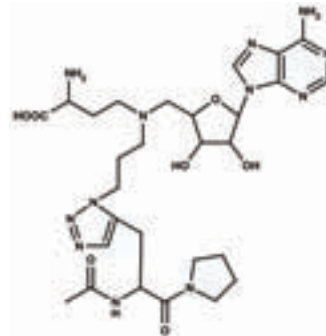
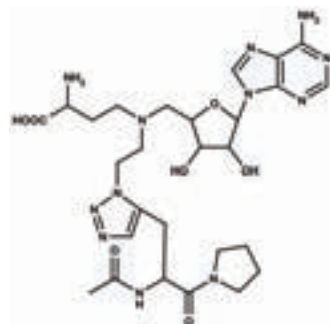


Tableau 20 - Récapitulatif des analogues du SAM et des mimes SAM/Arginine ou SAM/Peptide (suite)

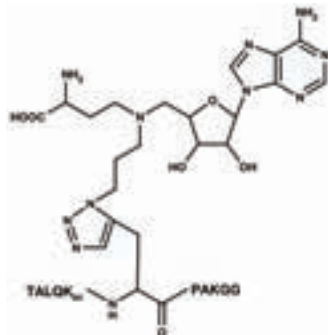
Les composés sont classés en fonction de leur classe et par ordre alphabétique. Les noms accordés aux composés sont arbitraires.

Produits de la réaction de cycloaddition avec un acide aminé ou un peptide à fonction alcyne

SA1071



SA1114



SA1322

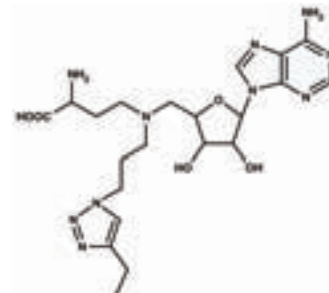


Tableau 20 - Récapitulatif des analogues du SAM et des mimes SAM/Arginine ou SAM/Peptide (suite)

Les composés sont classés en fonction de leur classe et par ordre alphabétique. Les noms accordés aux composés sont arbitraires.

		CARM1_SA920	CARM1_SA678	CARM1_SA707	
Échantillons	<i>Protéine</i>	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	
	<i>Cofacteur/Inhibiteur</i>	1 mM SA920	2 mM SA678	250 µM SA707	
	<i>Substrat</i>	-	-	-	
Cristallisation	<i>Réservoir</i>	100 mM TrisHCl pH8,0 67 mM NaCl 16% PEG2000MME	100 mM BTP pH7,5 50 mM NaCl 25% PEG2000MME	100 mM TrisHCl pH8,0 150 mM NaCl 22% PEG2000MME	
	<i>Température (°C)</i>	24	24	24	
Collecte	<i>Ligne de lumière</i>	SOLEIL Proxima1	ESRF ID23-1	SOLEIL Proxima1	
	<i>Détecteur</i>	CCD ADSC Q315r	CCD ADSC Q315r	CCD ADSC Q315r	
	<i>Longueur d'onde (Å)</i>	0,9801	1,276	0,9801	
	<i>Distance du détecteur (mm)</i>	413,9	231,5	359,6	
	<i>#Images</i>	600	360	385	
	<i>Oscillations (°)</i>	0,3	0,5	0,3	
	<i>Temps d'exposition (s)</i>	0,9	0,8	0,5	
	Traitement	<i>Groupe d'espace</i>	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>Paramètres de maille</i>	<i>a - b - c (Å)</i>	74,7 - 98,5 - 207,1	74,9 - 98,0 - 206,9	74,7 - 98,2 - 205,1	
	<i>α - β - γ (°)</i>	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90	
	<i>R_{merge} (%)^[a]</i>	8,3 (32,5)	8,9 (44,1)	5,7 (26,9)	
	<i>I/σ_i</i>	13,4 (3,9)	14,8 (5,3)	19,2 (5,6)	
	<i>Complétude (%)</i>	98,9 (98,4)	99,8 (100)	99,6 (99,3)	
	<i>Redondance</i>	5,0 (5,1)	6,3 (6,5)	5,3 (4,7)	
Affinement	<i>Résolution (Å)</i>	2,7	2,25	2,4	
	<i>#Réflexions</i>	39440	73731	57651	
	<i>R_{work} (%)^[b]</i>	17,3 (23,6)	20,4 (25,0)	17,7 (22,0)	
	<i>R_{free} (%)^[b]</i>	23,0 (35,0)	24,8 (28,3)	22,1 (26,5)	
	<i>#Atomes</i>	<i>Protéine</i>	11004	10919	11012
		<i>Ligand</i>	76	116	120
		<i>Solvant</i>	100	500	351
	<i>Facteur B moyen (Å²)</i>	54,6	42,2	40	
Validation	<i>RMSD</i>	<i>Longueur (Å)</i>	0,014	0,014	0,013
		<i>Angles (°)</i>	1,88	1,81	1,84
	<i>Ramachandran favorables (%)</i>	96	96	97	
	<i>Ramachandran hors-limite (%)</i>	0,37	0,15	0,22	

Tableau 21 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence d'analogues du SAM.

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux données dans la tranche de plus haute résolution

[a] $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, où I et $\langle I \rangle$ sont les intensités mesurées et moyenne de plusieurs mesures d'une même réflexion. La somme est faite sur l'ensemble des réflexions observées.

[b] $R\text{-factor} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, où F_o représente l'amplitude du facteur de structure observé et F_c le facteur de structure calculé à partir du modèle. R_{work} a été calculé à partir des données de diffraction utilisées au cours de l'affinement, et R_{free} à partir de 10% des données de diffraction non-inclues dans l'affinement choisis aléatoirement.

		CARM1_SA269	CARM1_SA435	
Échantillons	<i>Protéine</i>	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	
	<i>Cofacteur/Inhibiteur</i>	1 mM SA269	1 mM SA435	
	<i>Substrat</i>	-	-	
Cristallisation	<i>Réservoir</i>	100 mM TrisHCl pH8,0 133 mM NaCl 22% PEG2000MME	100 mM TrisHCl pH8,0 133 mM NaCl 19% PEG2000MME	
	<i>Température (°C)</i>	24	24	
Collecte	<i>Ligne de lumière</i>	SOLEIL Proxima1	SOLEIL Proxima1	
	<i>Détecteur</i>	CCD ADSC Q315r	CCD ADSC Q315r	
	<i>Longueur d'onde (Å)</i>	0,9801	0,9801	
	<i>Distance du détecteur (mm)</i>	363,0	293,4	
	<i>#Images</i>	600	360	
	<i>Oscillations (°)</i>	0,3	0,5	
	<i>Temps d'exposition (s)</i>	0,3	0,3	
	Traitement	<i>Groupe d'espace</i>	I222	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>Paramètres de maille</i>		<i>a - b - c (Å)</i>	73,9 - 97,2 - 206,9	74,4 - 98,1 - 205,7
		<i>α - β - γ (°)</i>	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90
<i>R_{merge} (%)^[a]</i>		6,5 (29,5)	6,7 (37,9)	
<i>I/σ_i</i>		18,6 (6,7)	27,4 (4,7)	
<i>Complétude (%)</i>		99,1 (100)	99,9 (100)	
<i>Redondance</i>		5,6 (5,4)	6,7 (6,5)	
Affinement		<i>Résolution (Å)</i>	2,4	2,0
	<i>#Réflexions</i>	29801	102792	
	<i>R_{work} (%)^[b]</i>	21,4 (26,9)	19,5 (22,8)	
	<i>R_{free} (%)^[b]</i>	26,1 (28,7)	22,7 (26,9)	
	<i>#Atomes</i>	<i>Protéine</i>	5241	10997
		<i>Ligand</i>	60	128
		<i>Solvant</i>	83	873
	<i>Facteur B moyen (Å²)</i>	57,7	31	
Validation	<i>RMSD</i>	<i>Longueur (Å)</i>	0,014	0,013
		<i>Angles (°)</i>	1,88	1,57
	<i>Ramachandran favorables (%)</i>	96	96	
	<i>Ramachandran hors-limite (%)</i>	0,31	0,073	

Tableau 21 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence d'analogues du SAM (suite).

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux données dans la tranche de plus haute résolution

[a] $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, où I et $\langle I \rangle$ sont les intensités mesurées et moyenne de plusieurs mesures d'une même réflexion. La somme est faite sur l'ensemble des réflexions observées.

[b] $R\text{-factor} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, où F_o représente l'amplitude du facteur de structure observé et F_c le facteur de structure calculé à partir du modèle. R_{work} a été calculé à partir des données de diffraction utilisées au cours de l'affinement, et R_{free} à partir de 10% des données de diffraction non-inclues dans l'affinement choisis aléatoirement.

		CARM1_SA684	CARM1_SA649	CARM1_SA714	
Échantillons	<i>Protéine</i>	mCARM1 ₁₃₀₋₄₉₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₄₉₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	
	<i>Cofacteur/Inhibiteur</i>	2 mM SA684	1 mM SA649	2 mM SA714	
	<i>Substrat</i>	-	-	-	
Cristallisation	<i>Réservoir</i>	100 mM BTP pH7,5 30% PEG1500	100 mM TrisHCl pH8,0 133 mM NaCl 15% PEG2000MME	100 mM BTP pH7,5 25% PEG3350	
	<i>Température (°C)</i>	24	24	24	
Collecte	<i>Ligne de lumière</i>	ESRF ID14-4	SOLEIL Proxima1	ESRF ID14-4	
	<i>Détecteur</i>	CCD ADSC Q315r	CCD ADSC Q315r	CCD ADSC Q315r	
	<i>Longueur d'onde (Å)</i>	0,954	0,9801	0,954	
	<i>Distance du détecteur (mm)</i>	387,3	309	334,9	
	<i>#Images</i>	360	720	360	
	<i>Oscillations (°)</i>	0,5	0,25	0,5	
	<i>Temps d'exposition (s)</i>	0,5	0,3	0,5	
	Traitement	<i>Groupe d'espace</i>	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>Paramètres de maille</i>		<i>a - b - c (Å)</i>	74,6 - 98,2 - 206,5	74,7 - 98,3 - 206,2	74,9 - 98,4 - 206,4
		<i>α - β - γ (°)</i>	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90
<i>R_{merge} (%)^[a]</i>		8,4 (42,1)	7,7 (30,7)	8,2 (38,9)	
<i>I/σ_i</i>		18,4 (5,0)	24,4 (4,9)	20,4 (7,1)	
<i>Complétude (%)</i>		99,9 (100)	97,9 (91,6)	99,9 (100)	
<i>Redondance</i>		7,0 (7,1)	6,2 (5,6)	7,0 (7,1)	
Affinement		<i>Résolution (Å)</i>	2,6	2,1	2,5
	<i>#Réflexions</i>	47402	87780	52821	
	<i>R_{work} (%)^[b]</i>	19,3 (23,1)	19,4 (23,5)	18,2 (22,1)	
	<i>R_{free} (%)^[b]</i>	24,5 (28,2)	23,1 (28,0)	23,1 (29,7)	
	<i>#Atomes</i>	<i>Protéine</i>	11274	10985	11274
		<i>Ligand</i>	128	132	132
		<i>Solvant</i>	244	626	340
<i>Facteur B moyen (Å²)</i>	51,3	30,7	39,5		
Validation	<i>RMSD</i>	<i>Longueur (Å)</i>	0,014	0,012	0,014
		<i>Angles (°)</i>	1,91	1,34	1,88
	<i>Ramachandran favorables (%)</i>	96	96	96	
	<i>Ramachandran hors-limite (%)</i>	0,64	0,29	0,5	

Tableau 22 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence de mimes SAM/Arginine.

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux données dans la tranche de plus haute résolution

[a] $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, où I et $\langle I \rangle$ sont les intensités mesurées et moyenne de plusieurs mesures d'une même réflexion. La somme est faite sur l'ensemble des réflexions observées.

[b] $R\text{-factor} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, où F_o représente l'amplitude du facteur de structure observé et F_c le facteur de structure calculé à partir du modèle. R_{work} a été calculé à partir des données de diffraction utilisées au cours de l'affinement, et R_{free} à partir de 10% des données de diffraction non-inclues dans l'affinement choisis aléatoirement.

