



Université de Sherbrooke

**Régulation du Récepteur  $\beta_3$  Adrénérgique par la Protéine Arginine  
Méthyltransférase 5**

Par  
Pierrick Moreau  
Programme de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en Pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Mai 2020

Membres du jury d'évaluation  
Pr Jean-Luc Parent, Département de Médecine  
Pr Éric Marsault, Département de Pharmacologie-Physiologie  
Pr Steve Jean, Département d'Immunologie et de Biologie Cellulaire

© Pierrick Moreau, 2020

## RÉSUMÉ

### **Modulation du Récepteur $\beta_3$ Adrénérgique par la Protéine Arginine Méthyltransférase 5**

Par  
Pierrick Moreau  
Programme de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La nature et la régulation des récepteurs adrénérgiques  $\beta_1$  et  $\beta_2$  sont bien caractérisées puisque ceux-ci étaient et sont toujours le sujet d'un grand nombre d'études. L'isoforme  $\beta_3$ , en revanche, est beaucoup moins bien connue. Contrairement aux autres isoformes, celle-ci n'est pas internalisée. Le seul mécanisme de désensibilisation connu pour ce récepteur est la diminution de l'expression du gène. Aucun mécanisme de désensibilisation rapide n'a encore été découvert. En 2018, deux publications décrivaient un nouveau mécanisme de régulation des RCPGs : la méthylation des arginines. Plus précisément, les auteurs démontraient que la méthylation par PRMT5 influence la signalisation chez trois RCPGs. Après avoir identifié PRMT5 comme partenaire d'interaction potentiel du récepteur  $\beta_3$  adrénérgique ( $\beta_3$ AR) en spectrométrie de masse, nous avons entrepris de tester l'implication possible de la méthylation dans la modulation de la signalisation issue de ce récepteur. Nous avons de plus testé deux variants de PRMT5, puisque ceux-ci semblent avoir des effets qui diffèrent dans certains mécanismes cellulaires.

Avec des cellules HEK 293, des essais de co-immunoprecipitation ont confirmé l'interaction entre  $\beta_3$ AR et PRMT5 observée en spectrométrie de masse et ce, pour les deux variants de PRMT5. En microscopie confocale, nous démontrons que l'isoforme courte de PRMT5, PRMT5S, co-localise avec  $\beta_3$ AR au niveau cytoplasmique et à la membrane plasmique, alors que l'isoforme longue, PRMT5L, montre une localisation agrégée dans la région juxtanucléaire. PRMT5 ne semble pas affecter l'expression de surface du récepteur et ne change pas la capacité d'internalisation de celui-ci. L'expression des deux variants de PRMT5 promeut l'activation de la voie ERK1/2 médiée par la stimulation par agoniste de  $\beta_3$ AR. À l'inverse, la déplétion de PRMT5 diminue l'activation ERK1/2  $\beta_3$ AR-dépendante. Des essais GST-pulldown nous révèlent que PRMT5S interagit avec la boucle intracellulaire 3 ainsi que la première moitié de la queue C-terminale du récepteur. Finalement, des expériences d'immunobuvardage réalisées avec un anticorps dirigé contre la diméthylation symétrique des arginines ont révélé que PRMT5L produit une méthylation de protéines encore non identifiées de manière temps-dépendante, lors de la stimulation de  $\beta_3$ AR. Cela semble indiquer que la stimulation de  $\beta_3$ AR peut induire l'activité méthyltransférase de PRMT5. Tous ces résultats nous permettent de proposer un nouveau mécanisme de régulation du récepteur  $\beta_3$  adrénérgique, via la méthylation de résidus arginine du récepteur ou de protéines impliquées dans sa signalisation, soit une modification post-traductionnelle encore très peu connue pour cette famille de récepteurs.

Mots clés : Récepteur  $\beta_3$  adrénérgique, PRMT5, méthylation, arginine, régulation, signalisation

## SUMMARY

### **Modulation of the $\beta_3$ adrenergic receptor by the Protein Arginine Methyltransferase 5**

By  
Pierrick Moreau  
Pharmacology Program

Thesis presented at the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of  
Master's degree diploma maitre ès sciences (M.Sc.) in Pharmacology,  
Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke,  
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

The nature and regulation of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic receptors are well characterized as they were and still are the subject of many studies. The  $\beta_3$  isoform, however, is far less understood. Contrary to the other isoforms, it does not internalize. The only known desensitization mechanism known for this receptor is the downregulation of its expression. No short-term desensitization mechanism for the  $\beta_3$  isoform has been described as of now. In 2018, two publications described a new regulation mechanism for GPCRs (G protein-coupled receptors): arginine methylation. More precisely, the authors described how methylation by PRMT5 influences the signaling of three distinct GPCRs. Having identified PRMT5 as a potential interaction partner of the  $\beta_3$  adrenergic receptor ( $\beta_3$ AR) using mass spectrometry, we set out to investigate the possible implication of arginine methylation in the modulation of signaling by this receptor. We have also tested two variants of PRMT5, as they have previously shown opposing effects in various cellular mechanisms.

In HEK 293 cells, co-immunoprecipitation assays confirmed the observed interaction between the  $\beta_3$ AR and PRMT5 by mass spectrometry, for both PRMT5 variants. Using confocal microscopy, we demonstrate that the shorter variant of PRMT5, PRMT5S, co-localizes with  $\beta_3$ AR in the cytoplasm as well as at the plasma membrane, whereas PRMT5L shows a clustered localization in the juxtannuclear region. PRMT5 does not seem to affect the surface expression of the receptor and has no effect on its internalization. The expression of both PRMT5 variants promotes activation of the ERK1/2 pathway mediated by  $\beta_3$ AR agonist stimulation. Conversely, PRMT5 depletion downregulates  $\beta_3$ AR-derived ERK1/2 activation. GST-pulldown assays reveal that PRMT5S directly interacts with the third intracellular loop as well the C-terminal tail of the  $\beta_3$ AR. Finally, western blot analyses using symmetric dimethylation-specific antibodies reveal that PRMT5L methylates unidentified proteins in a time-dependent manner, upon stimulation of the receptor. This indicates that stimulation of the  $\beta_3$ AR can induce arginine methyltransferase activity by PRMT5. Together, our results suggest a new regulation mechanism of the  $\beta_3$  adrenergic receptor, involving methylation of arginine residues of the receptor or proteins involved in its signaling, a poorly understood type of post-translational modification for this family of receptors.

Keywords:  $\beta_3$  adrenergic receptor, PRMT5, methylation, arginine, regulation, signaling

## TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Les récepteurs couplés aux protéines G.....</b>	<b>1</b>
1.1 Structure des RCPGs.....	2
1.2 Fonctionnement des RCPGs.....	4
1.3 Les protéines G hétérotrimériques.....	4
1.4 Régulation des RCPGs .....	7
1.5 La signalisation biaisée .....	8
<b>2. Les récepteurs adrénergiques.....</b>	<b>9</b>
2.1 Localisation des récepteurs adrénergiques $\beta$ .....	10
2.2 Régulation des récepteurs adrénergiques $\beta$ .....	11
2.3 Ligands des récepteurs adrénergiques $\beta$ .....	11
2.4 Structure des récepteurs adrénergiques $\beta$ .....	12
2.5 Couplage aux protéines G .....	13
2.6 Le récepteur $\beta_3$ adrénergique.....	14
2.7 Pathophysiologie cardiaque.....	15
2.8 Les adipocytes .....	16
<b>3. Les PRMTs (Protein Arginine Methyltransferases).....</b>	<b>17</b>
3.1 Classification des PRMTs .....	18
3.2 La méthylation des arginines.....	20
3.3 Les arginines .....	20
3.4 Effets de la méthylation des arginines.....	21
3.5 Déméthylation .....	23
3.6 PRMT1 .....	24
3.7 PRMT2 .....	25
3.8 PRMT3 .....	26
3.9 PRMT4.....	26
3.10 PRMT6.....	27
3.11 PRMT7 .....	28
3.12 PRMT8 .....	29
3.13 PRMT9 .....	30

<b>4. PRMT5 .....</b>	<b>31</b>
4.1 Les différentes fonctions de PRMT5.....	31
4.2 Partenaires d'interaction de PRMT5 .....	32
4.3 Variants de PRMT5.....	33
4.4 Régulation de PRMT5.....	34
4.5 PRMT5 et récepteurs.....	35
4.6 Effet de PRMT5 sur l'expression de surface .....	36
4.7 Modulation de la transcription .....	36
4.8 PRMT5 et cancer.....	37
4.9 PRMT5 et l'hypertrophie cardiaque.....	37
<b>5. Hypothèse et problématique .....</b>	<b>38</b>
5.1 Objectifs .....	39
5.2 Avant-propos.....	39
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>40</b>
6.1 Réactifs.....	40
6.2 Constructions plasmidiques.....	40
6.3 Culture cellulaire et transfection .....	41
6.4 Immunoprécipitation .....	41
6.5 Essais d'activation ERK1/2.....	43
6.6 Marquage à immunofluorescence et microscopie confocale.....	43
6.7 Mesure des récepteurs de surface cellulaire par ELISA.....	44
6.8 Production de protéines recombinantes et essais GST-Pulldown .....	45
6.9 Détection de la méthylation dans les lysats cellulaires.....	45
6.10 Analyses statistiques.....	46
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>47</b>
7.1 PRMT5 interagit avec le récepteur $\beta_3$ adrénergique.....	47
7.2 PRMT5S co-localise avec $\beta_3$ AR en microscopie confocale.....	49
7.3 PRMT5 interagit avec les domaines ICL3 et CT de $\beta_3$ AR.....	52
7.4 La déplétion de PRMT5 n'affecte pas l'expression de surface ou l'internalisation de $\beta_3$ AR .....	53
7.5 PRMT5 module la signalisation par $\beta_3$ AR .....	56
7.6 La stimulation de $\beta_3$ AR induit l'activité arginine méthyltransférase en cellules .....	58
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>60</b>

8.1 Mise en contexte et étapes initiales du projet.....	60
8.2 Caractérisation de l'interaction entre PRMT5 et $\beta_3$ AR.....	61
8.3 Détermination du rôle modulateur de PRMT5 sur l'expression de surface du $\beta_3$ AR .....	63
8.4 Implication de PRMT5 dans la modulation de la signalisation du $\beta_3$ AR.....	65
8.5 Caractérisation de la méthylation par PRMT5 .....	68
8.6 Implication du projet dans le contexte cardiologique.....	71
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>73</b>
<b>LISTE DES RÉFÉRENCES .....</b>	<b>74</b>
<b>ANNEXE I.....</b>	<b>85</b>
<b>ANNEXE II .....</b>	<b>86</b>

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

Figure 1: Structure générale d'un RCPG .....	3
Figure 2: Signalisation des RCPGs.....	6
Figure 3: Mécanisme d'internalisation des RCPGs .....	8
Figure 4: Mécanisme de relaxation du myocarde par le récepteur $\beta_3$ adrénergique.....	15
Figure 5: Les trois types de méthylation des arginines chez les eucaryotes.....	19
Figure 6: Modélisation de l'effet de la méthylation sur la densité électronique des arginines.....	22
Figure 7: Le méthylosome, composé majoritairement de PRMT5 et MEP50.....	33
Figure 8 : Le récepteur $\beta_3$ adrénergique.....	35

### RÉSULTATS

Figure 9 : $\beta_3$ AR interagit avec PRMT5 .....	48
Figure 10 : PRMT5 co-localise avec $\beta_3$ AR .....	51
Figure 11 : Identification des domaines intracellulaires de $\beta_3$ AR liant PRMT5 .....	53
Figure 12 : PRMT5 n'influence pas l'expression de surface ou l'internalisation du $\beta_3$ AR .....	55
Figure 13 : PRMT5 module la phosphorylation de ERK1/2 suite à la stimulation du $\beta_3$ AR .....	57
Figure 14 : La stimulation de $\beta_3$ AR mène à l'augmentation de l'activité arginine méthyltransférase .....	59



## LISTE DES TABLEAUX

### INTRODUCTION

Tableau 1: Comparaison des rôles principaux des cinq types de récepteurs adrénergiques.10

Tableau 2: Comparaison entre les trois isoformes  $\beta$  des récepteurs adrénergiques.....12

### RÉSULTATS

Tableau 3 : Partenaires d'interaction de  $\beta_3$ AR identifiés par spectrométrie de masse .....48

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADMA : *asymmetric dimethylarginine*  
 ADN : acide désoxyribonucléique  
 AMPc : adénosine monophosphate cyclique  
 ARNm : acide ribonucléique messenger  
 $\beta_3$ AR: *beta 3 adrenergic receptor*  
 $\beta$ ARK : *beta adrenergic receptor kinase*  
 BAD: *BCL-2 antagonist of cell death*  
 Blimp1: *B lymphocyte-induced maturation protein-1*  
 BSA: *bovine serum albumin*  
 CARM1: *coactivator associated arginine methyltransferase 1*  
 CHO: *chinese hamster ovary*  
 CHTOP: *chromatin target of PRMT1*  
 CLNS1A: *chloride nucleotide-sensitive channel 1A*  
 COPRS: *coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator*  
 DAG: diacylglycérol  
 DAL-1: *differentially expressed in adenocarcinoma of the lung*  
 DAPI: 4'-6-diamidino-2-phénylindole  
 DsiRNA: *dicer-substrate small interfering ribonucleic acid*  
 ECL: *extracellular loop*  
 EDTA: acide éthylènediamine tétraacétique  
 EEA1: *early endosome antigen 1*  
 EGFR: *epidermal growth factor receptor*  
 eNOS: oxyde nitrique synthase endothéliale  
 ERAD: *endoplasmic reticulum-associated degradation*  
 ERK: *extracellular signal-regulated kinase*  
 FBS: *foetal bovine serum*  
 FGF : facteur de croissance des fibroblastes  
 FNA: facteur natriurétique auriculaire  
 GABA:  $\gamma$  aminobutyric acid receptors  
 GAP: *GTPase activating protein*  
 GAR: glycine-arginine-riche  
 GDP: guanosine diphosphate  
 GEF: *guanidine nucleotide exchange factor*  
 GM130: *Golgi matrix protein 130kDa*  
 GRAFS: *glutamate, rhodopsin, adhesion, frizzled/taste2, secretin*  
 GRK: *G-protein-coupled receptor kinase*  
 GST: glutathion S-transférase  
 GTP: guanosine triphosphate  
 GTPase: guanosine triphosphatase  
 HA: *human influenza hemagglutinin*  
 HEK: *human embryonic kidney*  
 HGF: facteur de croissance des hépatocytes  
 HRP: *horseradish peroxydase*

IB: *immunoblotting*  
 ICL: *intracellular loop*  
 IP: *immunoprecipitation*  
 IP<sub>3</sub>: *inositol triphosphate*  
 Jak2: *Janus tyrosine kinase 2*  
 JBP1: *Jak-binding protein 1*  
 KDM: *lysine demethylase*  
 KO: *Knockout*  
 LXR $\alpha$ : *liver X receptor  $\alpha$*   
 MAPK: *mitogen-activated protein kinase*  
 MEP50: *methylosome protein 50*  
 MMA: *monomethyl arginine*  
 MOI : *multiplicity of infection*  
 NGF: *facteur de croissance nerveuse*  
 NO synthase: *oxide nitrique synthase*  
 OCG: *octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside*  
 PAF: *platelet-activating factor*  
 PBS: *phosphate-buffered saline*  
 PCR: *polymerase chain reaction*  
 PDE2: *phosphodiesterase 2*  
 PIP<sub>2</sub>: *phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*  
 PKA : *protéine kinase A*  
 PKC : *protéine kinase C*  
 PLC $\beta$  : *phospholipase C $\beta$*   
 PRMT: *protein arginine methyltransferase*  
 RAF : *rapidly accelerated fibrosarcoma*  
 RCPG: *récepteur couplé aux protéines G*  
 RGS: *regulator of G protein signaling*  
 RioK1: *RIO domain kinase 1*  
 SAH: *S-adénosyl homocystéine*  
 SAM: *S-adénosyl méthionine*  
 SAP145: *spliceosome-associated protein 145*  
 SDMA: *symmetric dimethylarginine*  
 SDS: *sodium dodecyl sulfate*  
 SH3: *src homology 3*  
 SHP-1: *src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*  
 shRNA: *short hairpin ribonucleic acid*  
 SMN: *survival motor neuron*  
 SNC : *système nerveux central*  
 SRC : *steroid receptor coactivator*  
 TAS2 : *récepteur taste2*  
 TBS: *tris-buffered saline*  
 TGN46: *trans-Golgi network protein 46 kDa*  
 TIM: *triosephosphate isomerase*  
 WDR77: *WD repeat domain 77*  
 Wnt: *wingless-related integration site*

*Don't bother about genius. Don't worry about being clever.  
Trust in hard work, perseverance, and determination.*

*- Frederick Treves*

## REMERCIEMENTS

Je veux tout d'abord remercier mon directeur de recherche pour son aide précieuse, pour ce projet de maîtrise, mais aussi pour mon développement personnel. Il a joué un rôle central dans tous les événements qui se sont déroulés pendant ce projet. Je veux particulièrement souligner la patience et la sagesse dont il a fait preuve, dans toutes les situations rencontrées. Je veux aussi remercier mes collègues, premièrement pour leur aide inestimable, mais aussi pour les moments passés ensemble, les fous rires et les discussions au cours des années. J'aimerais de plus remercier ma famille et amis pour leur support constant, j'en suis extrêmement reconnaissant. Merci à Éric Marsault d'avoir accepté de faire partie de mon comité d'encadrement et d'avoir partagé ses conseils. Finalement, je remercie le comité évaluateur d'avoir généreusement donné de leur temps pour évaluer ce travail. Cette expérience a été pour moi très enrichissante et les compétences et le savoir qui en ressortent seront un atout pour les années à venir.

# INTRODUCTION

Le monde du vivant est un sujet passionnant. On découvre chaque année des phénomènes fascinants qui nous permettent d'avoir une meilleure compréhension du monde dans lequel on vit. Lorsque l'on fait référence à ces phénomènes, on pense souvent à l'échelle macroscopique, puisque c'est le monde que l'on observe à chaque jour qui passe. Il y a toutefois un monde vivant complètement différent lorsque l'on plonge dans l'univers microscopique, par exemple au niveau de la cellule. L'environnement cellulaire est un milieu extrêmement complexe. Les différents mécanismes étudiés ainsi que les découvertes qui en ressortent nous donnent un avantage considérable dans nos vies. En ayant une compréhension de ces structures et mécanismes microscopiques, nous avons la possibilité de les modifier et de les influencer. C'est le principe de la pharmacologie, où l'on fait usage de molécules afin d'altérer des processus biologiques, comme dans le cas du traitement de conditions pathologiques. Une importante proportion de ces médicaments, soit de 30 à 50%, visent des structures protéiques membranaires, appelées récepteurs couplés aux protéines G, ou RCPGs (Hopkins and Groom, 2002).

## 1. Les récepteurs couplés aux protéines G

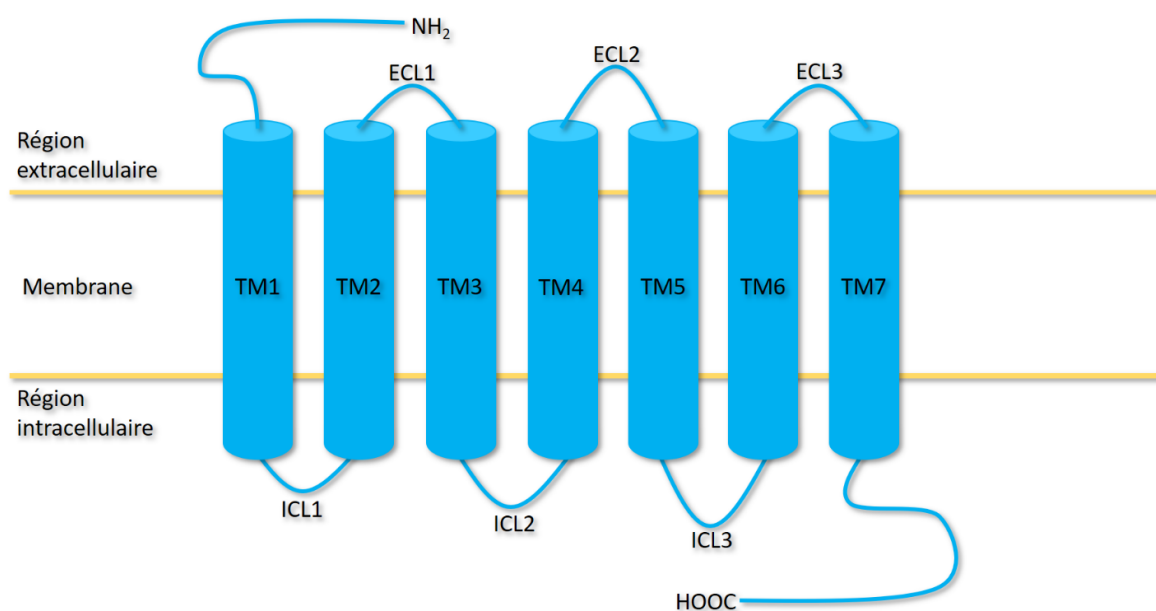
Afin de fonctionner adéquatement, la cellule doit pouvoir communiquer l'information de l'environnement extérieur vers le milieu intracellulaire. Ce phénomène est appelé la transduction du signal. Les RCPGs sont justement un outil permettant une telle communication. Ces récepteurs sont situés à la membrane de la cellule et peuvent reconnaître une foule de stimuli, comme des hormones, des odeurs ou même la lumière. Ceux-ci peuvent par la suite communiquer cette information vers l'intérieur de la cellule, induisant une réponse. Leur nom vient du fait qu'ils fonctionnent en tandem avec les protéines G, qui agissent à titre d'effecteurs : le récepteur leur communique un signal, qui est ensuite pris en charge par celles-ci, allant activer d'autres mécanismes cellulaires. Les RCPGs forment une superfamille composée de plus de 800 protéines, ce qui en fait la plus grande famille de récepteurs de surface cellulaire du génome humain (Fredericksson *et al.*, 2003). Ces récepteurs sont impliqués dans de multiples processus biologiques, comme la croissance, les

fonctions cardiovasculaires, les réponses cognitives et la vision, pour n'en nommer que quelques exemples. Leur dysfonction a cependant été associée à plusieurs pathologies, comme des maladies neurodégénératives, cardiaques, le diabète et le cancer, d'où l'intérêt grandissant de l'étude de ces récepteurs.

### 1.1 Structure des RCPGs

Les RCPGs ont une structure bien distincte. Ils sont caractérisés par la présence de trois boucles extracellulaires ainsi que trois autres au niveau intracellulaire, connectées par sept hélices transmembranaires. À cela se rajoutent une queue N-terminale extracellulaire et une queue C-terminale intracellulaire (figure 1). Leur superfamille est subdivisée en cinq familles, en fonction de leur séquence et longueur, ce qui produit des différences structurales, menant à des variations au niveau de la spécificité au substrat et au couplage aux protéines G. Ces familles forment le système de classification GRAFS (*Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste2, Secretin*). La famille *glutamate* est surtout connue pour ses huit récepteurs métabotropes au glutamate et deux récepteurs d'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA). Le glutamate est un important neurotransmetteur dans le cerveau agissant sur un grand nombre de synapses excitatrices. Le long domaine N-terminal de ce type de récepteur est formé de deux boucles séparées d'une cavité, où le glutamate peut se lier. On compare souvent cette structure à la tête d'une plante carnivore (*venus flytrap*). La famille *rhodopsin* est de loin la plus grande. La structure de ces récepteurs est différente de celle des autres familles étant donné leur queue N-terminale plutôt courte. Une autre particularité est leur domaine de liaison situé dans une cavité entre les domaines transmembranaires, contrairement aux autres familles, où l'on observe une implication importante du domaine N-terminal extracellulaire. Cette grande famille est divisée davantage en quatre groupes;  $\alpha$ , incluant des récepteurs liant les amines, des peptides ou des prostaglandines;  $\beta$ , incluant d'autres récepteurs liant des peptides;  $\gamma$ , pour des récepteurs liant des neuropeptides comme la somatostatine et les opioïdes ainsi que des récepteurs liant d'autres peptides comme les chimiokines et finalement la sous-famille  $\delta$ , un grand groupe qui inclut les récepteurs olfactifs ainsi que les récepteurs aux purines et glycoprotéines. La famille *adhesion* inclut des récepteurs ayant une longue queue N-terminale comportant un haut pourcentage de résidus Ser et Thr, résultant en une structure rigide hautement glycosylée sortant de la

membrane plasmique. La plupart de ces récepteurs contiennent un domaine protéolytique, alors qu'un certain nombre contiennent des domaines retrouvés chez d'autres protéines, comme la cadhérine, la lectine, la laminine et l'immunoglobuline. La famille *Frizzled/Taste2* est séparée en deux groupes. Les récepteurs *frizzled* ont une longue queue N-terminale composée d'environ 200 acides aminés probablement impliquée dans la liaison du ligand Wnt (*wingless-related integration site*) et sont impliqués dans la différenciation, la prolifération et la polarité durant le développement cellulaire. Les récepteurs *taste2* (TAS2) sont exprimés dans l'épithélium de la langue et le palais et sont probablement impliqués dans la détection du goût amer. Finalement, la famille *secretin* inclut les récepteurs ayant une queue N-terminale assez longue de soixante à quatre-vingts acides aminés, avec des ponts cystéine assez conservés. Ce domaine est important pour la liaison de leurs ligands, des peptides plutôt volumineux qui agissent souvent de façon paracrine (action locale) (Schiöth and Fredriksson, 2005).



**Figure 1 : Structure générale d'un RCPG.** On remarque leurs sept domaines transmembranaires caractéristiques, en plus des domaines extracellulaires (ECL) et intracellulaires (ICL) les liant ensemble. La queue N-terminale est extracellulaire, alors que la queue C-terminal est intracellulaire.



### 1.2 Fonctionnement des RCPGs

Pour la majorité de ces récepteurs, les signaux induits sont issus de la liaison de ligands extracellulaires. Dans un tel cas, ces ligands sont synthétisés au niveau endogène, ou administrés (exogène). Il est important de mentionner que les RCPGs ont aussi une activité basale. Leur conformation est ce qui dicte leur état actif/inactif. On ne peut comparer une population de ces récepteurs à un simple interrupteur de lumière; il y a des états intermédiaires. On compte plusieurs types de ligands, qui sont généralement divisés en trois classes principales. Les agonistes lient les récepteurs, favorisant un changement de conformation vers un état actif, encourageant la signalisation. Les antagonistes, quant à eux, lient le récepteur sans l'activer, empêchant son activation agoniste-dépendante. Finalement, les agonistes inverses favorisent une conformation inactive, inhibant ainsi l'activité basale.

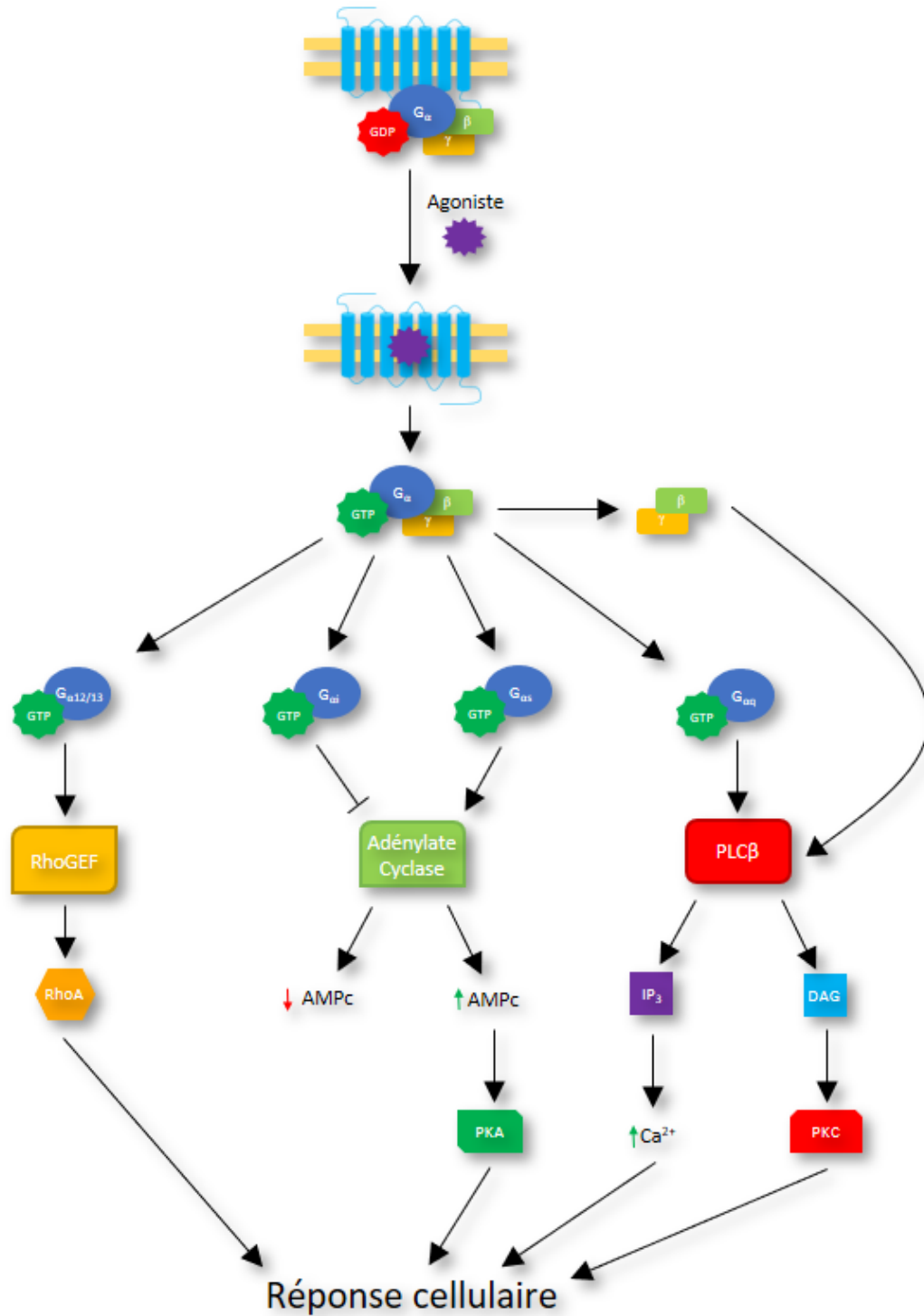
Structuralement, la liaison d'un agoniste cause un changement de conformation des domaines transmembranaires, qui est traduit au niveau des boucles intracellulaires. Autrement dit, l'arrangement spatial des atomes composant cette molécule est modifié. Ce sont les boucles intracellulaires deux et trois qui sont généralement les domaines d'interaction des protéines G. Ce changement de conformation induit aussi un changement au niveau de la protéine  $G_\alpha$ . Il est pensé que cela est dû à une liaison rendue possible au niveau du domaine C-terminal de  $G_\alpha$  avec le récepteur, changeant l'allostérie interne de cette sous-unité et menant à la relâche de GDP, ce qui cause ultimement son activation (Wess, 1997). Ces étapes sont expliquées davantage dans les lignes qui suivent.