		CARM1_SA271	CARM1_SA491	CARM1_SA592	
Échantillons	<i>Protéine</i>	mCARM1 ₁₃₀₋₅₀₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,2 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,2 mg.ml ⁻¹	
	<i>Cofacteur/Inhibiteur</i>	2 mM SA271	2 mM SA491	2 mM SA592	
	<i>Substrat</i>	1 mM H3 ₁₋₃₄ K18ac	2 mM H3 ₁₂₋₂₂ R17C/K18ac	2 mM H3 ₁₂₋₂₂ R17C/K18ac	
Cristallisation	<i>Réservoir</i>	100 mM BTP pH7,5 15% PEG3350	100 mM TrisHCl pH8,0 19% PEG2000MME	100 mM TrisHCl pH8,0 133 mM NaCl 19% PEG2000MME	
	<i>Température (°C)</i>	17	17	17	
Collecte	<i>Ligne de lumière</i>	ESRF ID23-1	SOLEIL Proxima1	SOLEIL Proxima1	
	<i>Détecteur</i>	CCD ADSC Q315r	CCD ADSC Q315r	CCD ADSC Q315r	
	<i>Longueur d'onde (Å)</i>	0,970	0,9790	0,9184	
	<i>Distance du détecteur (mm)</i>	376,3	379,1	406,7	
	<i>#Images</i>	900	720	720	
	<i>Oscillations (°)</i>	0,2	0,25	0,25	
	<i>Temps d'exposition (s)</i>	0,8	0,4	0,3	
	Traitement	<i>Groupe d'espace</i>	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>Paramètres de maille</i>		<i>a - b - c (Å)</i>	74,5 - 98,6 - 207,5	79,1 - 101,0 - 211,3	74,6 - 98,4 - 205,8
		<i>α - β - γ (°)</i>	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90
<i>R_{merge} (%)^[a]</i>		10,2 (25,4)	9,5 (48,6)	8,2 (37,9)	
<i>I/σ</i>		11,4 (4,7)	14,5 (4,1)	16,7 (4,3)	
<i>Complétude (%)</i>		93,8 (94,4)	88,1 (78,7)	99,4 (98,5)	
<i>Redondance</i>		3,3 (3,4)	5,5 (5,1)	6,4 (5,8)	
Affinement		<i>Résolution (Å)</i>	2,7	2,6	2,6
	<i>#Réflexions</i>	39282	47351	47067	
	<i>R_{work} (%)^[b]</i>	22,8 (29,7)	21,1 (28,2)	19,6 (23,8)	
	<i>R_{free} (%)^[b]</i>	28,3 (35,7)	25,0 (35,1)	24,7 (30,1)	
	<i>#Atomes</i>	<i>Protéine</i>	10779	11004	11004
		<i>Ligand</i>	116	124	136
		<i>Solvant</i>	134	223	207
<i>Facteur B moyen (Å²)</i>	58,5	53,3	51,9		
Validation	<i>RMSD</i>	<i>Longueur (Å)</i>	0,014	0,014	0,014
		<i>Angles (°)</i>	1,92	1,82	1,92
	<i>Ramachandran favorables (%)</i>	92	96	96	
	<i>Ramachandran hors-limite (%)</i>	0,9	0,15	0,51	

Tableau 23 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence d'analogues du SAM électrophiles.

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux données dans la tranche de plus haute résolution

[a] $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, où I et $\langle I \rangle$ sont les intensités mesurées et moyenne de plusieurs mesures d'une même réflexion. La somme est faite sur l'ensemble des réflexions observées.

[b] $R\text{-factor} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, où F_o représente l'amplitude du facteur de structure observé et F_c le facteur de structure calculé à partir du modèle. R_{work} a été calculé à partir des données de diffraction utilisées au cours de l'affinement, et R_{free} à partir de 10% des données de diffraction non-inclues dans l'affinement choisis aléatoirement.

		CARM1_SA751	CARM1_SA765	
Échantillons	<i>Protéine</i>	mCARM1 ₁₃₀₋₄₉₇ WT 1,4 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	
	<i>Cofacteur/Inhibiteur</i>	2 mM SA751	1 mM SA765	
	<i>Substrat</i>	-	1 mM Arginine	
Cristallisation	<i>Réservoir</i>	100 mM TrisHCl pH7,5 19% PEG2000MME	100 mM TrisHCl pH8,0 67 mM NaCl 17% PEG2000MME	
	<i>Température (°C)</i>	17	24	
Collecte	<i>Ligne de lumière</i>	SOLEIL Proxima1	SOLEIL Proxima1	
	<i>Détecteur</i>	CCD ADSC Q315r	CCD ADSC Q315r	
	<i>Longueur d'onde (Å)</i>	0,9801	0,9801	
	<i>Distance du détecteur (mm)</i>	343	320	
	<i>#Images</i>	360	600	
	<i>Oscillations (°)</i>	0,5	0,3	
	<i>Temps d'exposition (s)</i>	0,6	0,4	
	Traitement	<i>Groupe d'espace</i>	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>Paramètres de maille</i>		<i>a - b - c (Å)</i>	74,5 - 97,8 - 206,3	74,7 - 98,4 - 206,8
		<i>α - β - γ (°)</i>	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90
<i>R_{merge} (%)^[a]</i>		9,2 (35,9)	8,3 (35,6)	
<i>I/σ_i</i>		16,5 (5,1)	14,6 (5,4)	
<i>Complétude (%)</i>		99,8 (99,9)	99,8 (99,7)	
<i>Redondance</i>		6,8 (7,0)	4,3 (4,0)	
Affinement		<i>Résolution (Å)</i>	2,7	2,15
	<i>#Réflexions</i>	41720	83186	
	<i>R_{work} (%)^[b]</i>	18,7 (22,6)	18,4 (21,8)	
	<i>R_{free} (%)^[b]</i>	24,4 (28,5)	22,5 (29,7)	
	<i>#Atomes</i>	<i>Protéine</i>	11274	11004
		<i>Ligand</i>	140	112
		<i>Solvant</i>	120	837
	<i>Facteur B moyen (Å²)</i>	55	30,3	
Validation	<i>RMSD</i>	<i>Longueur (Å)</i>	0,014	0,014
		<i>Angles (°)</i>	1,91	1,81
	<i>Ramachandran favorables (%)</i>	95	96	
	<i>Ramachandran hors-limite (%)</i>	0,64	0,37	

Tableau 23 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence d'analogues du SAM électrophiles (suite).

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux données dans la tranche de plus haute résolution

[a] $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, où I et $\langle I \rangle$ sont les intensités mesurées et moyenne de plusieurs mesures d'une même réflexion. La somme est faite sur l'ensemble des réflexions observées.

[b] $R\text{-factor} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, où F_o représente l'amplitude du facteur de structure observé et F_c le facteur de structure calculé à partir du modèle. R_{work} a été calculé à partir des données de diffraction utilisées au cours de l'affinement, et R_{free} à partir de 10% des données de diffraction non-inclues dans l'affinement choisis aléatoirement.

		CARM1_SA401	CARM1_SA705	
Échantillons	<i>Protéine</i>	mCARM1 ₁₃₀₋₄₉₀ WT 1,6 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	
	<i>Cofacteur/Inhibiteur</i>	1,2 mM SA401	2 mM SA705	
	<i>Substrat</i>	2 mM H3 ₁₂₋₂₂ R17X/K18Ac	-	
Cristallisation	<i>Réservoir</i>	100 mM MIB pH7,0 100 mM NaCl 17,5% PEG1500	100 mM TrisHCl pH8,0 167 mM NaCl 10% PEG2000MME	
	<i>Température (°C)</i>	17	24	
Collecte	<i>Ligne de lumière</i>	ESRF ID14-2	SOLEIL Proxima1	
	<i>Détecteur</i>	CCD ADSC Q4	PILATUS 6M	
	<i>Longueur d'onde (Å)</i>	0,933	0,979	
	<i>Distance du détecteur (mm)</i>	225	416,7	
	<i>#Images</i>	315	1800	
	<i>Oscillations (°)</i>	0,5	0,1	
	<i>Temps d'exposition (s)</i>	30	0,1	
	Traitement	<i>Groupe d'espace</i>	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>Paramètres de maille</i>		<i>a - b - c (Å)</i>	74,5 - 98,4 - 205,8	74,7 - 98,1 - 206,7
		<i>α - β - γ (°)</i>	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90
<i>R_{merge} (%)^[a]</i>		6,1 (28,5)	9,2 (28,9)	
<i>I/σ_i</i>		22,2 (7,0)	10,9 (3,6)	
<i>Complétude (%)</i>		97,2 (92,5)	98,7 (98,3)	
<i>Redondance</i>		5,2 (4,6)	4,4 (4,1)	
Affinement		<i>Résolution (Å)</i>	2,4	2,2
	<i>#Réflexions</i>	58240	73706	
	<i>R_{work} (%)^[b]</i>	15,7 (18,3)	16,7 (18,8)	
	<i>R_{free} (%)^[b]</i>	21,4 (25,5)	21,3 (24,8)	
	<i>#Atomes</i>	<i>Protéine</i>	11004	11004
		<i>Ligand</i>	128	124
		<i>Solvant</i>	335	318
<i>Facteur B moyen (Å²)</i>	33,5	49,7		
Validation	<i>RMSD</i>	<i>Longueur (Å)</i>	0,008	0,008
		<i>Angles (°)</i>	1,11	1,12
	<i>Ramachandran favorables (%)</i>	97	97	
	<i>Ramachandran hors-limite (%)</i>	0	0	

Tableau 24 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence d'analogues du SAM à fonction azoture.

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux données dans la tranche de plus haute résolution

[a] $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, où I et $\langle I \rangle$ sont les intensités mesurées et moyenne de plusieurs mesures d'une même réflexion. La somme est faite sur l'ensemble des réflexions observées.

[b] $R\text{-factor} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, où F_o représente l'amplitude du facteur de structure observé et F_c le facteur de structure calculé à partir du modèle. R_{work} a été calculé à partir des données de diffraction utilisées au cours de l'affinement, et R_{free} à partir de 10% des données de diffraction non-inclues dans l'affinement choisis aléatoirement.

		CARM1_SA375	CARM1_SA870	
Échantillons	<i>Protéine</i>	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	
	<i>Cofacteur/Inhibiteur</i>	2 mM SA375	1 mM SA870	
	<i>Substrat</i>	-	-	
Cristallisation	<i>Réservoir</i>	100 mM TrisHCl pH8,0 100 mM NaCl 13% PEG2000MME	100 mM BTP pH7,5 100 mM NaCl 16% PEG2000MME	
	<i>Température (°C)</i>	24	24	
Collecte	<i>Ligne de lumière</i>	SOLEIL Proxima1	SOLEIL Proxima1	
	<i>Détecteur</i>	PILATUS 6M	CCD ADSC Q315r	
	<i>Longueur d'onde (Å)</i>	0,979	0,9801	
	<i>Distance du détecteur (mm)</i>	418,3	327	
	<i>#Images</i>	1800	300	
	<i>Oscillations (°)</i>	0,1	0,6	
	<i>Temps d'exposition (s)</i>	0,1	0,5	
	Traitement	<i>Groupe d'espace</i>	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>Paramètres de maille</i>		<i>a - b - c (Å)</i>	74,9 - 98,4 - 206,9	74,7 - 98,3 - 206,1
		<i>α - β - γ (°)</i>	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90
<i>R_{merge} (%)^[a]</i>		9,1 (27,5)	8,1 (37,3)	
<i>I/σ_i</i>		12,2 (4,7)	18,5 (4,7)	
<i>Complétude (%)</i>		99,7 (99,7)	98,8 (98,3)	
<i>Redondance</i>		4,4 (4,2)	6,8 (6,8)	
Affinement		<i>Résolution (Å)</i>	2,3	2,4
	<i>#Réflexions</i>	64297	59219	
	<i>R_{work} (%)^[b]</i>	16,3 (18,9)	16,8 (19,6)	
	<i>R_{free} (%)^[b]</i>	22,1 (27,6)	22,4 (26,2)	
	<i>#Atomes</i>	<i>Protéine</i>	11004	11004
		<i>Ligand</i>	160	160
		<i>Solvant</i>	510	424
	<i>Facteur B moyen (Å²)</i>	33,6	35,6	
Validation	<i>RMSD</i>	<i>Longueur (Å)</i>	0,008	0,028
		<i>Angles (°)</i>	1,17	1,20
	<i>Ramachandran favorables (%)</i>	97	96	
	<i>Ramachandran hors-limite (%)</i>	0,073	0,073	

Tableau 25 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence de produits de click.

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux données dans la tranche de plus haute résolution

[a] $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, où I et $\langle I \rangle$ sont les intensités mesurées et moyenne de plusieurs mesures d'une même réflexion. La somme est faite sur l'ensemble des réflexions observées.

[b] $R\text{-factor} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, où F_o représente l'amplitude du facteur de structure observé et F_c le facteur de structure calculé à partir du modèle. R_{work} a été calculé à partir des données de diffraction utilisées au cours de l'affinement, et R_{free} à partir de 10% des données de diffraction non-incluses dans l'affinement choisis aléatoirement.

		CARM1_SAH	CARM1_N266A	CARM1_SAH_décarboxylé	
Échantillons	<i>Protéine</i>	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₅₀₇ N266A 2,0 mg.ml ⁻¹	mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇ WT 2,0 mg.ml ⁻¹	
	<i>Cofacteur/Inhibiteur</i>	2 mM SAH	1 mM SAH	2 mM SAH	
	<i>Substrat</i>	2 mM Guanidine-me1	-	-	
Cristallisation	<i>Réservoir</i>	100 mM TrisHCl pH8,0 167 mM NaCl 19% PEG2000MME	100 mM BTP pH7,5 300 mM NaCl 23% PEG3350	100 mM TrisHCl pH8,0 167 mM NaCl 25% PEG2000MME	
	<i>Température (°C)</i>	24	17	24	
Collecte	<i>Ligne de lumière</i>	ESRF ID14-4	ESRF ID23-2	SOLEIL Proxima1	
	<i>Détecteur</i>	CCD ADSC Q315r	CCD ADSC Q4	PILATUS 6M	
	<i>Longueur d'onde (Å)</i>	0,9304	0,8726	0,9840	
	<i>Distance du détecteur (mm)</i>	240,5	305,5	437,9	
	<i>#Images</i>	900	600	900	
	<i>Oscillations (°)</i>	0,2	0,3	0,2	
	<i>Temps d'exposition (s)</i>	0,1	3,3	0,2	
	Traitement	<i>Groupe d'espace</i>	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>Paramètres de maille</i>	<i>a - b - c (Å)</i>	74,6 - 97,9 - 205,0	74,9 - 98,4 - 206,3	74,5 - 99,0 - 206,9	
	<i>α - β - γ (°)</i>	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90	
	<i>R_{merge} (%)^[a]</i>	12,9 (139,8)	10,4 (58,1)	8,6 (199)	
	<i>I/σ_i</i>	11,2 (1,5)	20,4 (3,1)	10,2 (0,9)	
	<i>Complétude (%)</i>	99,9 (98,6)	99,9 (100)	99,6 (95,9)	
	<i>Redondance</i>	7,3 (6,8)	7,1 (6,6)	6,4 (6,1)	
Affinement	<i>Résolution (Å)</i>	1,77	2,6	2,3	
	<i>#Réflexions</i>	146548	48185	69753	
	<i>R_{work} (%)^[b]</i>	19,2 (30,4)	20,2 (26,2)	23,1 (34,7)	
	<i>R_{free} (%)^[b]</i>	21,0 (31,7)	23,5 (29,9)	25,7 (35,9)	
	<i>#Atomes</i>	<i>Protéine</i>	10989	11273	10965
		<i>Ligand</i>	104	104	92
		<i>Solvant</i>	981	188	202
	<i>Facteur B moyen (Å²)</i>	26,9	55,2	75,9	
Validation	<i>RMSD</i>	<i>Longueur (Å)</i>	0,026	0,014	0,014
		<i>Angles (°)</i>	1,64	1,81	1,82
	<i>Ramachandran favorables (%)</i>	97	98	96	
	<i>Ramachandran hors-limite (%)</i>	0,3	0	0,44	

Tableau 26 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage ou mutant en présence de SAH ou de SAH décarboxylé.

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux données dans la tranche de plus haute résolution

[a] $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, où I et $\langle I \rangle$ sont les intensités mesurées et moyenne de plusieurs mesures d'une même réflexion. La somme est faite sur l'ensemble des réflexions observées.

[b] $R\text{-factor} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, où F_o représente l'amplitude du facteur de structure observé et F_c le facteur de structure calculé à partir du modèle. R_{work} a été calculé à partir des données de diffraction utilisées au cours de l'affinement, et R_{free} à partir de 10% des données de diffraction non-inclues dans l'affinement choisis aléatoirement.

		AtPRMT5_SFG	hPRMT5/hMEP50_SAH	
Échantillons	<i>Protéine</i>	AtPRMT5 WT 2,0 mg.ml ⁻¹	hPRMT5/hMEP50 WT 2,0 mg.ml ⁻¹	
	<i>Cofacteur/Inhibiteur</i>	1 mM SFG	500 µM SAH	
	<i>Substrat</i>	-	-	
Cristallisation	<i>Réservoir</i>	100 mM MES pH6,5 200 mM Na-Citrate 10% PEG20000, 5% Glycérol	100 mM BTP pH7,0 200 mM NaCl 13% PEG3350, 5% Glycérol 20 mM TCEP	
	<i>Température (°C)</i>	17	17	
Collecte	<i>Ligne de lumière</i>	SLS	ESRF ID29	
	<i>Détecteur</i>	PILATUS 6M	CCD ADSC Q4	
	<i>Longueur d'onde (Å)</i>	1,000	0,976	
	<i>Distance du détecteur (mm)</i>	200,0	610,7	
	<i>#Images</i>	1800	1800	
	<i>Oscillations (°)</i>	0,1	0,1	
	<i>Temps d'exposition (s)</i>	0,25	0,1	
Traitement	<i>Groupe d'espace</i>	P3 ₁ 21	H32	
	<i>Paramètres de maille</i>	<i>a - b - c (Å)</i>	107,9 - 107,9 - 287,0	190,9 - 190,9 - 349,8
		<i>α - β - γ (°)</i>	90 - 90 - 120	90 - 90 - 120
	<i>R_{merge} (%)^[a]</i>	11,7 (94,1)	16,1 (299)	
	<i>I/σ_i</i>	6,6 (1,3)	9,8 (0,8)	
	<i>Complétude (%)</i>	99,7 (99,1)	99,9 (100)	
	<i>Redondance</i>	2,7 (-)	10,1 (8,4)	
Affinement	<i>Résolution (Å)</i>	3,3	4,3	
	<i>#Réflexions</i>	29918	16963	
	<i>R_{work} (%)^[b]</i>	18,8 (33,6)	29,8 (32,4)	
	<i>R_{free} (%)^[b]</i>	23,9 (40,0)	39,5 (36,8)	
	<i>#Atomes</i>	<i>Protéine</i>	-	-
		<i>Ligand</i>	-	-
		<i>Solvant</i>	0	0
<i>Facteur B moyen (Å²)</i>	85,5	91,9		
Validation	<i>RMSD</i>	<i>Longueur (Å)</i>	0,010	0,006
		<i>Angles (°)</i>	1,17	1,16
	<i>Ramachandran favorables (%)</i>	94	90	
	<i>Ramachandran hors-limite (%)</i>	0,42	1	

Tableau 27 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de PRMT5.

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux données dans la tranche de plus haute résolution

[a] $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, où I et $\langle I \rangle$ sont les intensités mesurées et moyenne de plusieurs mesures d'une même réflexion. La somme est faite sur l'ensemble des réflexions observées.

[b] $R\text{-factor} = \sum |F_o| - |F_c| / \sum F_o$, où F_o représente l'amplitude du facteur de structure observé et F_c le facteur de structure calculé à partir du modèle. R_{work} a été calculé à partir des données de diffraction utilisées au cours de l'affinement, et R_{free} à partir de 10% des données de diffraction non-inclus dans l'affinement choisis aléatoirement.

		PRMT6_SFG	PRMT6_SFG_réduite	PRMT6_apo	
Échantillons	<i>Protéine</i>	mPRMT6 ₁₋₃₇₈ 2,5 mg.ml ⁻¹	mPRMT6 ₁₋₃₇₈ 5 mg.ml ⁻¹	mPRMT6 ₁₋₃₇₈ 5 mg.ml ⁻¹	
	<i>Cofacteur/Inhibiteur</i>	900 µM SFG	900 µM SFG	970 µM SA1056	
	<i>Substrat</i>	-	-	-	
Cristallisation	<i>Réservoir</i>	100 mM HEPES pH7,0 200 mM MgCl ₂ 20% PEG3350	100 mM HEPES pH7,0 200 mM MgCl ₂ 20% PEG1500	100 mM TrisHCl pH8,0 200 mM MgCl ₂ 20% PEG6000	
	<i>Température (°C)</i>	24	16	16	
Collecte	<i>Ligne de lumière</i>	SOLEIL Proxima1	SOLEIL Proxima1	ESRF ID23-2	
	<i>Détecteur</i>	PILATUS 6M	PILATUS 6M	CCD ADSC Q4	
	<i>Longueur d'onde (Å)</i>	0,9801	0,9537	0,8726	
	<i>Distance du détecteur (mm)</i>	270,0	331,7	195,8	
	<i>#Images</i>	700	900	200	
	<i>Oscillations (°)</i>	0,2	0,2	1,0	
	<i>Temps d'exposition (s)</i>	0,2	0,2	0,9	
Traitement	<i>Groupe d'espace</i>	I4 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2	I4 ₁	
	<i>Paramètres de maille</i>	<i>a - b - c (Å)</i>	78,8 - 78,8 - 118,5	118,4 - 143,0 - 41,8	79,8 - 79,8 - 118,9
		<i>α - β - γ (°)</i>	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90	90 - 90 - 90
	<i>R_{merge} (%)^[a]</i>	6,0 (83,9)	11,7 (104,1)	8,9 (185,6)	
	<i>I/σ_i</i>	14,8 (2,1)	8,7 (1,1)	17,3 (1,1)	
	<i>Complétude (%)</i>	99,6 (97,9)	99,2 (95,0)	98,5 (90,6)	
	<i>Redondance</i>	5,2	6,3	8,2	
Affinement	<i>Résolution (Å)</i>	1,6	1,6	1,6	
	<i>#Réflexions</i>	256857	616469	393362	
	<i>R_{work} (%)^[b]</i>	16,5 (25,1)	18,3 (30,4)	17,1 (31,1)	
	<i>R_{free} (%)^[b]</i>	18,6 (30,9)	20,3 (33,0)	19,5 (33,2)	
	<i>#Atomes</i>	<i>Protéine</i>	2647	5358	2931
		<i>Ligand</i>	27	54	1
		<i>Solvant</i>	186	307	328
<i>Facteur B moyen (Å²)</i>	26,0	24,2	26,8		
Validation	<i>RMSD</i>	<i>Longueur (Å)</i>	0,006	0,006	0,007
		<i>Angles (°)</i>	1,13	1,08	1,08
	<i>Ramachandran favorables (%)</i>	98,5	98,5	98,2	
	<i>Ramachandran hors-limite (%)</i>	0	0	0	

Tableau 28 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mPRMT6 en présence ou non de différents cofacteurs.

Les valeurs entre parenthèses correspondent aux données dans la tranche de plus haute résolution

[a] $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, où I et $\langle I \rangle$ sont les intensités mesurées et moyenne de plusieurs mesures d'une même réflexion. La somme est faite sur l'ensemble des réflexions observées.

[b] $R\text{-factor} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, où F_o représente l'amplitude du facteur de structure observé et F_c le facteur de structure calculé à partir du modèle. R_{work} a été calculé à partir des données de diffraction utilisées au cours de l'affinement, et R_{free} à partir de 10% des données de diffraction non-inclues dans l'affinement choisis aléatoirement.

BIBLIOGRAPHIE

1. International Human Genome Sequencing Consortium, *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
2. International Human Genome Sequencing Consortium, *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 931-45.
3. Marx, V., *Epigenetics: Reading the second genomic code*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 143-7.
4. Portela, A. and M. Esteller, *Epigenetic modifications and human disease*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1057-68.
5. Paweletz, N., *Walther Flemming: pioneer of mitosis research*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(1): p. 72-5.
6. Olins, D.E. and A.L. Olins, *Chromatin history: our view from the bridge*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(10): p. 809-14.
7. Kornberg, R.D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science, 1974. **184**(4139): p. 868-71.
8. Kornberg, R.D. and J.O. Thomas, *Chromatin structure; oligomers of the histones*. Science, 1974. **184**(4139): p. 865-8.
9. Olins, A.L. and D.E. Olins, *Spheroid chromatin units (v bodies)*. Science, 1974. **183**(4122): p. 330-2.
10. Luger, K., A.W. Mader, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond, *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
11. Davey, C.A., D.F. Sargent, K. Luger, A.W. Maeder, and T.J. Richmond, *Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution*. J Mol Biol, 2002. **319**(5): p. 1097-113.
12. Zhou, Y.B., S.E. Gerchman, V. Ramakrishnan, A. Travers, and S. Muyltermans, *Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome*. Nature, 1998. **395**(6700): p. 402-5.
13. Sivolob, A. and A. Prunell, *Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs*. J Mol Biol, 2003. **331**(5): p. 1025-40.
14. Marsden, M.P. and U.K. Laemmli, *Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model*. Cell, 1979. **17**(4): p. 849-58.
15. Thoma, F., T. Koller, and A. Klug, *Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin*. J Cell Biol, 1979. **83**(2 Pt 1): p. 403-27.
16. Robinson, P.J., L. Fairall, V.A. Huynh, and D. Rhodes, *EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(17): p. 6506-11.
17. Razin, A. and H. Cedar, *Distribution of 5-methylcytosine in chromatin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(7): p. 2725-8.
18. Solage, A. and H. Cedar, *Organization of 5-methylcytosine in chromosomal DNA*. Biochemistry, 1978. **17**(14): p. 2934-8.
19. Keshet, I., J. Lieman-Hurwitz, and H. Cedar, *DNA methylation affects the formation of active chromatin*. Cell, 1986. **44**(4): p. 535-43.
20. Ball, D.J., D.S. Gross, and W.T. Garrard, *5-methylcytosine is localized in nucleosomes that contain histone H1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983. **80**(18): p. 5490-4.
21. Hebbes, T.R., A.W. Thorne, and C. Crane-Robinson, *A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin*. The EMBO journal, 1988. **7**(5): p. 1395-402.
22. Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky, *Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1964. **51**: p. 786-94.
23. Riggs, A.D., *X inactivation, differentiation, and DNA methylation*. Cytogenetics and cell genetics, 1975. **14**(1): p. 9-25.
24. Holliday, R. and J.E. Pugh, *DNA modification mechanisms and gene activity during development*. Science, 1975. **187**(4173): p. 226-32.
25. McGhee, J.D. and G.D. Ginder, *Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken beta-globin genes*. Nature, 1979. **280**(5721): p. 419-20.
26. Mandel, J.L. and P. Chambon, *DNA methylation: organ specific variations in the methylation pattern within and around ovalbumin and other chicken genes*. Nucleic acids research, 1979. **7**(8): p. 2081-103.
27. van der Ploeg, L.H. and R.A. Flavell, *DNA methylation in the human gamma delta beta-globin locus in erythroid and nonerythroid tissues*. Cell, 1980. **19**(4): p. 947-58.
28. Buschhausen, G., B. Wittig, M. Graessmann, and A. Graessmann, *Chromatin structure is required to block transcription of the methylated herpes simplex virus thymidine kinase gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**(5): p. 1177-81.
29. Hashimshony, T., J. Zhang, I. Keshet, M. Bustin, and H. Cedar, *The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development*. Nature genetics, 2003. **34**(2): p. 187-92.
30. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
31. Antequera, F., D. Macleod, and A.P. Bird, *Specific protection of methylated CpGs in mammalian nuclei*. Cell, 1989. **58**(3): p. 509-17.