### 1.3 Les protéines G hétérotrimériques

Les protéines G fonctionnent sous forme d'un complexe hétérotrimérique, composé des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les protéines G doivent leur nom à la capacité de la sous-unité  $\alpha$  à lier la guanosine triphosphate, ou GTP, ce qui cause son activation. Cette dernière, lorsqu'inactive, est liée à la guanosine diphosphate (GDP). Les RCPGs agissent à titre de GEF (*guanidine nucleotide exchange factor*), favorisant l'échange de GDP pour le GTP, activant la sous-unité  $\alpha$ . Cette activation mène à la dissociation de celle-ci des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ , leur permettant de causer l'activation de cascades signalétiques (Pierce *et al.*, 2002).

Après les protéines G, ces cascades signalétiques sont transmises par des seconds messagers, comme l'AMPc, l'IP<sub>3</sub> et le calcium, mentionnés dans les lignes qui suivent.

La sous-unité  $\alpha$  comporte plusieurs isoformes, chacune avec des effets uniques (figure 2).  $G_{\alpha s}$  stimule l'activité de l'adénylate cyclase, menant à l'accumulation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans la cellule, ce qui a pour effet d'activer la protéine kinase A. À l'opposé,  $G_{\alpha i}$  inhibe l'adénylate cyclase, réduisant le niveau d'AMPc. L'isoforme  $G_{\alpha q}$ , aidée des protéines G  $\beta$  et  $\gamma$ , active la phospholipase C $\beta$ , qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). Le DAG agit en tant que second messenger activant la protéine kinase C (PKC), alors que l'IP<sub>3</sub> est un second messenger qui mène à la relâche du calcium du réticulum endoplasmique dans le cytoplasme. Finalement, l'isoforme  $G_{\alpha 12/13}$  mène à l'activation des protéines Rho, impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine (Gacasan, Baker and Parrill, 2018). Cette signalisation est ultimement mise à terme par l'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité  $\alpha$ , hydrolysant le GTP en GDP, menant à l'inactivation de cette dernière (Garcia-Marcos, Ghosh and Farquhar, 2015). Ce processus peut aussi être favorisé par les membres de la famille RGS (*regulator of G protein signaling*), qui agissent à titre de GAPs (*GTPase activating protein*), des protéines qui lient et stimulent l'activité GTPase des protéines G.

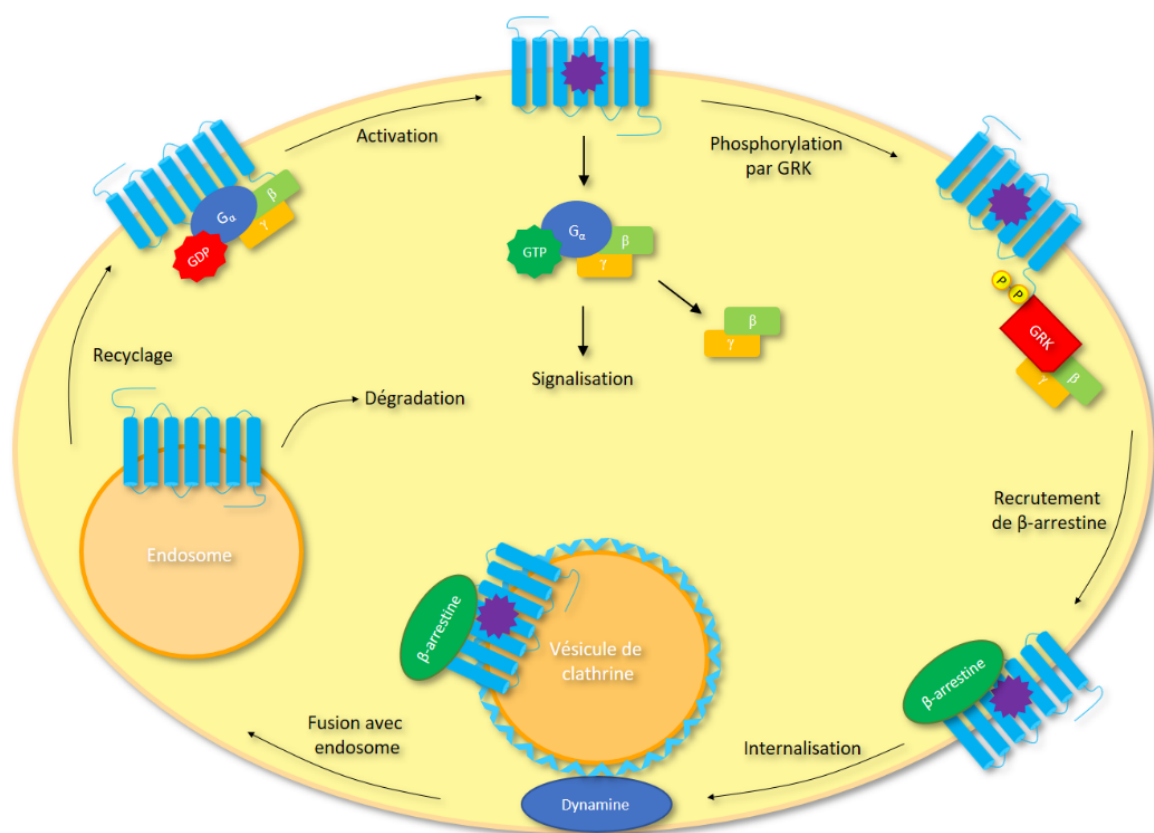


**Figure 2 : Signalisation des RCPGs.** La liaison d'un agoniste au récepteur provoque un changement de conformation et mène à la dissociation du GDP de la protéine G<sub>α</sub>, pour être remplacé par le GTP. Cette association mène à l'activation de différentes voies de signalisation, selon le type de protéine G<sub>α</sub> : G<sub>α12/13</sub>, G<sub>αi</sub>, G<sub>αs</sub>, ou G<sub>αq</sub> (Inspiré de Gacasan *et al.*, 2018).

#### 1.4 Régulation des RCPGs

La signalisation par ces récepteurs est régulée principalement via l'activité GTPase intrinsèque des protéines G, comme discuté précédemment, ainsi que par l'internalisation des RCPGs. Dans un cas de signalisation ligand-dépendante prolongée, les RCPGs sont phosphorylés sur des résidus sérine/thréonine de leurs domaines intracellulaires par la protéine kinase A (PKA), PKC et les GRKs (*G-protein-coupled receptor kinase*). Cette étape constitue l'initialisation de la désensibilisation homologue, puisqu'elle est engendrée par la liaison du ligand au récepteur. La désensibilisation hétérologue, quant à elle, a lieu de façon non discriminatoire, indépendamment de la stimulation du récepteur, et la phosphorylation est médiée par PKA et PKC. Cette modification post-traductionnelle mène alors au recrutement de la  $\beta$ -arrestine, qui entrave l'interaction récepteur/protéine G via interférence stérique. Le complexe récepteur/ $\beta$ -arrestine est par la suite internalisé grâce à la formation d'une vésicule, permettant la désensibilisation du récepteur. Celle-ci est formée à la membrane à l'aide d'un manteau de clathrine. C'est la dynamine, une GTPase, qui permet la dissociation de la vésicule de la membrane, permettant l'internalisation complète du récepteur. Le récepteur internalisé est ensuite dégradé ou recyclé et transporté vers la membrane (figure 3) (Claing *et al.*, 2002). Lors d'une stimulation chronique, le niveau d'expression des RCPGs est diminué, afin de combattre la surstimulation (Belge *et al.*, 2014). Un autre mécanisme, l'ubiquitinylation, affecte aussi les RCPGs. Il s'agit d'une des modifications post-traductionnelles les plus prévalentes dans la cellule. L'ubiquitine est un polypeptide composé de 76 acides aminés qui est attaché aux résidus lysines de protéines substrats. Via l'action de trois types d'enzymes, soit E1 (*ubiquitin activating enzymes*), E2 (*ubiquitin conjugating enzymes*) et E3 (*ubiquitine ligases*), les RCPGs sont ubiquitinylés. Le rôle le plus connu de l'ubiquitinylation est le ciblage des RCPGs activés, menant à leur internalisation pour dégradation au lysosome. Cette modification post-traductionnelle possède cependant plusieurs autres fonctions. L'ubiquitine sert d'étiquette dans le système de contrôle de qualité des protéines dans la cellule, la voie ERAD (*endoplasmic reticulum-associated degradation*). Les protéines mal repliées sont ainsi envoyées au protéasome pour dégradation. Elle régule aussi l'expression de surface des RCPGs et peut donc contrôler la réactivité de la cellule à plusieurs stimuli. L'ubiquitination de la  $\beta$ -arrestine, liée au RCPGs lors de leur internalisation, peut moduler la signalisation via la voie MAPK (*mitogen-*

*activated protein kinase*). L'ubiquitine elle-même possède sept résidus lysine qui peuvent être ubiquitinylés à leur tour. Cette addition mène à des chaînes de polyubiquitine ayant différentes configurations, qui sont souvent associées à différentes fonctions. Ce phénomène est souvent comparé au principe du code-barre que l'on utilise pour étiqueter des produits en magasin. L'ubiquitination est donc une modification ayant un rôle très important dans la régulation des mécanismes cellulaires (Skieterska *et al.*, 2017).



**Figure 3 : Mécanisme d'internalisation des RCPGs.** L'activation du RCPG mène à la dissociation des protéines G. GRK procède ensuite à la phosphorylation de résidus sérine/thréonine intracellulaires du récepteur, favorisant la liaison de la  $\beta$ -arrestine à celui-ci. Cela mène à la formation d'une vésicule de clathrine, qui permet l'internalisation du RCPG. Cette vésicule fusionne par la suite avec les endosomes. Le récepteur internalisé sera ensuite recyclé à la membrane, ou envoyé pour dégradation au lysosome (Inspiré de Gacasan *et al.*, 2018).

### 1.5 La signalisation biaisée

Comme détaillé précédemment, les RCPGs fonctionnent grâce à leur couplage avec les protéines G. Il s'agit ici de la voie classique de ces récepteurs. Il y a toutefois d'autres

mécanismes indépendants des protéines G qui sont impliqués dans la transduction du signal. Cette découverte a encouragé la recherche et le développement de nouveaux ligands pouvant biaiser la signalisation vers une voie ou une autre. La voie arrestine-dépendante est un tel mécanisme. Les signaux issus de cette voie en particulier semblent posséder plusieurs fonctions, comme l'augmentation de la dégradation des seconds messagers, l'exocytose, la migration et la croissance cellulaire, ainsi que la régulation du cytosquelette, contrôlant le trafic des vésicules (Luttrell, Maudsley and Bohn, 2015). Au cours des dernières années, des avancées ont permis de démontrer certains mécanismes permettant la sélection d'une ou l'autre des voies. Dans le cas du récepteur  $\beta_2$  adrénergique, l'activation des protéines G est associée au mouvement de l'hélice transmembranaire six du récepteur, alors que pour la voie arrestine, il s'agit plutôt de l'hélice transmembranaire sept (Liu *et al.*, 2013). De cette façon, le même récepteur peut être complètement différent au niveau de sa signalisation lorsque l'on compare la liaison d'un agoniste biaisé et un agoniste conventionnel. Le développement de ligands biaisés permet ainsi de profiter de ces mécanismes spécifiques et de favoriser des effets désirés, idéalement en évitant les effets délétères.

## 2. Les récepteurs adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques sont les récepteurs liés à la réponse du système sympathique, soit la réponse aux situations de stress, permettant de préparer le corps à l'action. Ce système demeure toutefois important, même en absence de stress. Cette classe de récepteurs est responsable d'une foule de mécanismes, comme la régulation de la fréquence cardiaque, du tonus vasculaire, de la bronchodilatation, du métabolisme du glucose et des lipides, et bien d'autres. Ceux-ci sont maintenant divisés en deux groupes principaux; les récepteurs adrénergiques  $\alpha$  et  $\beta$ . Ils sont de plus divisés en 5 sous-types, soit  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  (Tableau 1). Dans le cas des récepteurs  $\alpha$ , on compte un autre niveau de subdivision : les récepteurs  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  et  $\alpha_{2C}$ . Dans le but d'alléger ce document, je vais concentrer le texte sur les récepteurs adrénergiques  $\beta$ .

Initialement, les récepteurs médiant les réponses au niveau du cœur étaient désignés  $\beta_1$ , alors que ceux responsables de l'activité de vasodilatation et bronchodilatation étaient définis comme  $\beta_2$ . Un problème survenait cependant lors de l'observation de la réponse

$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$
Vasoconstriction	Suppression relâche noradrénaline	Tachycardie + Inotrope positif	Vasodilatation	Lipolyse + thermogénèse
Mydriase	Suppression relâche acétylcholine	Lipolyse	Bronchodilatation	Relaxation vessie
Contraction vessie	Inhibition relâche insuline	Augmente relâche rénine	Augmentation glucose sanguin	Inotrope négatif

**Tableau 1 : Comparaison des rôles principaux des cinq types de récepteurs adrénergiques.** (Inspiré de Schmidt et Weinshenker, 2014 et Strosberg, 1993).

adrénergique au niveau de certains tissus, comme le tissu adipeux et le tractus intestinal. Les réponses observées, comme la lipolyse, la relaxation des muscles lisses et la consommation d'oxygène n'étaient pas compatibles avec l'activité des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ . C'est donc cela qui a poussé à émettre l'hypothèse qu'il existe un troisième type de récepteur adrénergique  $\beta$  (Tan and Curtis-Prior, 1983). L'existence de tels récepteurs fut démontrée en 1984, en rapportant qu'une série de ligands  $\beta$ -sélectifs, qui n'étaient pas sélectifs pour  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , avaient un effet anti-obésité significatif chez la souris (Arch *et al.*, 1984). Le récepteur  $\beta_3$  adrénergique fut finalement cloné en 1989 (Emorine *et al.*, 1989).

### 2.1 Localisation des récepteurs adrénergiques $\beta$

Chacun des trois récepteurs adrénergiques  $\beta$  est principalement exprimé dans un certain type de tissu. Par exemple,  $\beta_1$  est surtout retrouvé au niveau du cœur, étant donc la cible des  $\beta$ -bloqueurs en pharmacologie, alors que  $\beta_2$  se situe surtout au niveau des poumons. Celui-ci est donc la cible des médicaments bronchodilatateurs. Quant au récepteur  $\beta_3$ , il est principalement retrouvé dans le tissu adipeux (Strosberg, 1997). Malgré leurs distinctions, ces récepteurs ont aussi une localisation commune dans certains tissus, comme le cœur. Relativement peu de médicaments  $\beta_3$ -sélectifs existent, mais des essais cliniques sont en cours, notamment pour le traitement de maladies cardiaques (Cannavo and Koch, 2017).

## 2.2 Régulation des récepteurs adrénergiques $\beta$

La régulation des récepteurs adrénergiques  $\beta_1$  et  $\beta_2$  est bien connue, notamment au niveau de leur désensibilisation. Après activation par un ligand, comme l'adrénaline, il y a augmentation du niveau cellulaire d'AMPc, menant à l'activation de deux kinases : PKA et GRK2. Celles-ci vont alors phosphoryler des résidus sérine sur la queue C-terminale des récepteurs, recrutant la  $\beta$ -arrestine. Celle-ci va par la suite mener à l'internalisation des récepteurs via endocytose. Ils seront alors dégradés ou recyclés à la membrane, comme décrit dans la section 1.4 (Coman *et al.*, 2008). Dans le cas du récepteur  $\beta_3$  adrénergique, c'est bien différent. En fait, les mécanismes de régulation de ce récepteur demeurent jusqu'à présent incertains. L'une de ses grandes différences avec les autres isoformes  $\beta_1$  et  $\beta_2$  est qu'il ne comporte pas de site ciblé par la phosphorylation au niveau de sa queue C-terminale. Ainsi, la PKA et la GRK2 n'ont aucun effet sur celui-ci; il n'est pas internalisé, donc il n'y a aucun phénomène de désensibilisation rapide (Skeberdis, 2004). Le seul phénomène de désensibilisation commun entre les trois isoformes est le phénomène de réduction d'expression d'ARNm de ces récepteurs, qui est moins rapide que l'internalisation (heures au lieu de minutes) (Bengtsson, Cannon and Nedergaard, 2000). De plus, et contrairement au récepteur  $\beta_2$ , le récepteur  $\beta_3$  ne semble pas être dégradé au niveau protéique à court et moyen terme (Nantel *et al.*, 1994).