32. Venolia, L., S.M. Gartler, E.R. Wassman, P. Yen, T. Mohandas, and L.J. Shapiro, *Transformation with DNA from 5-azacytidine-reactivated X chromosomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1982. **79**(7): p. 2352-4.
33. Busslinger, M., J. Hurst, and R.A. Flavell, *DNA methylation and the regulation of globin gene expression*. Cell, 1983. **34**(1): p. 197-206.
34. Murray, E.J. and F. Grosveld, *Site specific demethylation in the promoter of human gamma-globin gene does not alleviate methylation mediated suppression*. The EMBO journal, 1987. **6**(8): p. 2329-35.
35. Grant, S.G. and V.M. Chapman, *Mechanisms of X-chromosome regulation*. Annual review of genetics, 1988. **22**: p. 199-233.
36. Moarefi, A.H. and F. Chedin, *ICF syndrome mutations cause a broad spectrum of biochemical defects in DNMT3B-mediated de novo DNA methylation*. Journal of molecular biology, 2011. **409**(5): p. 758-72.
37. Popp, C., W. Dean, S. Feng, S.J. Cokus, S. Andrews, M. Pellegrini, S.E. Jacobsen, and W. Reik, *Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency*. Nature, 2010. **463**(7284): p. 1101-5.
38. Bhutani, N., J.J. Brady, M. Damian, A. Sacco, S.Y. Corbel, and H.M. Blau, *Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation*. Nature, 2010. **463**(7284): p. 1042-7.
39. Jurkowska, R.Z., T.P. Jurkowski, and A. Jeltsch, *Structure and function of mammalian DNA methyltransferases*. ChemBiochem : a European journal of chemical biology, 2011. **12**(2): p. 206-22.
40. Malygin, E.G. and S. Hattman, *DNA methyltransferases: mechanistic models derived from kinetic analysis*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2012. **47**(2): p. 97-193.
41. Meehan, R.R., J.D. Lewis, S. McKay, E.L. Kleiner, and A.P. Bird, *Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs*. Cell, 1989. **58**(3): p. 499-507.
42. Boyes, J. and A. Bird, *DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1123-34.
43. Wade, P.A. and A.P. Wolffe, *ReCoGnizing methylated DNA*. Nature structural biology, 2001. **8**(7): p. 575-7.
44. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell research, 2011. **21**(3): p. 381-95.
45. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
46. Cosgrove, M.S., J.D. Boeke, and C. Wolberger, *Regulated nucleosome mobility and the histone code*. Nature structural & molecular biology, 2004. **11**(11): p. 1037-43.
47. Cosgrove, M.S., *Histone proteomics and the epigenetic regulation of nucleosome mobility*. Expert review of proteomics, 2007. **4**(4): p. 465-78.
48. Bedford, M.T. and S. Richard, *Arginine methylation an emerging regulator of protein function*. Molecular cell, 2005. **18**(3): p. 263-72.
49. Pahlich, S., R.P. Zakaryan, and H. Gehring, *Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis*. Biochimica et biophysica acta, 2006. **1764**(12): p. 1890-903.
50. Bedford, M.T. and S.G. Clarke, *Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why*. Molecular cell, 2009. **33**(1): p. 1-13.
51. Yu, M.C., *The Role of Protein Arginine Methylation in mRNP Dynamics*. Molecular biology international, 2011. **2011**: p. 163827.
52. Herrmann, F., P. Pably, C. Eckerich, M.T. Bedford, and F.O. Fackelmayer, *Human protein arginine methyltransferases in vivo--distinct properties of eight canonical members of the PRMT family*. Journal of cell science, 2009. **122**(Pt 5): p. 667-77.
53. Wang, Y.C. and C. Li, *Evolutionarily conserved protein arginine methyltransferases in non-mammalian animal systems*. The FEBS journal, 2012.
54. Lin, W.J., J.D. Gary, M.C. Yang, S. Clarke, and H.R. Herschman, *The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(25): p. 15034-44.
55. Tang, J., A. Frankel, R.J. Cook, S. Kim, W.K. Paik, K.R. Williams, S. Clarke, and H.R. Herschman, *PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(11): p. 7723-30.
56. Herrmann, F., J. Lee, M.T. Bedford, and F.O. Fackelmayer, *Dynamics of human protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in vivo*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(45): p. 38005-10.
57. Wooderchak, W.L., T. Zang, Z.S. Zhou, M. Acuna, S.M. Tahara, and J.M. Hevel, *Substrate profiling of PRMT1 reveals amino acid sequences that extend beyond the "RGG" paradigm*. Biochemistry, 2008. **47**(36): p. 9456-66.
58. Strahl, B.D., S.D. Briggs, C.J. Brame, J.A. Caldwell, S.S. Koh, H. Ma, R.G. Cook, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, M.R. Stallcup, and C.D. Allis, *Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1*. Current biology : CB, 2001. **11**(12): p. 996-1000.
59. Wang, H., Z.Q. Huang, L. Xia, Q. Feng, H. Erdjument-Bromage, B.D. Strahl, S.D. Briggs, C.D. Allis, J. Wong, P. Tempst, and Y. Zhang, *Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor*. Science, 2001. **293**(5531): p. 853-7.
60. Kwak, Y.T., J. Guo, S. Prajapati, K.J. Park, R.M. Surabhi, B. Miller, P. Gehrig, and R.B. Gaynor, *Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties*. Molecular cell, 2003. **11**(4): p. 1055-66.

61. Cote, J., F.M. Boisvert, M.C. Boulanger, M.T. Bedford, and S. Richard, *Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1*. *Molecular biology of the cell*, 2003. **14**(1): p. 274-87.
62. Rho, J., S. Choi, C.R. Jung, and D.S. Im, *Arginine methylation of Sam68 and SLM proteins negatively regulates their poly(U) RNA binding activity*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2007. **466**(1): p. 49-57.
63. Adams, M.M., B. Wang, Z. Xia, J.C. Morales, X. Lu, L.A. Donehower, D.A. Bochar, S.J. Elledge, and P.B. Carpenter, *53BP1 oligomerization is independent of its methylation by PRMT1*. *Cell cycle*, 2005. **4**(12): p. 1854-61.
64. Boisvert, F.M., U. Dery, J.Y. Masson, and S. Richard, *Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control*. *Genes & development*, 2005. **19**(6): p. 671-6.
65. Abramovich, C., B. Yakobson, J. Chebath, and M. Revel, *A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor*. *The EMBO journal*, 1997. **16**(2): p. 260-6.
66. Iwasaki, H. and T. Yada, *Protein arginine methylation regulates insulin signaling in L6 skeletal muscle cells*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007. **364**(4): p. 1015-21.
67. Boisvert, F.M., M.J. Hendzel, J.Y. Masson, and S. Richard, *Methylation of MRE11 regulates its nuclear compartmentalization*. *Cell cycle*, 2005. **4**(7): p. 981-9.
68. Qi, C., J. Chang, Y. Zhu, A.V. Yeldandi, S.M. Rao, and Y.J. Zhu, *Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor alpha*. *The Journal of biological chemistry*, 2002. **277**(32): p. 28624-30.
69. Meyer, R., S.S. Wolf, and M. Obendorf, *PRMT2, a member of the protein arginine methyltransferase family, is a coactivator of the androgen receptor*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2007. **107**(1-2): p. 1-14.
70. Blythe, S.A., S.W. Cha, E. Tadjuidje, J. Heasman, and P.S. Klein, *beta-Catenin primes organizer gene expression by recruiting a histone H3 arginine 8 methyltransferase, Prmt2*. *Developmental cell*, 2010. **19**(2): p. 220-31.
71. Scott, H.S., S.E. Antonarakis, M.D. Lalioti, C. Rossier, P.A. Silver, and M.F. Henry, *Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2)*. *Genomics*, 1998. **48**(3): p. 330-40.
72. Bachand, F., *Protein arginine methyltransferases: from unicellular eukaryotes to humans*. *Eukaryotic cell*, 2007. **6**(6): p. 889-98.
73. Tang, J., J.D. Gary, S. Clarke, and H.R. Herschman, *PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation*. *The Journal of biological chemistry*, 1998. **273**(27): p. 16935-45.
74. Chen, D., H. Ma, H. Hong, S.S. Koh, S.M. Huang, B.T. Schurter, D.W. Aswad, and M.R. Stallcup, *Regulation of transcription by a protein methyltransferase*. *Science*, 1999. **284**(5423): p. 2174-7.
75. Metivier, R., G. Penot, M.R. Hubner, G. Reid, H. Brand, M. Kos, and F. Gannon, *Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter*. *Cell*, 2003. **115**(6): p. 751-63.
76. Zhang, Z., P.E. Burch, A.J. Cooney, R.B. Lanz, F.A. Pereira, J. Wu, R.A. Gibbs, G. Weinstock, and D.A. Wheeler, *Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome*. *Genome research*, 2004. **14**(4): p. 580-90.
77. Tsai, M.J. and B.W. O'Malley, *Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members*. *Annual review of biochemistry*, 1994. **63**: p. 451-86.
78. Lonard, D.M. and W. O'Malley B, *Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation*. *Molecular cell*, 2007. **27**(5): p. 691-700.
79. Xu, J. and B.W. O'Malley, *Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function*. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 2002. **3**(3): p. 185-92.
80. Dilworth, F.J. and P. Chambon, *Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription*. *Oncogene*, 2001. **20**(24): p. 3047-54.
81. Daujat, S., U.M. Bauer, V. Shah, B. Turner, S. Berger, and T. Kouzarides, *Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3*. *Current biology : CB*, 2002. **12**(24): p. 2090-7.
82. Lee, D.Y., C. Teyssier, B.D. Strahl, and M.R. Stallcup, *Role of protein methylation in regulation of transcription*. *Endocrine reviews*, 2005. **26**(2): p. 147-70.
83. Johnson, A.B. and B.W. O'Malley, *Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy*. *Molecular and cellular endocrinology*, 2012. **348**(2): p. 430-9.
84. Belandia, B., R.L. Orford, H.C. Hurst, and M.G. Parker, *Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes*. *The EMBO journal*, 2002. **21**(15): p. 4094-103.
85. Schurter, B.T., S.S. Koh, D. Chen, G.J. Bunick, J.M. Harp, B.L. Hanson, A. Henschen-Edman, D.R. Mackay, M.R. Stallcup, and D.W. Aswad, *Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1*. *Biochemistry*, 2001. **40**(19): p. 5747-56.
86. Xu, W., H. Chen, K. Du, H. Asahara, M. Tini, B.M. Emerson, M. Montminy, and R.M. Evans, *A transcriptional switch mediated by cofactor methylation*. *Science*, 2001. **294**(5551): p. 2507-11.
87. Chevillard-Briet, M., D. Trouche, and L. Vandel, *Control of CBP co-activating activity by arginine methylation*. *The EMBO journal*, 2002. **21**(20): p. 5457-66.

88. Lee, Y.H., M.T. Bedford, and M.R. Stallcup, *Regulated recruitment of tumor suppressor BRCA1 to the p21 gene by coactivator methylation*. *Genes & development*, 2011. **25**(2): p. 176-88.
89. Feng, Q., P. Yi, J. Wong, and B.W. O'Malley, *Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly*. *Molecular and cellular biology*, 2006. **26**(21): p. 7846-57.
90. Sims, R.J., 3rd, L.A. Rojas, D. Beck, R. Bonasio, R. Schuller, W.J. Drury, 3rd, D. Eick, and D. Reinberg, *The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation*. *Science*, 2011. **332**(6025): p. 99-103.
91. Fujiwara, T., Y. Mori, D.L. Chu, Y. Koyama, S. Miyata, H. Tanaka, K. Yachi, T. Kubo, H. Yoshikawa, and M. Tohyama, *CARM1 regulates proliferation of PC12 cells by methylating HuD*. *Molecular and cellular biology*, 2006. **26**(6): p. 2273-85.
92. Li, H., S. Park, B. Kilburn, M.A. Jelinek, A. Henschel-Edman, D.W. Aswad, M.R. Stallcup, and I.A. Laird-Offringa, *Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase*. *The Journal of biological chemistry*, 2002. **277**(47): p. 44623-30.
93. Cheng, D., J. Cote, S. Shaaban, and M.T. Bedford, *The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing*. *Molecular cell*, 2007. **25**(1): p. 71-83.
94. Lee, J. and M.T. Bedford, *PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays*. *EMBO reports*, 2002. **3**(3): p. 268-73.
95. Kim, J., J. Lee, N. Yadav, Q. Wu, C. Carter, S. Richard, E. Richie, and M.T. Bedford, *Loss of CARM1 results in hypomethylation of thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein and deregulated early T cell development*. *The Journal of biological chemistry*, 2004. **279**(24): p. 25339-44.
96. Frankel, A., N. Yadav, J. Lee, T.L. Branscombe, S. Clarke, and M.T. Bedford, *The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity*. *The Journal of biological chemistry*, 2002. **277**(5): p. 3537-43.
97. Hyllus, D., C. Stein, K. Schnabel, E. Schiltz, A. Imhof, Y. Dou, J. Hsieh, and U.M. Bauer, *PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation*. *Genes & development*, 2007. **21**(24): p. 3369-80.
98. Iberg, A.N., A. Espejo, D. Cheng, D. Kim, J. Michaud-Levesque, S. Richard, and M.T. Bedford, *Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector binding*. *The Journal of biological chemistry*, 2008. **283**(6): p. 3006-10.
99. Waldmann, T., A. Izzo, K. Kamieniarz, F. Richter, C. Vogler, B. Sarg, H. Lindner, N.L. Young, G. Mittler, B.A. Garcia, and R. Schneider, *Methylation of H2AR29 is a novel repressive PRMT6 target*. *Epigenetics & chromatin*, 2011. **4**: p. 11.
100. El-Andaloussi, N., T. Valovka, M. Toueille, R. Steinacher, F. Focke, P. Gehrig, M. Covic, P.O. Hassa, P. Schar, U. Hubscher, and M.O. Hottiger, *Arginine methylation regulates DNA polymerase beta*. *Molecular cell*, 2006. **22**(1): p. 51-62.
101. Invernizzi, C.F., B. Xie, S. Richard, and M.A. Wainberg, *PRMT6 diminishes HIV-1 Rev binding to and export of viral RNA*. *Retrovirology*, 2006. **3**: p. 93.
102. Invernizzi, C.F., B. Xie, F.A. Frankel, M. Feldhammer, B.B. Roy, S. Richard, and M.A. Wainberg, *Arginine methylation of the HIV-1 nucleocapsid protein results in its diminished function*. *AIDS*, 2007. **21**(7): p. 795-805.
103. Xie, B., C.F. Invernizzi, S. Richard, and M.A. Wainberg, *Arginine methylation of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by PRMT6 negatively affects Tat Interactions with both cyclin T1 and the Tat transactivation region*. *Journal of virology*, 2007. **81**(8): p. 4226-34.
104. Lee, J., J. Sayegh, J. Daniel, S. Clarke, and M.T. Bedford, *PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family*. *The Journal of biological chemistry*, 2005. **280**(38): p. 32890-6.
105. Sayegh, J., K. Webb, D. Cheng, M.T. Bedford, and S.G. Clarke, *Regulation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) activity by its N-terminal domain*. *The Journal of biological chemistry*, 2007. **282**(50): p. 36444-53.
106. Niu, L., F. Lu, Y. Pei, C. Liu, and X. Cao, *Regulation of flowering time by the protein arginine methyltransferase AtPRMT10*. *EMBO reports*, 2007. **8**(12): p. 1190-5.
107. Pollack, B.P., S.V. Kotenko, W. He, L.S. Izotova, B.L. Barnoski, and S. Pestka, *The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity*. *The Journal of biological chemistry*, 1999. **274**(44): p. 31531-42.
108. Branscombe, T.L., A. Frankel, J.H. Lee, J.R. Cook, Z. Yang, S. Pestka, and S. Clarke, *PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins*. *The Journal of biological chemistry*, 2001. **276**(35): p. 32971-6.
109. Rho, J., S. Choi, Y.R. Seong, W.K. Cho, S.H. Kim, and D.S. Im, *Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family*. *The Journal of biological chemistry*, 2001. **276**(14): p. 11393-401.
110. Friesen, W.J., A. Wyce, S. Paushkin, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss, *A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins*. *The Journal of biological chemistry*, 2002. **277**(10): p. 8243-7.
111. Liu, F., X. Zhao, F. Perna, L. Wang, P. Koppikar, O. Abdel-Wahab, M.W. Harr, R.L. Levine, H. Xu, A. Tefferi, A. DeBlasio, M. Hatlen, S. Menendez, and S.D. Nimer, *JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5*

- downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer cell*, 2011. **19**(2): p. 283-94.
112. Friesen, W.J., S. Paushkin, A. Wyce, S. Massenet, G.S. Pesiridis, G. Van Duyne, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss, *The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins*. *Molecular and cellular biology*, 2001. **21**(24): p. 8289-300.
113. Friesen, W.J., S. Massenet, S. Paushkin, A. Wyce, and G. Dreyfuss, *SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets*. *Molecular cell*, 2001. **7**(5): p. 1111-7.
114. Meister, G. and U. Fischer, *Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs*. *The EMBO journal*, 2002. **21**(21): p. 5853-63.
115. Guderian, G., C. Peter, J. Wiesner, A. Sickmann, K. Schulze-Osthoff, U. Fischer, and M. Grimmer, *RioK1, a new interactor of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5), competes with pICln for binding and modulates PRMT5 complex composition and substrate specificity*. *The Journal of biological chemistry*, 2011. **286**(3): p. 1976-86.
116. Raman, B., C. Guarnaccia, K. Nadassy, S. Zakhariyev, A. Pintar, F. Zanuttin, D. Frigyes, C. Acatrinei, A. Vindigni, G. Pongor, and S. Pongor, *N(omega)-arginine dimethylation modulates the interaction between a Gly/Arg-rich peptide from human nucleolin and nucleic acids*. *Nucleic acids research*, 2001. **29**(16): p. 3377-84.
117. Wilczek, C., R. Chitta, E. Woo, J. Shabanowitz, B.T. Chait, D.F. Hunt, and D. Shechter, *Protein arginine methyltransferase Prmt5-Mep50 methylates histones H2A and H4 and the histone chaperone nucleoplasmin in Xenopus laevis eggs*. *The Journal of biological chemistry*, 2011. **286**(49): p. 42221-31.
118. Fabbrizio, E., S. El Messaoudi, J. Polanowska, C. Paul, J.R. Cook, J.H. Lee, V. Negre, M. Rousset, S. Pestka, A. Le Cam, and C. Sardet, *Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5*. *EMBO reports*, 2002. **3**(7): p. 641-5.
119. Pal, S., R. Yun, A. Datta, L. Lacomis, H. Erdjument-Bromage, J. Kumar, P. Tempst, and S. Sif, *mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad*. *Molecular and cellular biology*, 2003. **23**(21): p. 7475-87.
120. Pal, S., S.N. Vishwanath, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S. Sif, *Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes*. *Molecular and cellular biology*, 2004. **24**(21): p. 9630-45.
121. Lacroix, M., S. El Messaoudi, G. Rodier, A. Le Cam, C. Sardet, and E. Fabbrizio, *The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5*. *EMBO reports*, 2008. **9**(5): p. 452-8.
122. Zhao, Q., G. Rank, Y.T. Tan, H. Li, R.L. Moritz, R.J. Simpson, L. Cerruti, D.J. Curtis, D.J. Patel, C.D. Allis, J.M. Cunningham, and S.M. Jane, *PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing*. *Nature structural & molecular biology*, 2009. **16**(3): p. 304-11.
123. Tan, C.P. and S. Nakielnny, *Control of the DNA methylation system component MBD2 by protein arginine methylation*. *Molecular and cellular biology*, 2006. **26**(19): p. 7224-35.
124. Bandyopadhyay, S., D.P. Harris, G.N. Adams, G.E. Lause, A. McHugh, E.G. Tillmaand, A. Money, B. Willard, P.L. Fox, and P.E. Dicoletto, *HOXA9 methylation by PRMT5 is essential for endothelial cell expression of leukocyte adhesion molecules*. *Molecular and cellular biology*, 2012. **32**(7): p. 1202-13.
125. Kirino, Y., N. Kim, M. de Planell-Saguer, E. Khandros, S. Chiorean, P.S. Klein, I. Rigoutsos, T.A. Jongens, and Z. Mourelatos, *Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability*. *Nature cell biology*, 2009. **11**(5): p. 652-8.
126. Reuter, M., S. Chuma, T. Tanaka, T. Franz, A. Stark, and R.S. Pillai, *Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile*. *Nature structural & molecular biology*, 2009. **16**(6): p. 639-46.
127. Vagin, V.V., J. Wohlschlegel, J. Qu, Z. Jonsson, X. Huang, S. Chuma, A. Girard, R. Sachidanandam, G.J. Hannon, and A.A. Aravin, *Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members*. *Genes & development*, 2009. **23**(15): p. 1749-62.
128. Gros, L., C. Delaporte, S. Frey, J. Decesse, B.R. de Saint-Vincent, L. Cavarec, A. Dubart, A.V. Gudkov, and A. Jacquemin-Sablon, *Identification of new drug sensitivity genes using genetic suppressor elements: protein arginine N-methyltransferase mediates cell sensitivity to DNA-damaging agents*. *Cancer research*, 2003. **63**(1): p. 164-71.
129. Miranda, T.B., M. Miranda, A. Frankel, and S. Clarke, *PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity*. *The Journal of biological chemistry*, 2004. **279**(22): p. 22902-7.
130. Zurita-Lopez, C.I., T. Sandberg, R. Kelly, and S.G. Clarke, *Human protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7) is a type III enzyme forming omega-NG-monomethylated arginine residues*. *The Journal of biological chemistry*, 2012. **287**(11): p. 7859-70.
131. Miranda, T.B., P. Khusial, J.R. Cook, J.H. Lee, S.I. Gunderson, S. Pestka, G.W. Zieve, and S. Clarke, *Spliceosome Sm proteins D1, D3, and B/B' are asymmetrically dimethylated at arginine residues in the nucleus*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004. **323**(2): p. 382-7.
132. Gonsalvez, G.B., L. Tian, J.K. Ospina, F.M. Boisvert, A.I. Lamond, and A.G. Matera, *Two distinct arginine methyltransferases are required for biogenesis of Sm-class ribonucleoproteins*. *The Journal of cell biology*, 2007. **178**(5): p. 733-40.

133. Lee, J.H., J.R. Cook, Z.H. Yang, O. Mirochnitchenko, S.I. Gunderson, A.M. Felix, N. Herth, R. Hoffmann, and S. Pestka, *PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(5): p. 3656-64.
134. Jelinic, P., J.C. Stehle, and P. Shaw, *The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation*. PLoS biology, 2006. **4**(11): p. e355.
135. Buhr, N., C. Carapito, C. Schaeffer, E. Kieffer, A. Van Dorsselaer, and S. Viville, *Nuclear proteome analysis of undifferentiated mouse embryonic stem and germ cells*. Electrophoresis, 2008. **29**(11): p. 2381-90.
136. Zheng, Z., K.M. Schmidt-Ott, S. Chua, K.A. Foster, R.Z. Frankel, P. Pavlidis, J. Barasch, V.D. D'Agati, and A.G. Gharavi, *A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(7): p. 2502-7.
137. Bleibel, W.K., S. Duan, R.S. Huang, E.O. Kistner, S.J. Shukla, X. Wu, J.A. Badner, and M.E. Dolan, *Identification of genomic regions contributing to etoposide-induced cytotoxicity*. Human genetics, 2009. **125**(2): p. 173-80.
138. Karkhanis, V., L. Wang, S. Tae, Y.J. Hu, A.N. Imbalzano, and S. Sif, *Protein arginine methyltransferase 7 regulates cellular response to DNA damage by methylating promoter histones H2A and H4 of the polymerase delta catalytic subunit gene, POLD1*. The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(35): p. 29801-14.
139. Migliori, V., J. Muller, S. Phalke, D. Low, M. Bezzi, W.C. Mok, S.K. Sahu, J. Gunaratne, P. Capasso, C. Bassi, V. Cecatiello, A. De Marco, W. Blackstock, V. Kuznetsov, B. Amati, M. Mapelli, and E. Guccione, *Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance*. Nature structural & molecular biology, 2012. **19**(2): p. 136-44.
140. Jung, G.A., B.S. Shin, Y.S. Jang, J.B. Sohn, S.R. Woo, J.E. Kim, G. Choi, K.M. Lee, B.H. Min, K.H. Lee, and G.H. Park, *Methylation of eukaryotic elongation factor 2 induced by basic fibroblast growth factor via mitogen-activated protein kinase*. Experimental & molecular medicine, 2011. **43**(10): p. 550-60.
141. Niewmierzycka, A. and S. Clarke, *S-Adenosylmethionine-dependent methylation in Saccharomyces cerevisiae. Identification of a novel protein arginine methyltransferase*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(2): p. 814-24.
142. McBride, A.E., C. Zurita-Lopez, A. Regis, E. Blum, A. Conboy, S. Elf, and S. Clarke, *Protein arginine methylation in Candida albicans: role in nuclear transport*. Eukaryotic cell, 2007. **6**(7): p. 1119-29.
143. Olsson, I., J.M. Berrez, A. Leipus, C. Ostlund, and A. Mutvei, *The arginine methyltransferase Rmt2 is enriched in the nucleus and co-purifies with the nuclear porins Nup49, Nup57 and Nup100*. Experimental cell research, 2007. **313**(9): p. 1778-89.
144. Chern, M.K., K.N. Chang, L.F. Liu, T.C. Tam, Y.C. Liu, Y.L. Liang, and M.F. Tam, *Yeast ribosomal protein L12 is a substrate of protein-arginine methyltransferase 2*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(18): p. 15345-53.
145. Krause, C.D., Z.H. Yang, Y.S. Kim, J.H. Lee, J.R. Cook, and S. Pestka, *Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential*. Pharmacology & therapeutics, 2007. **113**(1): p. 50-87.
146. Bedford, M.T., *Arginine methylation at a glance*. Journal of cell science, 2007. **120**(Pt 24): p. 4243-6.
147. Blatch, G.L. and M. Lassle, *The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions*. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 1999. **21**(11): p. 932-9.
148. Cook, J.R., J.H. Lee, Z.H. Yang, C.D. Krause, N. Herth, R. Hoffmann, and S. Pestka, *FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **342**(2): p. 472-81.
149. Cardozo, T. and M. Pagano, *The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2004. **5**(9): p. 739-51.
150. Fielenbach, N., D. Guardavaccaro, K. Neubert, T. Chan, D. Li, Q. Feng, H. Hutter, M. Pagano, and A. Antebi, *DRE-1: an evolutionarily conserved F box protein that regulates C. elegans developmental age*. Developmental cell, 2007. **12**(3): p. 443-55.
151. Zhang, X. and X. Cheng, *Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides*. Structure, 2003. **11**(5): p. 509-20.
152. Zhang, X., L. Zhou, and X. Cheng, *Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3*. The EMBO journal, 2000. **19**(14): p. 3509-19.
153. Troffer-Charlier, N., V. Cura, P. Hassenboehler, D. Moras, and J. Cavarelli, *Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains*. The EMBO journal, 2007. **26**(20): p. 4391-401.
154. Troffer-Charlier, N., V. Cura, P. Hassenboehler, D. Moras, and J. Cavarelli, *Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic study of isolated modules of the mouse coactivator-associated arginine methyltransferase 1*. Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications, 2007. **63**(Pt 4): p. 330-3.
155. Sun, L., M. Wang, Z. Lv, N. Yang, Y. Liu, S. Bao, W. Gong, and R.M. Xu, *Structural insights into protein arginine symmetric dimethylation by PRMT5*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(51): p. 20538-43.
156. Antonyamy, S., Z. Bonday, R.M. Campbell, B. Doyle, Z. Druzina, T. Gheyi, B. Han, L.N. Jungheim, Y. Qian, C. Rauch, M. Russell, J.M. Sauder, S.R. Wasserman, K. Weichert, F.S. Willard, A. Zhang, and S. Emtage,

- Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(44): p. 17960-5.
157. Cheng, Y., M. Frazier, F. Lu, X. Cao, and M.R. Redinbo, *Crystal structure of the plant epigenetic protein arginine methyltransferase 10*. Journal of molecular biology, 2011. **414**(1): p. 106-22.
158. Rossmann, M.G., D. Moras, and K.W. Olsen, *Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein*. Nature, 1974. **250**(463): p. 194-9.
159. Hassenboehler, P., *Étude structurale et fonctionnelle de la protéine arginine méthyltransférase CARM1*, 2010, Université de Strasbourg.
160. Sack, J.S., S. Thieffine, T. Bandiera, M. Fasolini, G.J. Duke, L. Jayaraman, K.F. Kish, H.E. Klei, A.V. Purandare, P. Rosettani, S. Troiani, D. Xie, and J.A. Bertrand, *Structural basis for CARM1 inhibition by indole and pyrazole inhibitors*. The Biochemical journal, 2011. **436**(2): p. 331-9.
161. Ball, L.J., T. Jarchau, H. Oschkinat, and U. Walter, *EVH1 domains: structure, function and interactions*. FEBS letters, 2002. **513**(1): p. 45-52.
162. Cheng, X., R.E. Collins, and X. Zhang, *Structural and sequence motifs of protein (histone) methylation enzymes*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 2005. **34**: p. 267-94.
163. Frankel, A. and S. Clarke, *PRMT3 is a distinct member of the protein arginine N-methyltransferase family. Conferral of substrate specificity by a zinc-finger domain*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(42): p. 32974-82.
164. Cheng, X. and R.J. Roberts, *AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping*. Nucleic acids research, 2001. **29**(18): p. 3784-95.
165. Martin, J.L. and F.M. McMillan, *SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold*. Current opinion in structural biology, 2002. **12**(6): p. 783-93.
166. Schubert, H.L., R.M. Blumenthal, and X. Cheng, *Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence*. Trends in biochemical sciences, 2003. **28**(6): p. 329-35.
167. Upadhyay, A.K. and X. Cheng, *Dynamics of histone lysine methylation: structures of methyl writers and erasers*. Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques, 2011. **67**: p. 107-24.
168. Michel, G., V. Sauve, R. Larocque, Y. Li, A. Matte, and M. Cygler, *The structure of the RlmB 23S rRNA methyltransferase reveals a new methyltransferase fold with a unique knot*. Structure, 2002. **10**(10): p. 1303-15.
169. Nureki, O., M. Shirouzu, K. Hashimoto, R. Ishitani, T. Terada, M. Tamakoshi, T. Oshima, M. Chijimatsu, K. Takio, D.G. Vassilyev, T. Shibata, Y. Inoue, S. Kuramitsu, and S. Yokoyama, *An enzyme with a deep trefoil knot for the active-site architecture*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2002. **58**(Pt 7): p. 1129-37.
170. Cha, B. and E.H. Jho, *Protein arginine methyltransferases (PRMTs) as therapeutic targets*. Expert opinion on therapeutic targets, 2012. **16**(7): p. 651-64.
171. Seligson, D.B., S. Horvath, T. Shi, H. Yu, S. Tze, M. Grunstein, and S.K. Kurdistani, *Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence*. Nature, 2005. **435**(7046): p. 1262-6.
172. Mathioudaki, K., A. Papadokostopoulou, A. Scorilas, D. Xynopoulos, N. Agnanti, and M. Talieri, *The PRMT1 gene expression pattern in colon cancer*. British journal of cancer, 2008. **99**(12): p. 2094-9.
173. Yoshimatsu, M., G. Toyokawa, S. Hayami, M. Unoki, T. Tsunoda, H.I. Field, J.D. Kelly, D.E. Neal, Y. Maehara, B.A. Ponder, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, *Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2011. **128**(3): p. 562-73.
174. Le Romancer, M., I. Treilleux, N. Leconte, Y. Robin-Lespinasse, S. Sentis, K. Bouchekioua-Bouzaghrou, S. Goddard, S. Gobert-Gosse, and L. Corbo, *Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1*. Molecular cell, 2008. **31**(2): p. 212-21.
175. Cheung, N., L.C. Chan, A. Thompson, M.L. Cleary, and C.W. So, *Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis*. Nature cell biology, 2007. **9**(10): p. 1208-15.
176. Majumder, S., Y. Liu, O.H. Ford, 3rd, J.L. Mohler, and Y.E. Whang, *Involvement of arginine methyltransferase CARM1 in androgen receptor function and prostate cancer cell viability*. The Prostate, 2006. **66**(12): p. 1292-301.
177. Hong, H., C. Kao, M.H. Jeng, J.N. Eble, M.O. Koch, T.A. Gardner, S. Zhang, L. Li, C.X. Pan, Z. Hu, G.T. MacLennan, and L. Cheng, *Aberrant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status*. Cancer, 2004. **101**(1): p. 83-9.
178. El Messaoudi, S., E. Fabbriozio, C. Rodriguez, P. Chuchana, L. Fauquier, D. Cheng, C. Theillet, L. Vandell, M.T. Bedford, and C. Sardet, *Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(36): p. 13351-6.
179. Kim, Y.R., B.K. Lee, R.Y. Park, N.T. Nguyen, J.A. Bae, D.D. Kwon, and C. Jung, *Differential CARM1 expression in prostate and colorectal cancers*. BMC cancer, 2010. **10**: p. 197.
180. Frieze, S., M. Lupien, P.A. Silver, and M. Brown, *CARM1 regulates estrogen-stimulated breast cancer growth through up-regulation of E2F1*. Cancer research, 2008. **68**(1): p. 301-6.
181. Al-Dhaheri, M., J. Wu, G.P. Skliris, J. Li, K. Higashimoto, Y. Wang, K.P. White, P. Lambert, Y. Zhu, L. Murphy, and W. Xu, *CARM1 is an important determinant of ERalpha-dependent breast cancer cell differentiation and proliferation in breast cancer cells*. Cancer research, 2011. **71**(6): p. 2118-28.

182. Pal, S., R.A. Baiocchi, J.C. Byrd, M.R. Grever, S.T. Jacob, and S. Sif, *Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma*. The EMBO journal, 2007. **26**(15): p. 3558-69.
183. Deguchi, T. and J. Barchas, *Inhibition of transmethylations of biogenic amines by S-adenosylhomocysteine. Enhancement of transmethylation by adenosylhomocysteinase*. The Journal of biological chemistry, 1971. **246**(10): p. 3175-81.
184. Williams-Ashman, H.G., J. Seidenfeld, and P. Galletti, *Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine*. Biochemical pharmacology, 1982. **31**(3): p. 277-88.
185. Berry, D.R. and B.J. Abbott, *Incorporation of 14C-labeled compounds into sinefungin (A9145), a nucleoside antifungal antibiotic*. The Journal of antibiotics, 1978. **31**(3): p. 185-91.
186. Pugh, C.S., R.T. Borhardt, and H.O. Stone, *Sinefungin, a potent inhibitor of virion mRNA(guanine-7)-methyltransferase, mRNA(nucleoside-2'-)-methyltransferase, and viral multiplication*. The Journal of biological chemistry, 1978. **253**(12): p. 4075-7.
187. Cheng, D., N. Yadav, R.W. King, M.S. Swanson, E.J. Weinstein, and M.T. Bedford, *Small molecule regulators of protein arginine methyltransferases*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(23): p. 23892-9.
188. Cheng, D. and M.T. Bedford, *Xenoestrogens regulate the activity of arginine methyltransferases*. ChemBiochem : a European journal of chemical biology, 2011. **12**(2): p. 323-9.
189. Mai, A., S. Valente, D. Cheng, A. Perrone, R. Ragno, S. Simeoni, G. Sbardella, G. Brosch, A. Nebbioso, M. Conte, L. Altucci, and M.T. Bedford, *Synthesis and biological validation of novel synthetic histone/protein methyltransferase inhibitors*. ChemMedChem, 2007. **2**(7): p. 987-91.
190. Ragno, R., S. Simeoni, S. Castellano, C. Vicidomini, A. Mai, A. Caroli, A. Tramontano, C. Bonaccini, P. Trojer, I. Bauer, G. Brosch, and G. Sbardella, *Small molecule inhibitors of histone arginine methyltransferases: homology modeling, molecular docking, binding mode analysis, and biological evaluations*. Journal of medicinal chemistry, 2007. **50**(6): p. 1241-53.
191. Cheng, D., S. Valente, S. Castellano, G. Sbardella, R. Di Santo, R. Costi, M.T. Bedford, and A. Mai, *Novel 3,5-bis(bromohydroxybenzylidene)piperidin-4-ones as coactivator-associated arginine methyltransferase 1 inhibitors: enzyme selectivity and cellular activity*. Journal of medicinal chemistry, 2011. **54**(13): p. 4928-32.
192. Spannhoff, A., R. Heinke, I. Bauer, P. Trojer, E. Metzger, R. Gust, R. Schule, G. Brosch, W. Sippl, and M. Jung, *Target-based approach to inhibitors of histone arginine methyltransferases*. Journal of medicinal chemistry, 2007. **50**(10): p. 2319-25.
193. Heinke, R., A. Spannhoff, R. Meier, P. Trojer, I. Bauer, M. Jung, and W. Sippl, *Virtual screening and biological characterization of novel histone arginine methyltransferase PRMT1 inhibitors*. ChemMedChem, 2009. **4**(1): p. 69-77.
194. Bissinger, E.M., R. Heinke, A. Spannhoff, A. Eberlin, E. Metzger, V. Cura, P. Hassenboehler, J. Cavarelli, R. Schule, M.T. Bedford, W. Sippl, and M. Jung, *Acyl derivatives of p-aminosulfonamides and dapsone as new inhibitors of the arginine methyltransferase hPRMT1*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2011. **19**(12): p. 3717-31.
195. Purandare, A.V., Z. Chen, T. Huynh, S. Pang, J. Geng, W. Vaccaro, M.A. Poss, J. Oconnell, K. Nowak, and L. Jayaraman, *Pyrazole inhibitors of coactivator associated arginine methyltransferase 1 (CARM1)*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2008. **18**(15): p. 4438-41.
196. Huynh, T., Z. Chen, S. Pang, J. Geng, T. Bandiera, S. Bindi, P. Vianello, F. Roletto, S. Thieffine, A. Galvani, W. Vaccaro, M.A. Poss, G.L. Trainor, M.V. Lorenzi, M. Gottardis, L. Jayaraman, and A.V. Purandare, *Optimization of pyrazole inhibitors of Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1 (CARM1)*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2009. **19**(11): p. 2924-7.
197. Allan, M., S. Manku, E. Therrien, N. Nguyen, S. Styhler, M.F. Robert, A.C. Goulet, A.J. Petschner, G. Rahil, A. Robert Macleod, R. Deziel, J.M. Besterman, H. Nguyen, and A. Wahhab, *N-Benzyl-1-heteroaryl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamides as inhibitors of co-activator associated arginine methyltransferase 1 (CARM1)*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2009. **19**(4): p. 1218-23.
198. Therrien, E., G. Larouche, S. Manku, M. Allan, N. Nguyen, S. Styhler, M.F. Robert, A.C. Goulet, J.M. Besterman, H. Nguyen, and A. Wahhab, *1,2-Diamines as inhibitors of co-activator associated arginine methyltransferase 1 (CARM1)*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2009. **19**(23): p. 6725-32.
199. Wan, H., T. Huynh, S. Pang, J. Geng, W. Vaccaro, M.A. Poss, G.L. Trainor, M.V. Lorenzi, M. Gottardis, L. Jayaraman, and A.V. Purandare, *Benzo[d]imidazole inhibitors of Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1 (CARM1)--Hit to Lead studies*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2009. **19**(17): p. 5063-6.
200. Dowden, J., W. Hong, R.V. Parry, R.A. Pike, and S.G. Ward, *Toward the development of potent and selective bisubstrate inhibitors of protein arginine methyltransferases*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2010. **20**(7): p. 2103-5.
201. Dowden, J., R.A. Pike, R.V. Parry, W. Hong, U.A. Muhsen, and S.G. Ward, *Small molecule inhibitors that discriminate between protein arginine N-methyltransferases PRMT1 and CARM1*. Organic & biomolecular chemistry, 2011. **9**(22): p. 7814-21.
202. Busso, D., B. Delagoutte-Busso, and D. Moras, *Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in Escherichia coli*. Analytical biochemistry, 2005. **343**(2): p. 313-21.
203. Diebold, M.L., S. Fribourg, M. Koch, T. Metzger, and C. Romier, *Deciphering correct strategies for multiprotein complex assembly by co-expression: application to complexes as large as the histone octamer*. Journal of structural biology, 2011. **175**(2): p. 178-88.