## 2.3 Ligands des récepteurs adrénergiques $\beta$

Comme mentionné précédemment, les ligands endogènes des récepteurs adrénergiques sont l'adrénaline et la noradrénaline. Dans des cellules CHO (*chinese hamster ovary*), souvent utilisées en recherche, des études de liaison ont démontré que l'adrénaline avait un ordre d'efficacité d'activation  $\beta_2 > \beta_1 > \beta_3$ , alors que pour la noradrénaline, on obtient  $\beta_3 \approx \beta_1 > \beta_2$  (Hoffmann *et al.*, 2004). Utilisant le même type cellulaire, mais cette fois-ci en étudiant l'accumulation d'AMPc, des ordres  $\beta_2 \geq \beta_1 > \beta_3$  pour l'adrénaline et  $\beta_1 > \beta_3 > \beta_2$  pour la noradrénaline ont été observés (Tate *et al.*, 1991). En recherche, d'autres ligands sont plutôt utilisés, comme l'isoprotérénol (aussi nommé isoprénaline). Cet agoniste démontre l'ordre d'efficacité  $\beta_1 > \beta_2 > \beta_3$ , mais la différence entre  $\beta_1$  et  $\beta_3$  est inférieure à un facteur de dix. L'isoprotérénol est ainsi probablement l'agoniste le plus adapté pour la stimulation simultanée des trois isoformes. Il s'agit d'ailleurs de l'agoniste le plus utilisé en recherche



en tant que référence, afin de déterminer l'efficacité relative d'autres agonistes. Pour l'étude du récepteur  $\beta_3$  adrénergique en particulier, le CL316,243 ((R,R)-5-(2-[(2-(3-chlorophényl)-2-hydroxy-éthyl)-amino]propyl)-1,3-benzodioxole-2,2, dicarboxylate) s'avère un agoniste de choix. Il a été utilisé dans de nombreuses études dans des modèles humains (Vrydag and Michel, 2007). Celui-ci est 10 000 fois plus sélectif pour le récepteur  $\beta_3$  que les pour deux autres isoformes du récepteur (Strosberg, 1997).

#### 2.4 Structure des récepteurs adrénergiques $\beta$

Les récepteurs adrénergiques  $\beta$  possèdent la structure typique des RCPGs. Les récepteurs  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  sont composés de 477, 413 et 408 acides aminés, respectivement. Ceux-ci démontrent une homologie assez limitée. L'isoforme  $\beta_3$  possède une homologie de 51% et 46% avec  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , respectivement (Skeberdis, 2004). Le tableau 2 résume les principales différences entre les trois isoformes.

Récepteur	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$
Nombre d'acides aminés	477	413	408
Homologie avec $\beta_3$ AR	51%	46%	100%
Phosphorylation par PKA et GRK2	Oui	Oui	Non
Couplage	$G_s$	$G_s/G_i$	$G_s/G_i$
Effecteur	Adénylate cyclase	Adénylate cyclase	Adénylate cyclase, NO synthase
Localisation principale	Cœur	Poumons	Tissu adipeux

**Tableau 2 : Comparaison entre les trois isoformes  $\beta$  des récepteurs adrénergiques.** (Inspiré de Skeberdis, 2004).

Tous les récepteurs adrénergiques, sauf l'isoforme  $\alpha_{2B}$ , comportent un, ou plus fréquemment, deux sites consensus Asn-X-Ser/Thr pour la N-glycosylation dans leur région N-terminale. Ces sucres peuvent constituer une grande partie de la masse de ces récepteurs: jusqu'à 25%. Ceux-ci jouent probablement un rôle dans leur trafic vers la membrane. Une autre modification commune entre chacune des isoformes, cette fois excluant l'isoforme  $\alpha_{2C}$ , est la palmitoylation. La palmitoylation est l'addition d'un acide gras, comme l'acide palmitique, sur une cystéine située dans la queue cytoplasmique du récepteur. Celle-ci mène ainsi à la formation d'une quatrième boucle intracellulaire. Cette modification semble

influencer l'activité du récepteur: un manque de palmitoylation mène à une augmentation de la phosphorylation constitutive par les protéines régulatrices. Au niveau du couplage aux protéines G, elle peut ou non avoir un impact. La stimulation de l'adénylate cyclase induite par un agoniste chez le récepteur à dopamine D1 et le récepteur à sérotonine 4A n'est pas affectée par la mutation des sites de palmitoylation. Cependant, la stimulation à l'isoprotérénol de l'adénylate cyclase est grandement réduite par une telle mutation chez le récepteur  $\beta_2$  adrénergique. Cette mutation réduit son couplage à  $G_s$ , menant à une déficience au niveau de sa signalisation (Chini and Parenti, 2009). Une dernière modification observée chez beaucoup de RCPGs est le pont disulfure. Celui-ci est présent chez les trois isoformes adrénergiques  $\beta$ . Celles-ci possèdent une cystéine dans leur deuxième domaine extracellulaire, ainsi que trois situés dans leur troisième domaine extracellulaire, où se forme cette liaison. Cette dernière est essentielle pour la liaison des ligands ainsi que pour l'activité des récepteurs. Le pont disulfure possède d'autres rôles critiques pour les RCPGs, comme démontré avec le récepteur PAF (*platelet-activating factor*): la mutation des résidus C90, C95 et C173 mène à une perturbation majeure de l'expression de surface ainsi que de la structure et de la fonction de celui-ci (Gouill *et al.*, 1997). Chez les récepteurs adrénergiques  $\beta$ , il a été démontré que les domaines transmembranaires trois, quatre, cinq et six sont essentiels pour la liaison des ligands, alors que les domaines transmembranaires deux et sept sont impliqués dans l'activation des protéines G (Coman *et al.*, 2008).

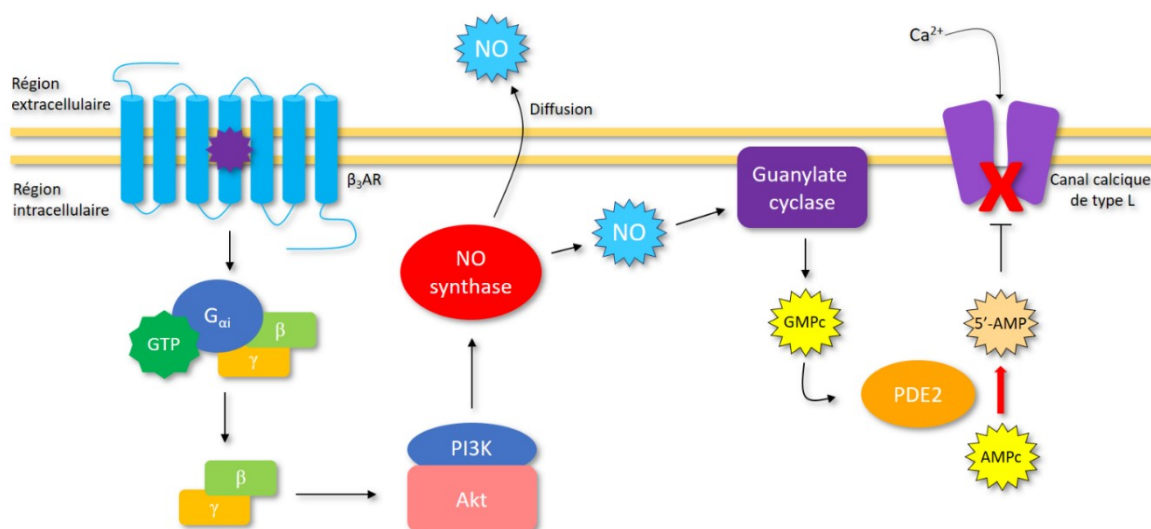
### 2.5 Couplage aux protéines G

Le site d'interaction principal des protéines G avec les récepteurs adrénergiques semble être situé près de la membrane, au niveau des domaines intracellulaires deux et trois, en plus du domaine C-terminal (Strosberg, 1997). Ce couplage entre les différentes isoformes diffère peu. L'isoforme  $\beta_1$  est simplement couplée à  $G_s$ . Pour l'isoforme  $\beta_2$ , il a été démontré qu'elle peut être couplée à  $G_s$  et  $G_i$  (Daaka, Luttrell and Lefkowitz, 1997). C'est aussi le cas pour  $\beta_3$ . Cependant, et contrairement à par exemple  $\beta_2$  dans les fibroblastes, l'activation de la voie ERK1/2 par  $\beta_3$  dans les adipocytes est indépendante de l'AMPC et de PKA. Pour les isoformes  $\beta_2$  et  $\beta_3$ , le couplage entre différentes protéines G semble dépendant du type cellulaire. Par contre, comme dans le cas de  $\beta_3$  dans les adipocytes, le double couplage  $G_s$  et

$G_i$  semble permettre la transduction simultanée de deux voies indépendantes (Soeder *et al.*, 1999).

### 2.6 Le récepteur $\beta_3$ adrénergique

Cette isoforme est le sujet principal de ce projet de recherche. Je décris donc, dans les prochaines lignes, quelques-unes de ses fonctions. Sa fonction la plus connue est la stimulation de la lipolyse et de la thermogénèse au niveau du tissu adipeux brun (Bengtsson, Cannon and Nedergaard, 2000). Ce récepteur est toutefois impliqué dans plusieurs autres mécanismes. Au niveau gastro-intestinal,  $\beta_3$  serait impliqué dans la modulation de la motilité ainsi que dans la protection de la muqueuse intestinale (Anthony *et al.*, 1996; Fletcher *et al.*, 1998). Ce récepteur semble aussi démontrer des effets dans le système nerveux central (SNC) : l'utilisation d'agonistes sélectifs semble avoir un potentiel dans le traitement de l'anxiété et de la dépression (Stemmelin *et al.*, 2008). De plus, l'administration cérébrovasculaire d'agonistes  $\beta_3$  chez le rat mène à l'activation de zones hypothalamiques impliquées dans la régulation centrale de l'appétit (Castillo-Meléndez, McKinley and Summers, 2000). Ce récepteur est aussi exprimé dans les muscles lisses de la vessie, où il médie la relaxation du détrusor, permettant le remplissage de la vessie (Vij and Drake, 2015). Le traitement de la vessie hyperactive est d'ailleurs la seule condition jusqu'à présent pour laquelle des agonistes  $\beta_3$  ont été approuvés pour l'humain (Sacco and Bientinesi, 2012; Keam, 2018). Il comporte aussi un rôle anti-hyperglycémique, via plusieurs mécanismes : stimulation de la sécrétion de l'insuline, augmentation de la sensibilité à l'insuline (via une augmentation de l'expression de transporteurs au glucose ou des récepteurs à l'insuline), diminution de la relâche de glucose par le foie et augmentation de l'utilisation de glucose dans certains tissus, comme le tissu adipeux brun et les muscles squelettiques (Milagro *et al.*, 1999). Finalement, le récepteur  $\beta_3$  adrénergique possède un rôle important dans le cœur. Dans les cellules endothéliales, il est couplé indirectement à l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), via  $G_i$ , menant à la production d'oxyde nitrique, produisant ultimement une relaxation du muscle cardiaque, via inhibition des canaux calciques de type L (figure 4). Cette production d'oxyde nitrique médiée par  $\beta_3$  a aussi été observée dans les myocytes des ventricules (Gauthier *et al.*, 1998).



**Figure 4 : Mécanisme de relaxation du myocarde par le récepteur β<sub>3</sub> adrénergique.** L'activation du récepteur mène à l'activation de la protéine G<sub>αi</sub>, dissociant les unités β et γ, qui vont alors activer les protéines PI3K et Akt. Celles-ci vont par la suite causer l'activation de la NO synthase. L'oxide nitrique produit peut diffuser et se propager dans le muscle, activant la guanylate cyclase. Du GMPC est ensuite produit, activant la PDE2, qui hydrolyse l'AMPc cellulaire en 5'-AMP. Finalement, le canal calcique de type L, normalement activé par la présence d'AMPc, devient inactif, freinant son effet chronotrope et inotrope (Inspiré de Skeberdis, 2004).

### 2.7 Pathophysiologie cardiaque

Les maladies cardiaques sont la première cause de décès dans le monde, et de loin. En 2015, on comptait près de 17.9 millions de décès liés à ces conditions. Il est estimé qu'en 2030 ce nombre grimpe à 22.2 millions (Ruan *et al.*, 2018). Certaines conditions, comme l'hypertension artérielle et la sténose aortique (diminution de l'orifice de sortie du ventricule gauche), peuvent mener à une insuffisance cardiaque. Pour compenser à ce manque, le système sympathique devient suractivé, pour augmenter la capacité inotrope du cœur pour pallier le rendement cardiaque insuffisant. Cette surstimulation adrénergique, lorsque prolongée, mène à un remodelage pathologique du cœur, induisant une détérioration progressive de la structure et de la fonction cardiaque (Cannavo and Koch, 2017). Une telle surstimulation adrénergique mène ainsi à l'hypertrophie cardiaque. Dans cette situation, le muscle cardiaque (surtout au niveau du ventricule gauche) s'épaissit et perd de son élasticité, réduisant le rendement cardiaque. On en revient donc à une insuffisance cardiaque aggravée et le cycle continue. C'est pourquoi la prise en charge des patients atteints de telles conditions est extrêmement importante.

L'hypertrophie cardiaque, au niveau moléculaire, est causée par plusieurs facteurs : une augmentation de la synthèse de protéines, l'hypertrophie cellulaire et la réactivation de gènes fœtaux. Par exemple, on observe une augmentation de l'expression du facteur natriurétique auriculaire (FNA), du peptide natriurétique de type B et de la chaîne lourde de la  $\beta$ -myosine, menant à une croissance cellulaire pathologique (Chen, Yi and Sun, 2014). Au niveau des récepteurs adrénergiques, ce sont les isoformes  $\beta_1$  et  $\beta_2$  qui sont suractivées et qui causent ces phénomènes pathologiques. L'isoforme  $\beta_3$ , quant à elle, démontre un effet opposé : elle induit un effet inotrope négatif, contrant ainsi les effets de la surstimulation adrénergique (Niu *et al.*, 2013). Comme démonstration de ce phénomène, on observe que, chez les souris surexprimant l'isoforme  $\beta_1$ , il y a une grande prédisposition au développement d'hypertrophie cardiaque (Engelhardt *et al.*, 1999). Chez les souris surexprimant  $\beta_2$ , on obtient un phénotype plus modéré, avec un remodelage cardiaque plus tardif, mais seulement à de très hauts taux d'expression du récepteur (Du *et al.*, 2000). La troisième isoforme  $\beta$  mène à un effet totalement opposé : les souris surexprimant cette dernière sont clairement protégées de l'hypertrophie cardiaque (Belge *et al.*, 2014). Ainsi, il y a certains mécanismes endogènes qui aident à contrer ce phénomène, en influençant ces récepteurs. Premièrement, dans un cas d'insuffisance cardiaque et de surstimulation adrénergique, les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  sont exprimés à la baisse, avec en plus une augmentation de leur phosphorylation par PKA et GRK2, favorisant leur internalisation. Dans le cas de l'isoforme  $\beta_3$ , on observe une augmentation de l'expression de celle-ci, de deux à trois facteurs (Skeberdis, 2004). Du côté de la pharmacologie, on utilise classiquement des  $\beta$ -bloqueurs, en visant les deux autres isoformes, mais surtout  $\beta_1$ , avec l'arrivée de  $\beta$ -bloqueurs de deuxième génération. D'autres approches utilisant des agonistes  $\beta_3$ -spécifiques ont de plus démontré un bon potentiel dans le traitement de cette maladie (Balligand, 2016).