204. Pantoliano, M.W., E.C. Petrella, J.D. Kwasnoski, V.S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B.A. Springer, P. Lane, and F.R. Salemme, *High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery*. Journal of Biomolecular Screening, 2001. **6**(6): p. 429-440.
205. Steinberg, T.H., L.J. Jones, R.P. Haugland, and V.L. Singer, *SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein*. Analytical biochemistry, 1996. **239**(2): p. 223-37.
206. Jablonski, A., *On the Notion of Emission Anisotropy*. Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. sci. math. astr. phys., 1960. **8**: p. 259-264.
207. Eftink, M.R., *The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins*. Biophysical journal, 1994. **66**(2 Pt 1): p. 482-501.
208. Malencik, D.A. and S.R. Anderson, *Peptide binding by calmodulin and its proteolytic fragments and by troponin C*. Biochemistry, 1984. **23**(11): p. 2420-8.
209. Magde, D., E. Elson, and W.W. Webb, *Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System, Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Physical Review Letters, 1972. **29**(11): p. 705-708.
210. Elson, E.L. and D. Magde, *Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory*. Biopolymers, 1974. **13**(1): p. 1-27.
211. Magde, D., E.L. Elson, and W.W. Webb, *Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization*. Biopolymers, 1974. **13**(1): p. 29-61.
212. Aragon, S.R. and R. Pecora, *Fluorescence Correlation Spectroscopy and Brownian Rotational Diffusion*. Biopolymers, 1975. **14**(1): p. 119-137.
213. Rigler, R. and E. Elson, *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications*. Springer Series in Chemical Physics. Vol. 65. 2001, New York: Springer.
214. Azoulay, J., J.P. Clamme, J.L. Darlix, B.P. Roques, and Y. Mely, *Destabilization of the HIV-1 complementary sequence of TAR by the nucleocapsid protein through activation of conformational fluctuations*. Journal of molecular biology, 2003. **326**(3): p. 691-700.
215. Clamme, J.P., J. Azoulay, and Y. Mely, *Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy*. Biophysical journal, 2003. **84**(3): p. 1960-8.
216. Rios, C.D., B.A. Jordan, I. Gomes, and L.A. Devi, *G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function*. Pharmacology & therapeutics, 2001. **92**(2-3): p. 71-87.
217. Kim, S.A., K.G. Heinze, and P. Schwille, *Fluorescence correlation spectroscopy in living cells*. Nature methods, 2007. **4**(11): p. 963-73.
218. Didier, P., J. Godet, and Y. Mely, *Two-photon two-focus fluorescence correlation spectroscopy with a tunable distance between the excitation volumes*. Journal of fluorescence, 2009. **19**(3): p. 561-5.
219. Beechem, J., E. Gratton, M. Ameloot, J. Knutson, and L. DBrand, *The global analysis of fluorescence intensity and anisotropy decay data: second-generation theory and programs*, in *Topics in fluorescence spectroscopy*, J. Lakowicz, Editor 1991, Plenum Press: New York. p. 241-306.
220. Team, R.C., *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, 2012, R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
221. Otwinowski, Z. and W. Minor, *Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode*. Macromolecular Crystallography, Pt A, 1997. **276**: p. 307-326.
222. Kabsch, W., *Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2010. **66**(Pt 2): p. 133-44.
223. *The CCP4 suite: programs for protein crystallography*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 1994. **50**(Pt 5): p. 760-3.
224. Adams, P.D., P.V. Afonine, G. Bunkoczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, and P.H. Zwart, *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2010. **66**(Pt 2): p. 213-21.
225. Murshudov, G.N., A.A. Vagin, and E.J. Dodson, *Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 1997. **53**(Pt 3): p. 240-55.
226. Bricogne, G., E. Blanc, M. Brandl, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, P. Roversi, A. Sharff, O.S. Smart, C. Vonrhein, and T.O. Womack, *BUSTER version 2.10.0*, 2011, Global Phasing Ltd.: Cambridge, United Kingdom.
227. Read, R.J., *Improved Fourier Coefficients for Maps Using Phases from Partial Structures with Errors*. Acta Crystallographica Section A, 1986. **42**: p. 140-149.
228. Fonlupt, P., C. Rey, and H. Pacheco, *SAH analogs, modified in the aminoacid region, inhibitors of phosphatidyl-ethanolamine methylase activity and 3H-SAH binding to rat brain membranes*. Life sciences, 1982. **31**(7): p. 655-9.
229. Chang, C.D. and J.K. Coward, *Analogues of S-Adenosylhomocysteine as Potential Inhibitors of Biological Transmethylation - Synthesis of Analogues with Modifications at 5'-Thioether Linkage*. Journal of Medicinal Chemistry, 1976. **19**(5): p. 684-691.
230. Tehlivets, O., N. Malanovic, M. Visram, T. Paykov-Keller, and W. Keller, *S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and methylation disorders: Yeast as a model system*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, 2013. **1832**(1): p. 204-215.
231. Grasberger, B.L., T.B. Lu, C. Schubert, D.J. Parks, T.E. Carver, H.K. Koblish, M.D. Cummings, L.V. LaFrance, K.L. Milkiewicz, R.R. Calvo, D. Maguire, J. Lattanze, C.F. Franks, S.Y. Zhao, K. Ramachandren, G.R. Bylebyl, M. Zhang, C.L. Manthey, E.C. Petrella, M.W. Pantoliano, I.C. Deckman, J.C. Spurlino, A.C. Maroney, B.E.

- Tomczuk, C.J. Molloy, and R.F. Bone, *Discovery and cocrystal structure of benzodiazepinedione HDM2 antagonists that activate p53 in cells*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005. **48**(4): p. 909-912.
232. Mock, W.L., T.A. Irra, J.P. Wepsiec, and T.L. Manimaran, *Cycloaddition Induced by Cucurbituril - a Case of Pauling Principle Catalysis*. *Journal of Organic Chemistry*, 1983. **48**(20): p. 3619-3620.
233. Mock, W.L., T.A. Irra, J.P. Wepsiec, and M. Adhya, *Catalysis by Curcubituril - the Significance of Bound-Substrate Destabilization for Induced Triazole Formation*. *Journal of Organic Chemistry*, 1989. **54**(22): p. 5302-5308.
234. Lewis, W.G., L.G. Green, F. Grynszpan, Z. Radić, P.R. Carlier, P. Taylor, M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2002. **41**(6): p. 1053-1057.
235. Bourne, Y., H.C. Kolb, Z. Radic, K.B. Sharpless, P. Taylor, and P. Marchot, *Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(6): p. 1449-54.
236. Whiting, M., J. Muldoon, Y.C. Lin, S.M. Silverman, W. Lindstrom, A.J. Olson, H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, J.H. Elder, and V.V. Fokin, *Inhibitors of HIV-1 protease by using in situ click chemistry*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006. **45**(9): p. 1435-1439.
237. Gui, S., W.L. Wooderchak-Donahue, T. Zang, D. Chen, M.P. Daly, Z.S. Zhou, and J.M. Hevel, *Substrate-induced control of product formation by protein arginine methyltransferase 1*. *Biochemistry*, 2013. **52**(1): p. 199-209.
238. Carascossa, S., P. Dudek, B. Cenni, P.A. Briand, and D. Picard, *CARM1 mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP*. *Genes & development*, 2010. **24**(7): p. 708-19.
239. Obiany, O., T.C. Osborne, and P.R. Thompson, *Kinetic mechanism of protein arginine methyltransferase 1*. *Biochemistry*, 2008. **47**(39): p. 10420-7.
240. Lakowski, T.M. and A. Frankel, *A kinetic study of human protein arginine N-methyltransferase 6 reveals a distributive mechanism*. *The Journal of biological chemistry*, 2008. **283**(15): p. 10015-25.
241. Feng, Y., N. Xie, M. Jin, M.R. Stahley, J.T. Stivers, and Y.G. Zheng, *A transient kinetic analysis of PRMT1 catalysis*. *Biochemistry*, 2011. **50**(32): p. 7033-44.
242. Lee, Y.H., S.S. Koh, X. Zhang, X. Cheng, and M.R. Stallcup, *Synergy among nuclear receptor coactivators: selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities*. *Molecular and cellular biology*, 2002. **22**(11): p. 3621-32.
243. Komoto, J., T. Yamada, Y. Takata, K. Konishi, H. Ogawa, T. Gomi, M. Fujioka, and F. Takusagawa, *Catalytic mechanism of guanidinoacetate methyltransferase: crystal structures of guanidinoacetate methyltransferase ternary complexes*. *Biochemistry*, 2004. **43**(45): p. 14385-94.
244. Velichkova, P. and F. Himmo, *Theoretical study of the methyl transfer in guanidinoacetate methyltransferase*. *The journal of physical chemistry. B*, 2006. **110**(1): p. 16-9.
245. Zhang, X. and T.C. Bruice, *Reaction mechanism of guanidinoacetate methyltransferase, concerted or step-wise*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(44): p. 16141-6.
246. Pei, Y., L. Niu, F. Lu, C. Liu, J. Zhai, X. Kong, and X. Cao, *Mutations in the Type II protein arginine methyltransferase AtPRMT5 result in pleiotropic developmental defects in Arabidopsis*. *Plant physiology*, 2007. **144**(4): p. 1913-23.
247. Emsley, P., B. Lohkamp, W.G. Scott, and K. Cowtan, *Features and development of Coot*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 2010. **66**(Pt 4): p. 486-501.
248. Romier, C., M. Ben Jelloul, S. Albeck, G. Buchwald, D. Busso, P.H. Celie, E. Christodoulou, V. De Marco, S. van Gerwen, P. Knipscheer, J.H. Lebbink, V. Notenboom, A. Poterszman, N. Rochel, S.X. Cohen, T. Unger, J.L. Sussman, D. Moras, T.K. Sixma, and A. Perrakis, *Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 2006. **62**(Pt 10): p. 1232-42.
249. Vonrhein, C., C. Flensburg, P. Keller, A. Sharff, O. Smart, W. Paciorek, T. Womack, and G. Bricogne, *Data processing and analysis with the autoPROC toolbox*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 2011. **67**(Pt 4): p. 293-302.
250. Kim, J., M. Guermah, R.K. McGinty, J.S. Lee, Z. Tang, T.A. Milne, A. Shilatifard, T.W. Muir, and R.G. Roeder, *RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells*. *Cell*, 2009. **137**(3): p. 459-71.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Évolution du nombre de publications sur l'épigénétique au cours des 20 dernières années	21
Figure 2 - Organisation structurale de la chromatine	22
Figure 3 - Vue schématique du nucléosome et des modifications post-traductionnelles des histones	25
Figure 4 - Représentation développée du SAM et du SAH.....	26
Figure 5 - Réactions de méthylation catalysées par les PRMT.....	27
Figure 6 - Organisation structurale des PRMT	27
Figure 7 - Mécanisme de coactivation des récepteurs nucléaires par la famille p160.....	32
Figure 8 - Implication de CARM1 dans de nombreux mécanismes essentiels à la vie cellulaire.....	33
Figure 9 - Représentation schématique de l'organisation structurale de la protéine CARM1 (de souris).....	41
Figure 10 - Structure du domaine catalytique de la protéine CARM1 de souris (PDB : 3B3F).....	41
Figure 11 - Modèle « chimère » du domaine catalytique étendu de la protéine CARM1 de souris	42
Figure 12 - Structure du site de fixation du SAH de la protéine CARM1 de souris.....	43
Figure 13 - Structure du domaine amino-terminal de la protéine CARM1 de souris.....	44
Figure 14 - Comparaison des différents dimères de PRMT connus	45
Figure 15 - Organisation structurale des méthyltransférases SAM-dépendantes de classe I	47
Figure 16 - Gels et chromatogrammes pour les différentes étapes de purification de mCARM1 ₁₃₀₋₅₀₇	59
Figure 17 - Gels et chromatogrammes pour les différentes étapes de purification de AgCARM1 ₁₋₅₀₉	61
Figure 18 - Caractérisation de l'effet du SAH sur la stabilité thermique de mCARM1 ₁₃₀₋₅₀₇ WT.....	63
Figure 19 - Système iTC200 Microcal®	64
Figure 20 - Courbes d'ITC classiques	65
Figure 21 - Schéma de la cinétique d'une réaction à deux substrats à fixation aléatoire	72
Figure 22 - Cristaux classiques de mCARM1 ₁₃₀₋₄₈₇	74
Figure 23 - Classes de ligands développées dans l'optique d'explorer les différentes poches de fixation des substrats de CARM1	80
Figure 24 - Processus itératif d'amélioration de ligands.....	81
Figure 25 - Organisation structurale de la poche de fixation du cofacteur.....	82
Figure 26 - Modèle de la poche de fixation du groupement guanidinium chez CARM1 et PRMT1.....	88
Figure 27 - Structure du composé SA920 dans le site catalytique de CARM1.....	95
Figure 28 - Structure du composé SA678 dans le site catalytique de CARM1.....	95
Figure 29 - Structure du composé SA707 dans le site catalytique de CARM1.....	96
Figure 30 - Structure du composé SA269 dans le site catalytique de CARM1.....	97
Figure 31 - Structure du composé SA435 dans le site catalytique de CARM1.....	97
Figure 32 - Modèle de la poche de fixation du guanidinium de l'arginine substrat	98
Figure 33 - Structure du composé SA684 dans le site catalytique de CARM1.....	101
Figure 34 - Structure du composé SA649 dans le site catalytique de CARM1.....	102
Figure 35 - Structure du composé SA714 dans le site catalytique de CARM1.....	102
Figure 36 - Réaction de substitution nucléophile in situ entre le composé SA751 et une cystéine.....	106
Figure 37 - Réaction de condensation in situ entre le composé SA765 et une arginine	106
Figure 38 - Structure du composé SA271 dans le site catalytique de CARM1.....	108
Figure 39 - Structures des composés SA491 et SA592 dans le site catalytique de CARM1.....	109
Figure 40 - Structure du composé SA751 dans le site catalytique de CARM1.....	110
Figure 41 - Structure du composé SA765 dans le site catalytique de CARM1.....	111
Figure 42 - Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne de Huisgen.....	111
Figure 43 - Réaction de cycloaddition in situ entre le résidu SA401 et un acide aminé à fonction alcyne	112
Figure 44 - Structures des composés à fonction azoture dans le site catalytique de CARM1.....	116
Figure 45 - Structures de 2 composés à cycle triazole dans le site catalytique de CARM1.....	118
Figure 46 - Mise en évidence d'interactions à longues distances entre CARM1 et l'histone H3 par FCS	126
Figure 47 - Caractérisation de l'effet de l'acétylation de la lysine 18 sur l'interaction entre CARM1 et l'histone H3 par FCS.....	126
Figure 48 - Caractérisation de l'effet du degré de méthylation sur l'interaction entre CARM1 et l'histone H3 par FCS	127
Figure 49 - Caractérisation de l'interaction entre CARM1 et différents substrats par FCS.....	127