### 2.8 Les adipocytes

Chez les mammifères, on retrouve deux types de tissu adipeux: blanc et brun. Le tissu adipeux blanc est principalement une réserve de gras et se présente sous forme de grosses gouttelettes. Le tissu adipeux brun, quant à lui, constitue aussi une réserve de gras, mais est en plus le site principal de la thermogénèse, où les acides gras sont convertis en chaleur. Il est composé de petites gouttelettes multiloculaires, avec une couleur plus prononcée,

témoignant de sa haute teneur en mitochondries (Strosberg, 1997). Tous les récepteurs adrénergiques  $\beta$  sont présents dans ces tissus, mais l'isoforme  $\beta_3$  est de loin la plus présente. Chez les rongeurs, cette dernière est retrouvée dans le tissu adipeux blanc et brun. Chez l'humain, par contre, elle est majoritairement présente dans le tissu brun et peu présente dans le blanc (Krief *et al.*, 1993). Une autre différence observée entre l'humain et les rongeurs est la présence du tissu adipeux brun en fonction de l'âge. Celui-ci demeure présent chez les rongeurs d'âge adulte, alors qu'il disparaît chez l'humain quelques semaines après la naissance. On observe toutefois une réapparition de ce tissu dans les mêmes régions (périrénale et intrascapulaire) que les nouveau-nés chez des bûcherons travaillant dans des conditions extrêmement froides. Chez les rongeurs, il a été démontré que le récepteur  $\beta_3$ , couplé à  $G_s$ , active l'adénylate cyclase, produisant l'AMPc, et mène à la phosphorylation de la lipase hormonosensible, qui est responsable de la lipolyse des triglycérides. Dans le tissu adipeux blanc, ces acides gras libres sont réassemblés en triglycérides ou relâchés par voie sanguine. Dans le tissu adipeux brun, ceux-ci sont oxydés en  $CO_2$  et en eau, un processus exothermique (Strosberg, 1997). Toujours chez les rongeurs, l'utilisation d'agonistes  $\beta_3$ -sélectifs augmente significativement la dépense énergétique et diminue l'obésité (Lowell and Flier, 2015).

Les fonctions du  $\beta_3AR$  sont nombreuses. Il serait donc intéressant de développer de nouveaux moyens de moduler son activité au niveau des différents tissus où il est localisé. Comme mentionné précédemment, ce récepteur est le moins bien caractérisé des isoformes  $\beta$  adrénergiques. Nos essais de spectrométrie de masse ont permis d'identifier un nouveau partenaire d'interaction potentiel de ce récepteur : PRMT5. Considérant ses rôles dans la modulation de plusieurs mécanismes cellulaires, son implication dans la régulation du  $\beta_3AR$  pourrait être significative. La prochaine section porte donc sur la nature et les différentes fonctions des PRMTs, avec une emphase particulière sur l'isoforme PRMT5.

### 3. Les PRMTs (Protein Arginine Methyltransferases)

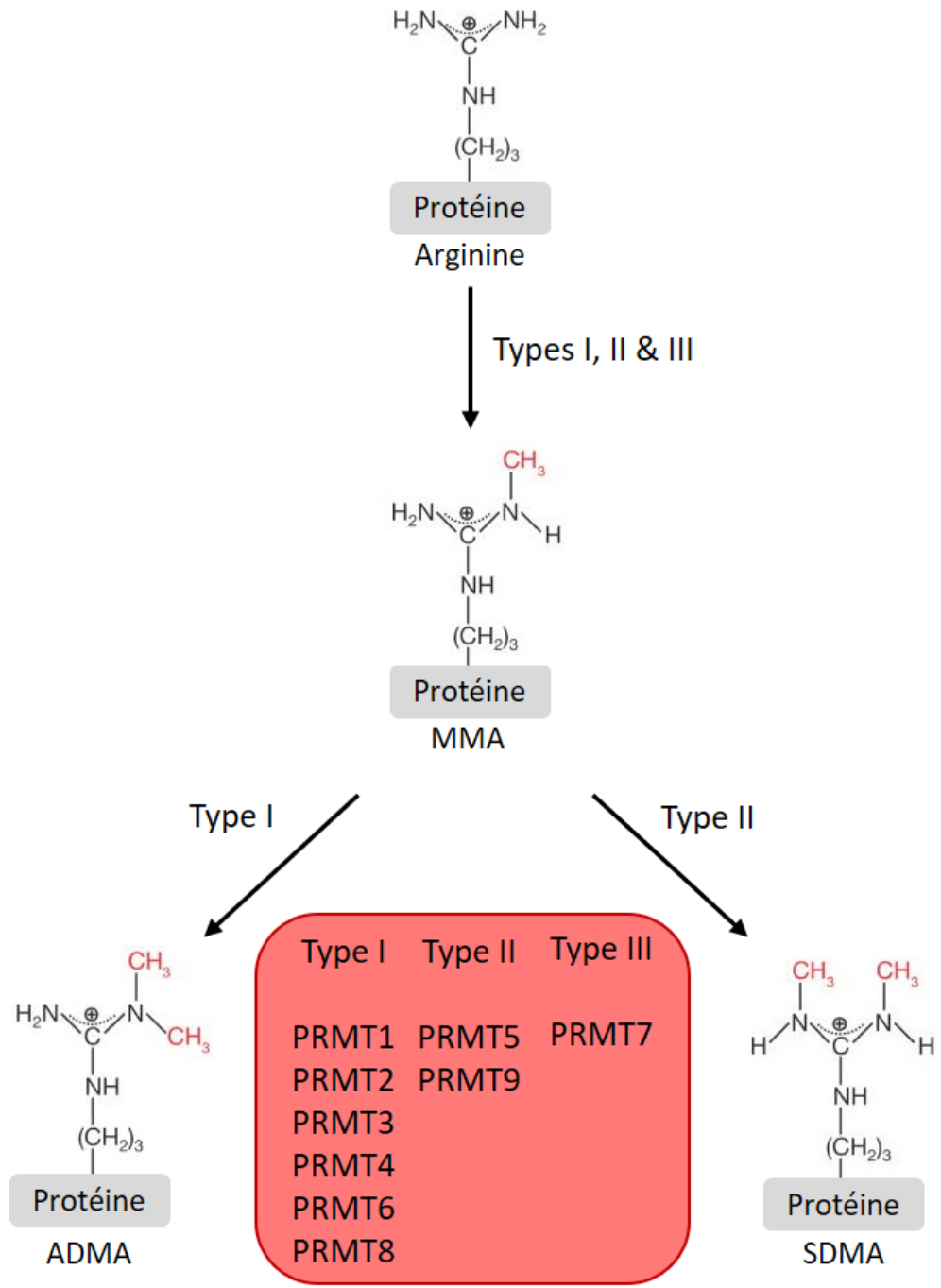
Les PRMTs, ou *Protein Arginine Methyltransferases*, sont les enzymes qui catalysent l'addition de groupements méthyles sur les arginines d'une foule de protéines. Parce qu'elle change la nature des résidus arginines, cette modification post-traductionnelle permet de

réguler plusieurs processus cellulaires importants, comme l'expression des gènes, la médiation au dommage de l'ADN, la signalisation et bien d'autres. Je décrirai dans les prochaines pages les différentes isoformes des PRMTs, ainsi que leur rôle, fonctionnement et impacts sur l'organisme.

### 3.1 Classification des PRMTs

C'est en interagissant avec leur substrat ainsi que leur cofacteur, la S-adénosyl méthionine (SAM), que les PRMTs méthylent les arginines. Ces enzymes transfèrent le groupe méthyle de leur cofacteur vers les groupements guanidines des arginines de leurs substrats. Il en résulte alors d'une arginine méthylée, en plus de S-adénosyl homocystéine, ou SAH (Fulton, Brown and Zheng, 2018).

Chez l'humain, il existe neuf PRMTs, classées en trois groupes, soient les types I, II et III. Tous les types peuvent catalyser la formation de  $\omega$ -NG-monométhylarginine, ou « MMA », mais elles ne peuvent pas toutes catalyser la diméthylation. Les PRMTs de type I (PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4 (aussi connue sous CARM1), PRMT6 et PRMT8) peuvent donc, en plus de pouvoir monométyler, catalyser la formation de  $\omega$ -N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-diméthylarginine, ou « ADMA ». Cette marque est en fait une méthylation asymétrique, où les groupes méthyles sont ajoutés sur le même atome d'azote (figure 5). Les PRMTs de type II (PRMT5 et PRMT9), quant à elles, catalysent la formation de  $\omega$ -N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-diméthylarginine, qui constitue la réaction de méthylation symétrique, ou « SDMA ». Dans ce cas, le groupe méthyle est déposé sur l'autre atome d'azote terminal du groupement guanidine, suivant la monométhylation. Finalement, le type III comprend PRMT7, qui est restreinte à la monométhylation seulement (Bedford and Clarke, 2009). Il existe un quatrième type de PRMT, qui n'a été identifié que chez la levure à ce jour. Ce type de PRMT catalyse l'addition de marque  $\delta$ -N<sup>G</sup>-monométhylarginine, où c'est l'atome d'azote  $\delta$ , soit celui lié à la chaîne aliphatique de l'arginine, qui est marqué (Niewmierzycka and Clarke, 1999).



**Figure 5 : Les trois types de méthylation des arginines chez les eucaryotes.** Les trois types de PRMTs catalysent d’abord l’addition d’un groupement méthyle sur un des azotes terminaux du groupement guanidine du résidu. Par la suite, les PRMTs de type I et II catalysent l’addition d’un deuxième groupement méthyle, de façon asymétrique et symétrique, respectivement (Adapté de Bedford and Clarke, 2013).



### 3.2 La méthylation des arginines

La série d'expérimentations qui a mené à la découverte de la méthylation des arginines s'est déroulée il y a de cela 52 ans. Le sujet de recherche était l'étude des produits méthylés d'une enzyme de thymus de veau. Cette enzyme est maintenant connue sous le nom de PRMT1. Durant ces mêmes démarches, Paik et Kim déterminaient que le résidu arginine est un accepteur de groupe méthyle (Paik and Kim, 1968). La méthylation est une modification post-traductionnelle qui permet de changer les propriétés de ces résidus arginines, menant à la modulation d'une multitude de mécanismes. Cette modification est de plus très commune. En fait, on estime qu'elle est retrouvée aussi fréquemment que la phosphorylation et l'ubiquitination (Larsen *et al.*, 2016). Comme mentionné précédemment, c'est la famille des PRMTs qui est responsable de la méthylation des arginines. Il est estimé que ces enzymes sont ainsi responsables de la méthylation de 1% des arginines peptidiques au niveau cellulaire (Bulau *et al.*, 2006). On ne compte malgré cela que neuf membres dans la famille des PRMTs, alors que l'on compte des centaines de kinases et E3 ubiquitine ligases.

### 3.3 Les arginines

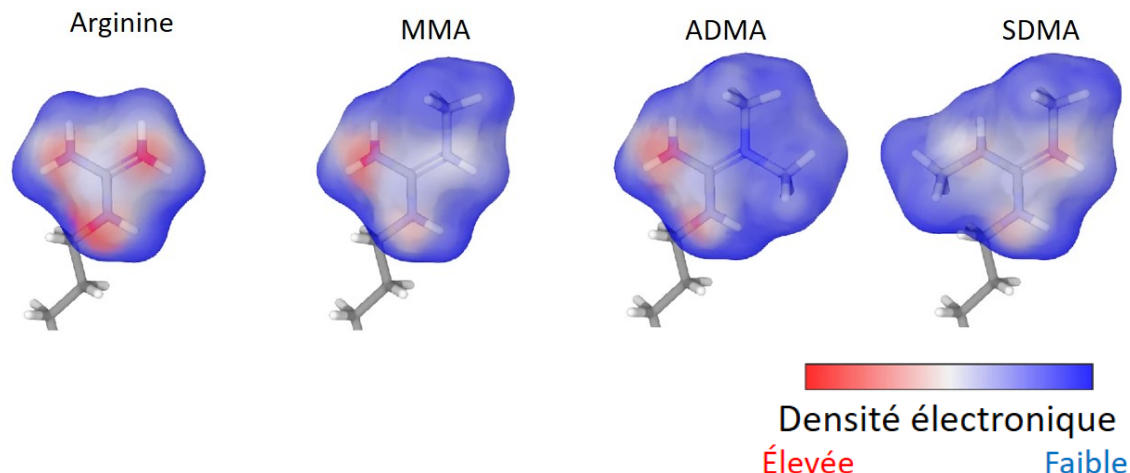
La chaîne latérale des arginines est composée d'une chaîne aliphatique de trois carbones ( $C_\beta$ ,  $C_\gamma$  et  $C_\delta$ ) et d'un ion guanidium terminal (composé d'un atome de carbone et de trois atomes d'azote;  $N_\delta$ ,  $C_\epsilon$  et  $N_\omega/N\omega'$ ), responsable des propriétés particulières du résidu. Ce groupement ionique reste protoné à pH physiologique, avec un pKa de 14, qui est en fait le plus élevé de tous les acides aminés (Evich *et al.*, 2015). Cette structure permet à l'arginine de former des ponts salins (ou liaisons ioniques) et d'être donneur dans jusqu'à cinq liaisons hydrogène. Les électrons de l'ion guanidium sont de plus délocalisés en orbitales  $\pi$ , permettant des interactions  $\pi$ - $\pi$  intermoléculaires (Lorton and Shechter, 2019). Dans les complexes protéine-ADN, les arginines sont les donneurs de liaison hydrogène les plus fréquents aux groupes phosphates du squelette de sucres de l'ADN, ainsi qu'aux thymines, adénines et guanines (Luscombe, Laskowski and Thornton, 2001). Les résidus arginine peuvent de plus former des réseaux de liaisons hydrogène avec des groupes phosphate adjacents des boucles d'ARN (Calnan *et al.*, 1991). En ce qui a trait aux interactions protéine-protéine, on peut noter que l'interaction composée de deux liaisons

hydrogène entre les arginines et les aspartates est particulièrement stable (Mitchell *et al.*, 1992). Avec ses propriétés distinctives, l'arginine est un acide aminé clé dans la médiation des interactions protéine-protéine et protéine-acide nucléique.

#### 3.4 Effets de la méthylation des arginines

L'addition de groupements méthyles sur une arginine réduit le potentiel électrostatique de surface et change la taille et l'hydrophobicité du résidu (Bedford and Clarke, 2009). La principale conséquence de la méthylation des arginines est la modulation de ses capacités d'interaction. L'ajout de ces groupements va affecter les interactions avec les accepteurs de liaison hydrogène de partenaires d'interaction, en enveloppant la charge positive du résidu. La méthylation cause ainsi surtout un changement dans la densité électronique du groupement guanidine (figure 6). Cela n'affecte toutefois pas la charge totale du résidu, ni son pKa de façon significative. Sachant que l'arginine possède cinq potentiels donneurs de liaison hydrogène, on peut apprécier l'impact de cette modification (Fuhrmann, Clancy and Thompson, 2015). Il est toutefois bien de mentionner un autre type de liaison hydrogène, devenant récemment populaire dans la littérature; la liaison CH...O. Selon ce principe, l'addition d'un groupement méthyle pourrait en fait augmenter le nombre de liaisons hydrogène possibles, quoique celles-ci sont beaucoup plus faibles que les liaisons hydrogène classiques (Desiraju, 2005).

La méthylation des histones par les PRMTs est bien décrite et constitue un de leurs rôles les plus importants. Cette méthylation affecte l'état de la chromatine et donc le niveau d'expression de gènes. Certaines marques de méthylation encouragent sa décompaction, rendant l'ADN plus accessible et l'expression des gènes plus aisée. D'autres marques encouragent la compaction de la chromatine et rendent l'expression des gènes plus difficile. Tout dépend de la nature des marques et de leur positionnement sur les histones (Li *et al.*, 2019). Celles-ci sont souvent décrites avec une nomenclature bien précise. Par exemple, la marque H3R2me2s décrit une diméthylation symétrique (me2s) de l'histone H3, sur la deuxième arginine (R2).



**Figure 6 : Modélisation de l'effet de la méthylation sur la densité électronique des arginines.** Une monométhylation (ajout d'un groupement méthyle sur un azote terminal), diméthylation asymétrique (ajout de deux groupements méthyle sur un seul des deux azotes terminaux) ou une diméthylation symétrique (ajout d'un groupement méthyle sur chacun des deux azotes terminaux) affectent de façon spécifique la localisation des électrons du groupement guanidine de l'arginine. Cela a comme conséquence de modifier les capacités d'interaction du résidu (Adapté de Lorton and Shechter, 2019. Permission d'utilisation de la figure obtenue de [Cellular and Molecular Life Sciences](#)).

Le type de méthylation peut ainsi dans bien des cas déterminer l'effet. Par exemple, et ce sur le même résidu, une diméthylation symétrique peut donner un effet différent d'une diméthylation asymétrique, voire opposé. Par exemple, H4R3me2a, catalysée par PRMT1, mène à une activation de la transcription des gènes, alors que H4R3me2s, par PRMT5, mène à une répression transcriptionnelle (Sun *et al.*, 2011). Finalement, la méthylation peut moduler d'autres modifications post-traductionnelles. PRMT1 est connue pour méthyler des arginines situées dans des motifs de phosphorylation de certains facteurs de transcription, bloquant ainsi leur activation (Yamagata *et al.*, 2008).

Souvent, la méthylation a lieu dans les séquences riches en glycine et en arginine. Il semble que la plupart des PRMTs aient une grande affinité pour ces motifs GAR (glycine-arginine-riche). Par contre, il a été démontré dans bien des cas que la méthylation peut se produire en l'absence de motif quelconque (Bedford and Clarke, 2009).

Un concept important au niveau de la modulation de l'expression des gènes est la fonction lire, écrire, effacer (*read, write, erase*) de protéines agissant sur les histones. Comme mentionné, la compaction de la chromatine affecte la capacité de la cellule à exprimer ses gènes. Des enzymes possédant la fonction « écrire » peuvent catalyser l'addition de modifications post-traductionnelles sur les histones, pouvant influencer la capacité de la chromatine à se compacter. Dépendamment de la nature et de la position de ces modifications, certaines protéines ont la capacité de les « lire », permettant l'augmentation ou la diminution de la transcription de gènes clés. Ainsi, les PRMTs ont la fonction « d'écrire » (catalyser l'addition de groupements méthyles) sur les histones. Par exemple, les marques H4R3me2a et H3R17me2a, laissées par PRMT1 et PRMT4 respectivement, mènent au recrutement de la protéine TDRD3, une protéine contenant un domaine Tudor, qui « lie » ces marques de méthylation et recrute l'ADN topoisomérase III, menant ultimement à la transcription de gènes (Jarrold and Davies, 2019). La fonction « effacer » est attribuée aux enzymes ayant la capacité de retirer les différentes modifications post-traductionnelles sur les histones. Dans le cas des PRMTs, ce rôle serait occupé par les arginine déméthylases, qui sont décrites brièvement dans la prochaine section. Leur existence est cependant controversée. Les histone désacétylases (*HDACs*) sont bien caractérisées et sont donc un bon exemple de protéines ayant une telle fonction. L'acétylation des histones permet la décompaction de la chromatine, en retirant la charge positive de la queue des histones, réduisant leur capacité d'interaction avec les groupes phosphates chargés négativement de l'ADN. Cette décompaction permet un meilleur taux de transcription des gènes. Les histone désacétylases retirent donc l'acétylation des histones, compactant la chromatine et inhibant la transcription des gènes (Haberland *et al.*, 2009). Bien que ceci soit un mécanisme très étudié depuis un bon nombre d'années, des avancées récentes démontrent de plus en plus le rôle important des PRMTs dans la modulation de l'expression des gènes.

### 3.5 Déméthylation

La déméthylation des arginines semble encore être un sujet peu compris et controversé. Plusieurs lysine déméthylases ont cependant été identifiées. Le mécanisme enzymatique de déméthylation des lysines étant très proche de celui des arginines, il est bien possible que ces enzymes puissent aussi agir sur ces résidus. En effet, KDM3A, KDM4E et

KDM5C, toutes des lysine déméthylases, semblent avoir une capacité de déméthylation des arginines *in vitro* (Walport *et al.*, 2016). Elles semblent cependant favoriser les lysines dans ces conditions. Cela lève donc la question, qu'en est-il de leur activité *in vivo*? D'autres études seront nécessaires pour y répondre.

### 3.6 PRMT1

La *Protein Arginine Methyltransferase 1* est la PRMT la plus prévalente, et de loin. En fait, elle est responsable de jusqu'à 85% de l'activité arginine méthyltransférase totale dans la cellule. Il s'agit donc d'une isoforme très importante pour le fonctionnement cellulaire (Li *et al.*, 2019). Il n'est d'ailleurs pas surprenant qu'une délétion totale de PRMT1 au niveau embryonnaire soit létale. La PRMT1 est ainsi la principale enzyme menant à la génération de diméthylation asymétrique, ou ADMA. Cette méthylation est majoritairement laissée sur les motifs glycine-arginine-riches, tels que RGG/RG, malgré qu'il y ait de nombreuses exceptions à la règle.

PRMT1 fonctionne sous forme d'homodimère et semble avoir une activité hautement dépendante de deux de ses méthionines, soit M48 et M155. La mutation de ces deux résidus mène à une abolition de l'activité catalytique ainsi qu'une altération de la sélectivité du substrat (Blanc and Richard, 2017). Il existe plusieurs variants de PRMT1, sept plus précisément, qui possèdent chacun un domaine N-terminal différent, suggérant une sélectivité au substrat qui est propre à chacun. L'expression de ces variants, régulée par des processus d'épissage alternatif, est probablement un mécanisme de régulation important de l'activité méthyltransférase de PRMT1 (Goulet *et al.*, 2007).

Un des rôles les plus connus de PRMT1 est la modulation de la transcription des gènes. Plus particulièrement, elle méthyle l'histone H4 (H4R3me2a) et agit ainsi à titre de coactivateur de la transcription de gènes (Bedford and Clarke, 2009). Elle méthyle aussi des protéines impliquées dans la liaison à l'ARN et le dommage à l'ADN afin de moduler le métabolisme de l'ARN et de maintenir la stabilité génomique (Auclair and Richard, 2013). PRMT1 peut aussi moduler d'autres modifications post-traductionnelles. La diméthylation asymétrique aux sites RxRxxS/T peut bloquer la phosphorylation, comme démontré dans le

cas de la protéine *BCL-2 antagonist of cell death* (BAD), où sa méthylation empêche sa phosphorylation et conséquemment son inactivation par Akt (Sakamaki *et al.*, 2011).

De nombreux liens entre les maladies neurodégénératives et la méthylation des arginines ont été faits durant les dernières années (Tradewell *et al.*, 2011). PRMT1 a cependant été démontrée comme essentielle au développement du système nerveux central. La déplétion de cette dernière dans ce système mène à la mort deux semaines après la naissance chez la souris. Plus spécifiquement, celles-ci présentent une réduction significative de la matière blanche ainsi qu'une ablation quasi complète de la myélination au niveau du système nerveux central (Hashimoto *et al.*, 2016). PRMT1 est aussi impliquée au niveau du système immunitaire. Par exemple, dans la différenciation des cellules B, qui sont responsables de la production d'anticorps (Infantino *et al.*, 2010). Celle-ci a de plus une implication établie dans le cancer : elle a la capacité de méthyler l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) sur son domaine extracellulaire dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, avant son export vers la membrane cellulaire. Lorsque localisé à la membrane, l'EGFR méthylé a alors une meilleure capacité à lier ses ligands et s'activer. Cette suractivation mène à une prolifération cellulaire soutenue. Chez la souris, l'EGFR muté pour empêcher la méthylation montre une réduction de la croissance tumorale colorectale (Liao *et al.*, 2015).

### 3.7 PRMT2

PRMT2 a été démontrée comme étant un répresseur de l'activité transcriptionnelle (Ganesh *et al.*, 2006). L'expression de PRMT2 est augmentée dans des conditions hypoxiques et diminuée dans des conditions de glucose élevé (Blanc and Richard, 2017). Celle-ci comporte un domaine SH3 (*Src Homology 3*), lui conférant une certaine sélectivité pour ses interactions protéine-protéine (Hou *et al.*, 2018). Contrairement à PRMT1, PRMT2 n'est pas essentielle pour la survie des souris. Chose intéressante, les souris mutantes PRMT2 KO sont minces et résistantes à l'obésité causée par l'alimentation. Celles-ci présentent des niveaux de leptine sérique réduits et sont sensibles à l'administration de leptine (Iwasaki *et al.*, 2011).

### 3.8 PRMT3

Cette isoforme comporte une caractéristique unique; la présence d'un doigt de zinc situé en N-terminal. C'est cette structure qui lui confère sa spécificité au substrat. Ce domaine particulier n'est pas requis pour la méthylation de substrats *in vitro*, mais est requis pour la reconnaissance de substrats liés à l'ARN, comme démontré dans des extraits cellulaires RAT1 (Frankel and Clarke, 2000). PRMT3 méthyle des protéines ribosomales, comme rpS2, une des composantes de la sous-unité 40S des ribosomes. Elle est ainsi retrouvée majoritairement dans le cytosol, associée aux ribosomes, probablement via son interaction avec celle-ci. Les embryons de souris déplétés en PRMT3 sont viables, mais ont un retard au niveau de leur développement, menant à une taille inférieure à la moyenne après la naissance. Ces mêmes souris atteignent toutefois une taille normale à l'âge adulte (Swiercz *et al.*, 2007). Son activité méthyltransférase est régulée par des protéines telles DAL-1 (*differentially expressed in adenocarcinoma of the lung*)/4.1B. Cette dernière n'est pas un substrat pour PRMT3, mais elle diminue significativement son activité *in vitro* ainsi que *in cellulo* (Singh *et al.*, 2004). PRMT3 possède une répartition inégale dans les neurones, ce qui suggère une fonction spécifique dans les circuits neuronaux liés aux fonctions motrices et limbiques, puisque son expression est plus élevée dans ces zones (Ikenaka *et al.*, 2006). De plus, PRMT3 peut réguler la lipogenèse via une interaction avec LXR $\alpha$  (*liver X receptor*  $\alpha$ ). Une surexpression de PRMT3 a été associée à la stéatose hépatique non alcoolique (D. Kim *et al.*, 2015).

### 3.9 PRMT4

PRMT4 est souvent référée par son autre nom, CARM1 (*coactivator associated arginine methyltransferase 1*). Elle est connue pour lier les coactivateurs SRC1 à 3 (*steroid receptor coactivator*) ainsi que pour avoir une activité coactivatrice transcriptionnelle, d'où son nom (Cheng *et al.*, 2007). Vu qu'elle est de plus la quatrième PRMT ayant été décrite, on l'appelle aussi PRMT4. Comme mentionné, CARM1 est connue pour sa fonction de cofacteur de transcription. Son activité est régulée entre autres par l'activité de l'acétyltransférase CBP/p300. Cette dernière catalyse l'acétylation de l'histone H3 à la lysine 18 et subséquentement à la lysine 23, menant au recrutement de CARM1, menant à la méthylation de l'arginine 17. CARM1 peut aussi méthyle l'arginine 26 de l'histone H3, en

plus de méthyler et de recruter directement des facteurs de transcription, menant à la potentialisation de ce dernier mécanisme (Cheng *et al.*, 2007). Elle a aussi un rôle dans la régulation de l'ARN messager: elle peut s'associer avec UPF1 et la recruter aux transcrits contenant un codon de terminaison prématuré, pour dégradation (Sanchez *et al.*, 2016). La spécificité de CARM1 pour ses substrats peut être déterminée par deux mécanismes; son autométhylation ainsi que sa N-acétylglucosaminidation, une forme de glycosylation (Charoensuksai *et al.*, 2015).

La délétion de CARM1 n'est pas viable. Les souris CARM1 KO naissent plus petites et meurent peu après leur naissance. Finalement, CARM1 promeut la progression tumorale et la formation de métastases en méthylant l'arginine 1064 du facteur de remodelage de la chromatine BAF155. Cette méthylation promeut aussi l'expression d'oncogènes comme ceux impliqués dans la voie c-Myc (Wang *et al.*, 2014).

### 3.10 PRMT6

Étant principalement localisée au noyau, PRMT6 est généralement associée à une répression de la transcription des gènes, via sa marque diméthyle asymétrique sur H3R2. Celle-ci méthyle plus spécifiquement les arginines aux séquences consensus RGG/RG mais a aussi la capacité particulière de pouvoir méthyler les arginines flanquées de résidus chargés sur des séquences qui ne sont pas glycine-arginine-riches (Neault *et al.*, 2012). PRMT6 possède aussi la capacité de s'autométyler; cela a pour effet d'augmenter sa stabilité. Cette modification post-traductionnelle semble aussi indispensable pour son activité antirétrovirale. En effet, PRMT6 a démontré une capacité à inhiber la réplication du virus HIV-1 en méthylant directement et interférant avec les fonctions de plusieurs protéines virales, comme Tat, Rev et NC, protéines composant la capsid du virus (Singhroy *et al.*, 2013). PRMT6 comporte aussi un rôle dans la prolifération et la régulation de la sénescence cellulaire, suggérant que, comme PRMT7, elle pourrait jouer un rôle dans le vieillissement (Blanc and Richard, 2017). PRMT6 est aussi impliquée dans certaines maladies à séquences de polyglutamines répétées, comme la maladie d'Huntington, l'atrophie musculaire spinobulbaire et l'ataxie spinocérébrale. (Scaramuzzino *et al.*, 2015).



Les souris n'exprimant pas PRMT6 sont viables. Elles ne semblent pas présenter de défaut au niveau physiologique non plus (Neault *et al.*, 2012). Chez le poisson-zèbre, un modèle animal de plus en plus utilisé, on observe qu'une perte de fonction de PRMT6 mène à des défauts au niveau du développement embryonnaire. Cela est dû à une activation de la voie p38/JNK, menant à l'apoptose. Chez cet animal, on observe alors que PRMT6 est requise durant les phases de développement initiales (X. X. Zhao *et al.*, 2016).

### 3.11 PRMT7

Catalysant seulement une réaction de monométhylation sur l'azote terminal des résidus arginines, PRMT7 est la seule PRMT de type III. Celle-ci présente une forte préférence pour les motifs RXR flanqués de résidus basiques (Feng *et al.*, 2013). Ce type de méthylation semble être dû à la taille réduite du site catalytique de PRMT7. En effet, en comparant les structures des différentes PRMTs, on observe que PRMT7 possède une poche catalytique beaucoup plus étroite que dans le cas des types I et II, avec des liens hydrogène et des interactions de type cation- $\pi$  encombrants, qui semblent empêcher PRMT7 d'accepter un résidu arginine précédemment monométhylé dans son site catalytique, empêchant la diméthylation. Dans le cas des PRMTs de type I, on observe une région plus ouverte autour de la double hélice E (pour Glu), ainsi qu'une région encombrée autour de la boucle THW (Thr-His-Trp). Chez les PRMTs de type II, on observe une configuration opposée (Jain *et al.*, 2016). En fait, il est même possible, en mutant deux résidus contenus dans la boucle THW de PRMT7, de transformer l'enzyme en une PRMT de type I ou II (Debler *et al.*, 2016).