Figure 50 - Caractérisation de l'interaction entre différentes constructions de CARM1 et l'histone H3 par FCS	129
Figure 51 - Caractérisation de l'interaction entre différents mutants de la poche de fixation du cofacteur par FCS	130
Figure 53 - Caractérisation de l'interaction entre différents mutants de la reconnaissance du substrat et l'histone H3 par FCS	131
Figure 54 - Caractérisation de l'interaction entre CARM1 et l'histone H3 en absence de cofacteur par FCS....	132
Figure 55 - Constantes cinétiques pour la construction mCARM1 ₁₄₀₋₄₈₀ WT.....	133
Figure 56 - Constantes cinétiques pour les mutants de la poche de fixation du SAM.....	134
Figure 57 - Constantes cinétiques pour les mutants de la poche de fixation de l'histidine H415.....	135
Figure 58 - Constantes cinétiques pour les mutants de l'asparagine N266.....	136
Figure 59 - Constantes cinétiques pour les mutants de la surface de reconnaissance du substrat.....	137
Figure 60 - Importance du résidu N266 pour les mécanismes de reconnaissance et de méthylation du substrat	138
Figure 61 - Mouvement du résidu Glu258 pour des conformations différentes du SAH.....	142
Figure 62 - Stabilisation potentielle du groupement guanidinium de l'arginine substrat par 2 glutamates du site actif de CARM1.....	143
Figure 63 - Stabilisation du groupement guanidinium du guanidinoacétate par 2 résidus acides du site actif de la GAMT.....	144
Figure 64 - Modèle mécanistique progressif pour la réaction de méthylation par la GAMT.....	144
Figure 65 - Modèle mécanistique concerté pour la réaction de méthylation par la GAMT.....	144
Figure 66 - Modèle mécanistique pour la réaction de méthylation par CARM1.....	146
Figure 67 - Structure de la protéine PRMT5 d'Arabidopsis thaliana (3,3 Å)	151
Figure 68 - Structure de la protéine PRMT5 de Caenorhabditis elegans	152
Figure 69 - Site catalytique de la protéine PRMT5 d'Arabidopsis thaliana occupé par de la SFG.....	153
Figure 70 - Oligomérisation du complexe PRMT5/MEP50 humain.....	156
Figure 71 - Structure du complexe PRMT5/MEP50 humain (4,3 Å)	157
Figure 72 - Reconnaissance d'un peptide substrat issu de l'histone H4 par le complexe PRMT5/MEP50 humain	158
Figure 73 - Structure de la forme non-réduite la protéine PRMT6 de souris 1,6 Å.....	161
Figure 74 - Structure de la forme réduite la protéine PRMT6 de souris (1,6 Å).....	161
Figure 75 - Importance de l'hélice αX pour la formation de la poche de l'arginine substrat.....	162
Figure 76 - Stabilisation de mPRMT6 sous sa forme apo par un ion magnésium hydraté	162
Figure 77 - Cavité dimérique importante de PRMT6 due à l'orientation de son bras de dimérisation	163
Figure 78 - Alignement structural de plusieurs PRMT	175
Figure 79 - Alignement de séquences correspondants aux différents homologues de la protéine CARM1.....	177
Figure 80 - Alignement de séquences correspondants aux différents homologues de la protéine PRMT5.....	180
Figure 81 - Alignement de séquences correspondants aux différents homologues de la protéine PRMT6.....	184

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Homologie de séquence des PRMT chez les eucaryotes	28
Tableau 2 - Inhibiteurs naturels et non sélectifs des PRMT.....	50
Tableau 3 - Inhibiteurs de la famille des AMI.....	51
Tableau 4 - Inhibiteurs issus de criblages virtuels.....	51
Tableau 5 - Inhibiteurs dérivés du pyrazole et de l'imidazole.....	52
Tableau 6 - Inhibiteurs analogues du cofacteur SAM	53
Tableau 7 - Capacité d'inhibition (IC50) des analogues du SAM occupant la poche de fixation du groupement sulfonium pour CARM1 et PRMT1	84
Tableau 8 - Capacité d'inhibition (IC50) des analogues du SAM occupant la poche de fixation du groupement guanidinium pour CARM1 et PRMT1.....	86
Tableau 9 - Effet de la fixation d'analogues du SAM sur la stabilité thermique de la protéine CARM1	89
Tableau 10 - Caractérisation de l'association de CARM1 avec différents ligands par ITC.....	93
Tableau 11 - Capacité d'inhibition (IC50) des analogues de l'état de transition SAM/Arginine pour CARM1 et PRMT1	99
Tableau 12 - Capacité d'inhibition (IC50) des dérivés électrophiles du SAM pour CARM1 et PRMT1.....	104
Tableau 13 - Liste des peptides synthétisés pour la co-cristallisation avec CARM1 et des dérivés électrophiles du SAM.....	107
Tableau 14 - Peptide synthétisé pour la co-cristallisation avec CARM1 et des dérivés du SAM à fonction azoture.	113
Tableau 15 - Capacité d'inhibition (IC50) des dérivés du SAM à fonction azoture et des différents produits de cycloaddition pour CARM1 et PRMT1.....	113
Tableau 16 - Peptides utilisés pour les expériences d'anisotropie de fluorescence.....	122
Tableau 17 - Estimation du Kd pour CARM1 de peptides dérivés de l'histone H3 par anisotropie de fluorescence	123
Tableau 18 - Peptides fluorescents utilisés pour les expériences de spectroscopie de corrélation de fluorescence	125
Tableau 19 - Constructions et mutants de la protéine CARM1	128
Tableau 20 - Récapitulatif des analogues du SAM et des mimes SAM/Arginine ou SAM/Peptide.....	186
Tableau 21 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence d'analogues du SAM.....	191
Tableau 22 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence de mimes SAM/Arginine.....	193
Tableau 23 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence d'analogues du SAM électrophiles	194
Tableau 24 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence d'analogues du SAM à fonction azoture.....	196
Tableau 25 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage en présence de produits de click.....	197
Tableau 26 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mCARM1 sauvage ou mutant en présence de SAH ou de SAH décarboxylé.....	198
Tableau 27 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de PRMT5.....	199
Tableau 28 - Statistiques de collecte, de traitement et d'affinement des données de diffraction aux rayons X des cristaux de mPRMT6 en présence ou non de différents cofacteurs.....	200

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES

Liste des publications

Schaub P, Yu Q, Gemmecker S, Poussin-Courmontagne P, Mailliot J, McEwen AG, Ghisla S, Al-Babili S, Cavarelli J, Beyer P, On the Structure and Function of the Phytoene Desaturase CRTI from *Pantoea ananatis*, a Membrane-Peripheral and FAD-Dependent Oxidase/Isomerase. *PLoS One*, 2012. 7(6):e39550

- J'ai participé à ce travail collaboratif, en début de thèse, hors thématique PRMT, pour acquérir une première expertise dans un projet complet de bio-cristallographie.

Publications en préparation et en cours de re-soumission

Ajebbar S, Cura V, Hassenboehler P, Mailliot J, Troffer-Charlier N, Wurtz JM, Cavarelli J and Wagner A, A first step towards selective inhibitors and peptide mimics of CARM1. Re-soumission à ChemMedChem.

Hassenboehler P, Mailliot J, Troffer-Charlier N, Cura V, Cavarelli J, Peptides outside the catalytic core of CARM1 are essential for all biological activity of CARM1. En préparation.

Mailliot J, Cura V, Ajebbar S, Hassenboehler P, Troffer-Charlier N, Wurtz JM, Wagner A, Cavarelli J, CARM1 inhibition: reaching specificity and selectivity. En préparation.

Bonnefond L, Mailliot J, Cavarelli J. Functional insights from PRMT6 crystal structure. En préparation

Communications orales

Mailliot J, Ajebbar S, Cura V, Hassenboehler P, Ozga M, Troffer-Charlier N, Wagner A, Cavarelli J, Synthèse et mode de fixation d'analogues de substrats peptidiques et d'inhibiteurs de CARM1. GTBio 2012, Association Française de Cristallographie, Montpellier (France), 3 au 6 avril 2012.

Mailliot J, Ajebbar S, Cura V, Hassenboehler P, Ozga M, Troffer-Charlier N, Wagner A, Cavarelli J, Structural study of CARM1, a histone methyltransferase, and its biologically significant complexes: from 3D structures to rational conception of pharmacologically active compounds. Integrated Structural Biology department « Research in Progress », Illkirch (France), 15 novembre 2011.

Mailliot J, Ajebbar S, Cura V, Hassenboehler P, Ozga M, Troffer-Charlier N, Wagner A, Cavarelli J, Structural study of CARM1, a histone methyltransferase, and its biologically significant complexes: from 3D structures to rational conception of pharmacologically active compounds. 25th Rhine-Knee Regional Meeting on Crystallography of Biomacromolecules, Sursee (Suisse), 28 au 30 septembre 2011.

Mailliot J, Ajebbar S, Cura V, Hassenboehler P, Troffer-Charlier N, Wagner A, Cavarelli J, Structural study of CARM1, a histone methyltransferase, and its biologically significant complexes: from 3D structures to rational conception of pharmacologically active compounds. 7th IBMC-IGBMC Annual Meeting, Albé (France), 19 et 20 mai 2011

Mailliot J, Ajebbar S, Cura V, Hassenboehler P, Troffer-Charlier N, Wagner A, Cavarelli J, Structural study of CARM1, a histone methyltransferase, and its biologically significant complexes: from 3D structures to rational conception of pharmacologically active compounds. PhD committee, 4 avril 2011.

Posters

Hassenboehler P, Mailliot J, Troffer-Charlier N, Ajebbar S, Wurtz JM, Cura V, Wagner A, Cavarelli J, Methylation by CARM1: A structure based approach to design inhibitors and peptide mimics. *Acta Cryst*, 2011. A67, C284-C285.

Hassenboehler P, Mailliot J, Ajebbar S, Troffer-Charlier N, Wurtz JM, Cura V, Wagner A, Cavarelli J, A structure based approach to design inhibitors and peptide mimics of CARM1. 22nd IUCR congress, International Union of crystallography, Madrid (Espagne), Août 2011.

Hassenboehler P, Mailliot J, Ajebbar S, Troffer-Charlier N, Wurtz JM, Cura V, Wagner A, Cavarelli J, Methylation by CARM1: A structure based approach to design inhibitors and peptide mimics. International Conference on Structural Genomics, Toronto (Canada), Mai 2011.



Justine MAILLIOT



Étude structurale de l'histone-méthyltransférase « CARM1 » et de ses complexes biologiquement significatifs

Résumé

Les protéine arginine méthyltransférases (PRMT) sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires : transcription, maturation et transport des ARN, traduction, transduction du signal, réplication et réparation de l'ADN, et apoptose. Différents travaux ont montré que des dérégulations de ces mécanismes impliquant les PRMT peuvent induire certains cancers, faisant de ces enzymes de nouvelles cibles potentielles en chimiothérapie. Il s'avère donc crucial de comprendre le mode d'action des PRMT à l'échelle atomique, à la fois au niveau fondamental et pour le développement de nouveaux médicaments. Les travaux décrits ici s'intéressent à la protéine PRMT4/CARM1 et s'appuient sur des études structurales par bio-cristallographie, pour comprendre les mécanismes de la réaction de méthylation catalysée par CARM1 et découvrir des inhibiteurs spécifiques, mais aussi sur des études en solution, pour caractériser l'interaction entre CARM1 et ses substrats.

Mots clés : CARM1 ; « coactivator-associated arginine methyltransferase 1 » ; coactivateurs des récepteurs nucléaires ; PRMT ; biologie structurale.

Summary

Protein arginine methyltransferases (PRMTs) are involved in several cellular mechanisms: transcription, RNA maturation and transport, translation, signal transduction, DNA replication and repair, and apoptosis. Different studies showed that deregulation of those mechanisms involving PRMTs can induce some cancers, making these enzymes new potential targets for chemotherapy. It is therefore crucial to understand the mode of action of PRMTs at the atomic scale, both at the fundamental level and for the development of new drugs. The studies described here focus on PRMT4/CARM1 and rely on structural studies by bio-crystallography, in order to understand the methylation mechanisms catalyzed by CARM1 and to discover specific inhibitors, but also on in vitro studies, to characterize the interaction between CARM1 and its substrates.

Keywords: CARM1 ; coactivator-associated arginine methyltransferase 1 ; nuclear receptor coactivator ; PRMT ; structural biology.