Nous savons maintenant que PRMT7 possède une activité non redondante avec les autres PRMTs, qui elles sont aussi capables de monométhylation, étape précédant la diméthylation. Par exemple, PRMT7 méthyle des résidus qui diffèrent de ceux ciblés par PRMT5 sur les queues des histones. En fait, il s'avère que la marque de monométhylation laissée par PRMT7 sur le résidu R17 de la queue N-terminale de l'histone H4 non seulement augmente drastiquement la méthylation du résidu R3 par PRMT5, mais change aussi la conformation peu active de PRMT5 à hautement active via régulation allostérique. Ainsi, la marque H4R17 produite par PRMT7 agit à titre d'activateur allostérique de l'activité de PRMT5. PRMT7 semble aussi avoir un pouvoir régulateur au niveau de PRMT1; la même

monométhylation du résidu R17 sur l'histone H4 mène à une stimulation de l'activité de PRMT1, quoique cet effet soit bien moindre lorsque comparé au cas de PRMT5 (Jain, Jin and Clarke, 2017). Une telle action par PRMT7 pourrait donc potentiellement avoir un rôle dans la régulation d'autres PRMTs, étendant son rôle dans une panoplie de mécanismes.

PRMT7 a aussi bien d'autres rôles. Elle a tout d'abord été identifiée dans un contexte où sa déplétion menait à une augmentation de la sensibilité aux inhibiteurs de la topoisomérase de type II. Elle est connue pour médier la régulation transcriptionnelle, la biogenèse des snRNPs et l'épissage alternatif (Gros *et al.*, 2006). Elle a de plus démontré un rôle dans le vieillissement.

Une délétion de PRMT7 peut être viable. Il existe 3 allèles indépendants pour PRMT7; la survie dépend cependant de l'allèle affecté et de la lignée testée chez la souris, par exemple. Chez des souris C57BL/6, en ciblant l'exon 4 pour dépléter PRMT7, on observe des retards au niveau du développement peu après la naissance, démontrés par une taille réduite, qui est par la suite rectifiée à l'âge adulte. Des signes d'obésité sont aussi observés, accompagnés par des signes de vieillissement prématuré, caractérisés par une perte de masse musculaire. Cette perte musculaire correspond à la baisse d'expression observée naturellement avec l'âge, ce qui mène à penser que PRMT7 pourrait jouer un rôle dans le maintien de la musculature et serait une voie intéressante à explorer en ce qui a trait aux dystrophies musculaires (Blanc *et al.*, 2016).

### 3.12 PRMT8

Comme PRMT7, PRMT8 est plutôt particulière, pour deux raisons principales. Premièrement, et contrairement aux autres PRMTs, PRMT8 n'est pas ubiquitaire. Cette dernière est en effet exclusive au système nerveux central (Kousaka *et al.*, 2009). Deuxièmement, PRMT8 est ancrée à la membrane via une myristoylation au niveau de son domaine N-terminal. Il s'agit donc de la seule PRMT qui est associée à la membrane (Taneda *et al.*, 2007). Cette modification rend alors son étude difficile, puisque celle-ci ne peut être extraite sous forme soluble. Son domaine N-terminal contient de plus deux séquences riches en prolines pouvant lier certains domaines SH3, incluant celui de PRMT2 (Pahlich, Zakaryan

and Gehring, 2008). La liaison de ce domaine par des partenaires d'interaction pourrait possiblement résulter en une activation de PRMT8 et/ou en un changement de localisation cellulaire.

Les souris n'exprimant pas PRMT8 sont viables (Simandi *et al.*, 2018). L'expression de cette enzyme est induite durant la différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules progénitrices neurales (Solari *et al.*, 2016). PRMT8 ayant une capacité d'activité identique à celle de la phospholipase D, son absence peut causer des complications. Sans cette activité, l'arborisation dendritique des neurones de Purkinje est affectée, menant à une altération de la structure du cervelet. Chez les souris, cela mène à une capacité motrice réduite ainsi que de l'hyperactivité (J. Kim *et al.*, 2015).

### 3.13 PRMT9

Comme PRMT5, PRMT9 est une méthyltransférase de type II, menant à la méthylation symétrique des arginines (SDMA). Malgré cela, celle-ci a été démontrée comme non redondante avec l'activité de PRMT5. Elle n'a cependant probablement pas autant de substrats que PRMT5. PRMT9 peut réguler l'épissage alternatif en méthylant SAP145 (*spliceosome-associated protein 145*). Une réduction de l'expression de PRMT9 peut donc influencer significativement les résultats d'épissage. SAP145 interagissant avec la protéine SMN (*survival motor neuron*), il a été suggéré que PRMT9 ait un rôle dans certaines maladies neurodégénératives (Yang *et al.*, 2015). Il est intéressant de noter qu'une mutation de la cystéine 431 en histidine dans la boucle THW transforme l'enzyme de type II en enzyme de type III, la rendant apte à seulement catalyser la monométhylation, comme l'unique PRMT7 (Jain *et al.*, 2016).

## 4. PRMT5

Cette enzyme, qui est l'un des sujets principaux de cette étude, est la principale PRMT de type II, menant à la diméthylation symétrique des arginines. Elle est généralement associée à une répression de la transcription des gènes, via sa capacité de méthylation des histones. Elle est aussi impliquée dans la régulation d'une foule de mécanismes, comme la progression du cycle cellulaire, la prolifération, le métabolisme de l'ARN et l'assemblage des ribosomes, pour en nommer quelques-uns (Bedford and Clarke, 2009). Dans les prochaines pages, je décris plus en profondeur les nombreuses propriétés de cette enzyme.

### 4.1 Les différentes fonctions de PRMT5

PRMT5 fut initialement identifiée comme interagissant avec *Jak2* (*Janus tyrosine kinase 2*) et est ainsi communément appelée JBP1, ou *Jak-binding protein 1* (Jing *et al.*, 2018). Elle est la PRMT de type II la plus conservée chez les eucaryotes. Celle-ci méthyle principalement dans les séquences glycine-arginine riches, mais aussi en l'absence de motif (Likhite *et al.*, 2015). Comme PRMT1, elle est responsable de la modulation d'un nombre impressionnant de processus cellulaires. Je décris dans les prochaines lignes quelques-uns de ceux-ci.

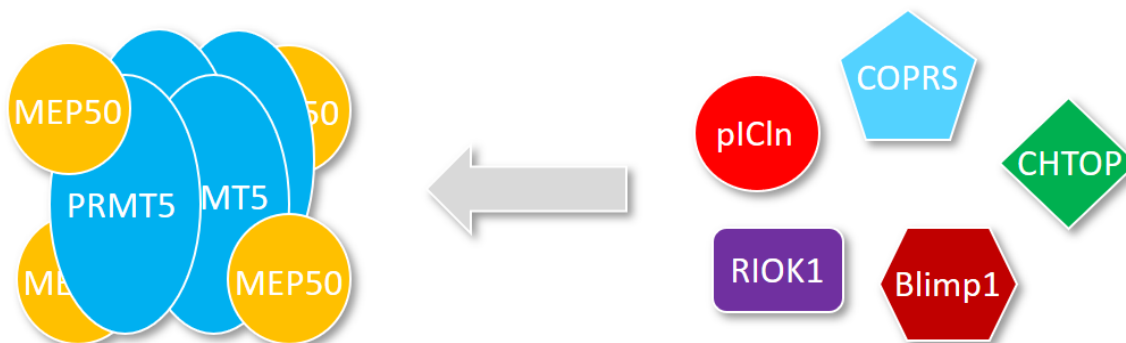
PRMT5 est localisée au niveau du cytoplasme et du noyau et méthyle une foule de protéines impliquées dans divers processus cellulaires, comme la régulation de la transcription, le métabolisme de l'ARN, la genèse des ribosomes, la maintenance de la structure de l'appareil de Golgi et la progression du cycle cellulaire (Chen, Yi and Sun, 2014). Une de ses fonctions les plus importantes et les plus décrites est au niveau de la méthylation des histones. PRMT5 catalyse la méthylation symétrique aux sites H4R3 et H3R8, menant à une répression de la transcription. Cette méthylation des histones est une des composantes majeures de la régulation épigénétique et est décrite un peu plus loin. Parmi les gènes spécifiquement réprimés, on compte la cycline E, la protéine Rb, ainsi que certaines protéines ribosomales (Ho *et al.*, 2013). Cette inhibition peut ainsi grandement influencer les mécanismes cellulaires. La marque H3R2me2s, quant à elle, mène à une activation de la transcription de gènes. Par exemple, lors d'un jeûne, elle mène à l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogenèse (Tsai *et al.*, 2013). PRMT5 méthyle

aussi les protéines Sm, menant à leur assemblage avec les petits ARNs nucléaires, donnant les ribonucléoprotéines matures (snRNPs) formant le spliceosome (Meister and Fischer, 2002). Ce dernier permet l'excision des introns, un mécanisme essentiel du processus de maturation des ARNs messagers. Il n'est ainsi pas surprenant qu'une délétion de PRMT5 mène à d'importants défauts d'épissage (Bezzi *et al.*, 2013). PRMT5 a même été démontrée comme étant impliquée dans la prévention du développement de la maladie de Parkinson. Dans le contexte de cette maladie, la  $\beta$ -amyloïde module à la baisse l'expression de PRMT5. Au niveau des neurones, PRMT5 inhibe l'expression d'E2F-1, qui elle est impliquée dans l'apoptose cellulaire. La mort des cellules neuronales étant soupçonnée de contribuer à la pathogenèse et la progression de la maladie de Parkinson, on pense que des stratégies d'activation de PRMT5 dans les neurones pourraient être une approche potentielle dans la prévention de cette maladie (Quan *et al.*, 2015). Tenant compte de toutes ses fonctions, il n'est pas étonnant qu'une délétion embryonnaire de PRMT5 soit létale (Tee *et al.*, 2010).

#### 4.2 Partenaires d'interaction de PRMT5

En milieu physiologique, PRMT5 existe sous forme d'un complexe protéique nommé méthylosome. Dans la quasi-totalité des complexes incluant PRMT5 retrouvés dans la cellule, MEP50 (*methylosome protein 50*) est présente. Aussi appelée WDR77 (*WD repeat domain 77*), celle-ci est son partenaire d'interaction le plus prévalent, et de loin. MEP50 lui confère une meilleure spécificité au substrat. En effet, MEP50 a comme rôle de lier le substrat et d'orienter celui-ci dans la poche catalytique de PRMT5, pour aider à la réaction de méthylation. PRMT5 et MEP50 forment ainsi un complexe composé d'un tétramère d'hétérodimères de ces deux protéines, soit quatre dimères PRMT5-MEP50 associés ensemble (figure 7). Cette association donne un complexe avec une charge de surface substantiellement négative, facilitant le recrutement de substrats basiques, telles les queues des histones, un substrat majeur pour PRMT5. La formation du complexe permet de plus une méthylation plus efficace, permettant d'atteindre plus de substrats dans un espace plus restreint (Ho *et al.*, 2013). D'autres partenaires d'interaction peuvent s'associer au complexe, comme pICln (du gène CLNS1A, *chloride nucleotide-sensitive channel 1A*), Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*), RioK1 (*RIO domain kinase 1*), COPRS (*coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator*) et CHTOP (*chromatin target of*

*PRMT1*), pour en nommer quelques-uns. Ceux-ci vont affecter la localisation, la spécificité au substrat et l'activité catalytique du complexe. Il est important de mentionner que *PRMT5*, même si elle n'est pas associée à aucun de ses partenaires, est apte à méthyle ses substrats, mais avec une activité moindre (Antonyamy *et al.*, 2012).



**Figure 7 : Le méthylosome, composé majoritairement de *PRMT5* et *MEP50*.** Ce complexe est formé d'un tétramère d'hétérodimères de ces deux protéines. D'autres partenaires protéiques peuvent s'ajouter à celui-ci, menant à différents effets (Inspiré de Stopa, Krebs and Shechter, 2015).

#### 4.3 Variants de *PRMT5*

Récemment, un deuxième variant de *PRMT5* a été découvert. Celui-ci résulte d'un épissage alternatif et ne contient pas l'exon 3 ainsi qu'une partie de l'exon 4 du gène. Ce variant plus court, nommé *PRMT5S* (*PRMT5 short*), est composé de 593 acides aminés, et représente environ 30% des transcrits *PRMT5*. *PRMT5L* (*PRMT5 long*) représente quant à lui ~70% des transcrits, avec 637 acides aminés, et est donc la forme la plus abondante de la protéine. Malgré le fait qu'elle soit plus courte, *PRMT5S* garde son activité méthyltransférase, étant située en C-terminal, et n'est pas affectée par l'épissage alternatif. Toutefois, les deux variants ont une localisation cellulaire bien distincte. Lorsque surexprimée, *PRMT5L* se présente sous forme d'agrégats juxtanucléaires, alors que *PRMT5S* a une distribution beaucoup plus diffuse à travers la cellule. Il est convenu que la forme agrégée de *PRMT5L* démontrée en surexpression ne représente sûrement pas sa situation physiologique normale. La plus grande différence entre les deux variants est cependant le fait que *PRMT5S* n'a pas d'affinité avec *MEP50*. En effet, l'exon 3 est en fait un site d'interaction important avec cette dernière. On peut donc deviner qu'il en résulte une

différence au niveau de la spécificité au substrat entre les deux variants. Effectivement, lorsque surexprimée, PRMT5L promeut la progression du cycle cellulaire ainsi que la transcription de gènes impliqués dans la croissance et la prolifération. À l’opposé, une surexpression de PRMT5S tend à l’arrêt du cycle cellulaire, en augmentant la transcription de gènes impliqués dans la mort cellulaire ainsi que dans l’arrêt du cycle cellulaire. Cela ne veut par contre pas dire que ces deux enzymes ont toujours des rôles opposés; elles peuvent avoir des effets similaires en méthylant les mêmes substrats (Sohail *et al.*, 2015). Très peu de publications mentionnent quelle isoforme de PRMT5 est utilisée. Bien que le choix de variant a le potentiel d’avoir un impact dans l’obtention de résultats, il semble que ce ne soit pas encore un détail qui est suffisamment connu ou considéré. On peut cependant assumer que dans la majorité des travaux, il s’agit du variant le plus long (PRMT5L) qui est utilisé, pour deux raisons principales; il est considéré comme étant la PRMT5 complète, avec tous ses domaines intacts et est le transcrit majoritaire au niveau endogène.

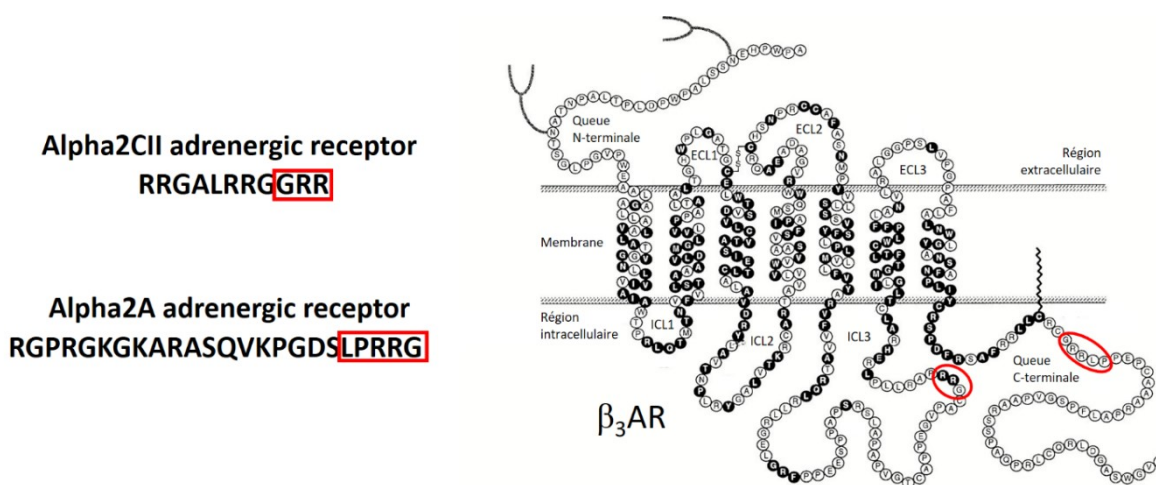
#### 4.4 Régulation de PRMT5

Il semble y avoir plusieurs mécanismes régulant l'activité de PRMT5. Tout d'abord, PRMT5 peut elle-même subir des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation de cette dernière sur des résidus tyrosine situés en N-terminal interfère avec son affinité envers MEP50, minimisant son activité méthyltransférase sur les histones. Une phosphorylation de MEP50 par Cycline D1/CDK4 sur la thréonine 5 mène toutefois à l'effet contraire; elle module à la hausse cette activité méthyltransférase en augmentant l'affinité du complexe PRMT5-MEP50 pour l'histone H4. Des modifications du substrat peuvent aussi affecter PRMT5. L'acétylation de lysines vient stimuler l'activité méthyltransférase, alors qu'une phosphorylation de résidus sérine inhibe cette dernière (Antonysamy *et al.*, 2012). Comme mentionné précédemment, PRMT5 peut s'associer avec plusieurs partenaires d'interaction, menant à différents effets. On pense premièrement bien sûr à MEP50, qui augmente son affinité pour plusieurs de ses substrats. D'autres, comme RioK1, sont situés exclusivement dans le cytosol, ce qui peut potentiellement restreindre PRMT5 à ce compartiment lors d'une interaction, favorisant ainsi la méthylation hors du noyau. Un dernier mécanisme, déjà décrit dans ce document, est l'existence de variants de PRMT5. Ceux-ci présentent des différences significatives au niveau de leur localisation et de leurs

substrats. Un changement au niveau de l'épissage alternatif de ce gène est sûr de mener à différents effets cellulaires (Stopa, Krebs and Shechter, 2015).

#### 4.5 PRMT5 et récepteurs

L'effet de PRMT5 a récemment été démontré sur trois différents RCPGs: le récepteur D2 humain et les récepteurs DOP-3 et SER-2 chez *C. elegans*. L'enzyme catalyse une diméthylation symétrique sur une séquence RXR de leur boucle intracellulaire trois (ICL3). Dans les trois cas, cette méthylation module à la hausse la signalisation par  $G_i$  de ces récepteurs. Ainsi, lorsque PRMT5 est présente, la diminution d'AMPc intracellulaire est plus marquée. Dans le cas contraire, l'absence de PRMT5 mène à un plus haut taux d'AMPc cellulaire, ayant diminué l'effet  $G_i$ . Sachant que l'ICL3 est un des domaines d'interaction majeurs avec les protéines  $G_\alpha$ , on peut comprendre l'impact qu'une modification à ce site peut avoir (Likhite *et al.*, 2015; Bowitch *et al.*, 2018). Plusieurs RCPGs méthylés par PRMT5 (ou PRMT9) ont été identifiés par des études de spectrométrie de masse en utilisant des anticorps dirigés contre la diméthylation symétrique. Parmi ces RCPGs, on retrouve les récepteurs adrénergiques  $\alpha_{2A}$  et  $\alpha_{2CII}$  (Boisvert *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que les séquences méthylées sur ces derniers ressemblent à des séquences retrouvées sur le récepteur  $\beta_3$  adrénergique (figure 8).



**Figure 8 : Le récepteur  $\beta_3$  adrénergique.** Les résidus en noir représentent les acides aminés communs entre les trois isoformes  $\beta$  du récepteur. À gauche, les séquences de récepteurs  $\alpha$  adrénergiques issus d'une immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques pour la méthylation symétrique. On remarque une similarité de certains motifs avec l'isoforme  $\beta_3$ , en rouge (Adapté de Strosberg, 1997 et Boisvert *et al.*, 2003).



PRMT5 ne semble pas seulement agir au niveau des RCPGs. L'activité de PRMT5 module à la baisse la signalisation ERK1/2 issue de l'EGFR. La diméthylation symétrique de l'arginine 1175 sur la queue cytoplasmique du récepteur favorise la phosphorylation de la tyrosine 1173. Cette phosphorylation mène ensuite à la liaison de SHP-1 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*) à l'EGFR, supprimant l'activation ERK1/2 (Hsu *et al.*, 2011). Tenant compte de ces observations, on peut deviner que PRMT5 influence potentiellement de multiples récepteurs membranaires, peu importe la classe.

#### 4.6 Effet de PRMT5 sur l'expression de surface

Un exemple de modulation d'expression de surface par PRMT5 a été démontré avec le canal sodique cardiaque (Nav1.5). PRMT5, en plus de PRMT3, interagissent avec la séquence *linker* liant les domaines un et deux du canal. Ces deux enzymes peuvent alors méthyle cette séquence à trois endroits, ce qui mène à l'augmentation de l'expression de surface du canal. Cela a pour effet d'augmenter la densité de courant au niveau des cellules cardiaques. Il n'est pas encore clair si cette méthylation facilite le trafic à la membrane, ou si elle protège le canal contre l'ubiquitination (un rôle potentiel de PRMT3), augmentant le temps de résidence de celui-ci à la membrane (Beltran-Alvarez *et al.*, 2013).

#### 4.7 Modulation de la transcription

L'épigénétique est la régulation héritable de l'expression des gènes, sans altération de la séquence de l'ADN. La méthylation de l'ADN est le processus le plus connu dans ce domaine, mais le remodelage de la chromatine et la modification des histones sont aussi des processus bien importants. Dans le cas des histones, plusieurs modifications sont impliquées: acétylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, adénylation, ADP-ribosylation et méthylation. La méthylation anormale des histones a déjà été rapportée comme jouant un rôle important dans l'incidence et le développement de tumeurs. Contrairement à l'altération de la séquence de l'ADN, plusieurs variations épigénétiques sont réversibles, faisant de l'étude de ces processus un domaine avec un grand potentiel thérapeutique (Xiao *et al.*, 2019). Au niveau de la transcription des gènes, PRMT5 agit majoritairement comme corépresseur, notamment via son marquage H4R3me2s. Ce dernier est reconnu par l'ADN méthyltransférase DNMT3a, qui, lorsque recrutée, méthyle l'ADN environnant, menant à

une répression des gènes ciblés (Q. Zhao *et al.*, 2016). PRMT5 peut aussi moduler positivement la transcription des gènes avec la marque H3R2me2s, qui prévient le recrutement de complexes répresseurs et augmente la liaison de coactivateurs transcriptionnels (Migliori *et al.*, 2012). PRMT5 s'avère donc une cible intéressante pour la pharmacologie dans le domaine de l'épigénétique.

#### 4.8 PRMT5 et cancer

La surexpression de PRMT5 et MEP50 est observée dans une multitude de cancers: poumons, ovaires, colon, estomac, vessie et bien d'autres (Stopa, Krebs and Shechter, 2015). Chez la souris, une surexpression de PRMT5 mène à la formation de tumeurs (Wei *et al.*, 2012). Cette surexpression mène aussi à une prolifération accrue et à une croissance cellulaire indépendante de l'ancrage (Pal *et al.*, 2004). PRMT5 est ainsi connue comme oncogène, ce qui en fait la cible d'un bon nombre d'études. Plusieurs inhibiteurs ont d'ailleurs été développés. EPZ015666, un inhibiteur PRMT5-sélectif avec une bonne biodisponibilité orale, semble prometteur. Celui-ci semble démontrer une activité dans des études précliniques pour le lymphome du manteau, une forme agressive de lymphome non hodgkinien (Chan-Penebre *et al.*, 2015).

#### 4.9 PRMT5 et l'hypertrophie cardiaque

PRMT5 est hautement exprimée dans le cœur. Cependant, son rôle spécifique dans ce contexte est encore très peu connu. Un groupe en 2014 a remarqué que la surexpression de cette protéine dans des cardiomyocytes inhibe significativement le développement d'une hypertrophie causée par une stimulation à la phényléphrine. En effet, ils observaient une réduction dans la synthèse de protéines, la taille des cellules et l'expression de gènes hypertrophiques. Dans le cas contraire, où ils causaient une baisse d'expression de PRMT5, ils observaient une réponse hypertrophique accrue, encore une fois dans le contexte d'une stimulation à la phényléphrine. Ils ont de plus trouvé la cause (ou plus probablement, l'une des causes) de ce phénomène. PRMT5 méthyle la protéine GATA4, un facteur de transcription impliqué fortement dans l'hypertrophie cardiaque. En méthylant les résidus arginines 229, 265 et 317, PRMT5 mène à l'inhibition de GATA4, bloquant l'acétylation de celle-ci par p300, qui mène normalement à son activité transcriptionnelle. La baisse

d'expression de PRMT5 mène notamment à la suractivation de GATA4 et donc à l'hypertrophie des cardiomyocytes (Chen, Yi and Sun, 2014).

## 5. Hypothèse et problématique

Au cours des dernières années, de grandes avancées ont été faites en ce qui concerne la régulation des récepteurs couplés aux protéines G. Une bonne partie de ces mécanismes est représentée par les modifications post-traductionnelles. Celles-ci permettent un contrôle très précis de l'activité de ces récepteurs. On pense immédiatement à la phosphorylation et l'ubiquitination, comme décrit précédemment. Une modification moins connue dans le monde des RCPGs est la méthylation. La modulation via ajout de groupements méthyle sur les arginines a, jusqu'à maintenant, été étudiée sur trois RCPGs (Likhite *et al.*, 2015; Bowitch *et al.*, 2018). Dans ces derniers cas, la méthylation catalysée par PRMT5 mène à une augmentation de l'activité du récepteur. Le groupe ayant publié ces résultats a d'ailleurs fait un recensement des RCPGs contenant le motif RXR, ciblé par PRMT5 dans le cas des trois récepteurs étudiés, en plus du motif RGG, un motif classique ciblé par les PRMTs. Le résultat : un total de 583 motifs intracellulaires identifiés chez 300 récepteurs humains. Sachant que PRMT5 ne cible pas seulement les motifs RXR ou RGG, on peut facilement imaginer que le vrai total est bien plus élevé. À cela s'ajoute le fait qu'il y a 9 PRMTs chez l'humain, chacune avec une spécificité de substrat distincte, menant à des résultats différents. L'étude de ce mécanisme pourrait mener à la découverte d'une importante nouvelle voie modulant l'activité des RCPGs. Celui présentement à l'étude, le récepteur  $\beta_3$  adrénergique, est encore relativement peu connu, surtout au niveau de sa régulation. Nous nous sommes donc intéressés à celui-ci, voulant approfondir les connaissances présentement limitées sur ce sujet. Ce récepteur est impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques, mais son implication dans les maladies cardiaques est l'une des plus intéressantes. Celles-ci, comme mentionné, sont la principale cause de décès dans le monde. La découverte de nouvelles cibles pharmacologiques dans ce domaine a un potentiel de toucher bien des gens. Grâce à des analyses de spectrométrie de masse, nous avons identifié PRMT5 comme partenaire d'interaction potentiel de ce récepteur. Nous proposons ici l'hypothèse que la protéine PRMT5 joue un rôle sur l'activité du récepteur  $\beta_3$  adrénergique, ajoutant un mécanisme de plus à la liste plutôt limitée des voies de régulation connues de celui-ci.

## 5.1 Objectifs

Afin de valider notre hypothèse, nous avons établi deux objectifs principaux. Ceux-ci visent une caractérisation assez approfondie permettant de démontrer la relation hypothétique entre les deux protéines à l'étude.

### 5.1.1 Objectif 1

Grâce à une analyse en spectrométrie de masse du récepteur  $\beta_3$  adrénergique, nous avons identifié PRMT5 comme partenaire potentiel d'interaction. Le premier objectif est donc de confirmer et de caractériser cette interaction.

### 5.1.2 Objectif 2

D'après des études publiées récemment, PRMT5 démontre un potentiel de modulation de l'activité de plusieurs récepteurs. Par exemple, elle influence la signalisation de la protéine  $G_i$  chez les récepteurs D2, DOP-3 et SER-2, alors que chez l'EGFR, elle freine la signalisation ERK1/2 (Hsu *et al.*, 2011; Likhite *et al.*, 2015; Bowitch *et al.*, 2018). Nous voulons ainsi, comme deuxième objectif, confirmer son rôle potentiel dans la signalisation du récepteur  $\beta_3$  adrénergique.

## 5.2 Avant-propos

Le travail présenté dans les prochaines pages a été majoritairement effectué par moi-même, à l'exception de quelques expériences. Les essais de co-immunoprécipitation ont été faits en collaboration avec Mlle Laurie Côté. Les essais de co-localisation de PRMT5 avec les marqueurs GM130, TGN46 et EEA1 ainsi que le montage de leurs figures respectives ont été faits par M. Samuel Génier. L'optimisation des shRNAs PRMT5 a été réalisée par Mme Jade Degrandmaison et M. Hugo Giguère, du laboratoire du Pr Auger-Messier, de l'Université de Sherbrooke.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 6.1 Réactifs

L'anticorps polyclonal anti-FLAG, l'anticorps monoclonal anti-FLAG M2, l'anticorps polyclonal anti-diméthylarginine symétrique, l'anticorps polyclonal anti-PRMT5, l'anticorps anti-souris couplé à la phosphatase alcaline, la trousse de substrat de la phosphatase alcaline, les billes magnétiques couplées à un anticorps monoclonal FLAG-spécifique, l'octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (OCG) et l'agoniste CL316,243 proviennent de Sigma-Aldrich. L'anticorps monoclonal anti-HA (16B12) provient de Covance. L'anticorps monoclonal anti-HA couplé à la *horseradish peroxidase* provient de Roche Applied Science. L'anticorps monoclonal anti-His, l'anticorps monoclonal anti-phospho-ERK1/2 et l'anticorps monoclonal anti-ERK1/2 proviennent de Cell Signaling Technology. L'anticorps polyclonal anti-GST couplé à la *horseradish peroxidase* provient de Bethyl Laboratories. L'anticorps IgG anti-chèvre couplé à la *horseradish peroxidase* (HRP) provient de R&D systems. Les anticorps IgG anti-lapin et anti-souris couplés à la HRP proviennent de GE Healthcare. Le *ProLong Gold Antifade* et les anticorps IgG Alexa anti-souris conjugués au fluor 488 et Alexa anti-lapin conjugués au fluor 546 proviennent d'Invitrogen. L'anticorps polyclonal anti-GAPDH et les billes protéine G-agarose proviennent de Santa Cruz Biotechnology. La polymérase Q5<sup>TM</sup> *High-Fidelity*, la ligase T4 et les enzymes de digestion BamHI, EcoRI et XhoI proviennent de New England Biolabs.

### 6.2 Constructions plasmidiques

L'ADNc PRMT5L (NCBI: NM\_006109.5) a été obtenu par amplification PCR (*polymerase chain reaction*) à partir d'une banque d'ADN complémentaire générée à partir de cellules leucocytaires humaines. La construction PRMT5L-FLAG a été générée par PCR avec la polymérase Q5<sup>TM</sup> *High-Fidelity* (New England Biolabs, Inc.) et des oligonucléotides contenant l'épitope FLAG dans la région C-terminale de la séquence PRMT5L. Le fragment obtenu a ensuite été digéré avec BamHI et EcoRI et ligué dans les vecteurs pcDNA3 et pRSET A digérés avec les mêmes enzymes. Le variant PRMT5S-FLAG (NCBI: NM\_001282955.2) a été préparé par PCR avec la polymérase Q5<sup>TM</sup> à partir de la construction pcDNA3-PRMT5L-FLAG. Le fragment obtenu a ensuite été digéré avec BamHI et EcoRI

et ligué dans le vecteur pcDNA3 digéré avec les mêmes enzymes. Les fragments d'ADN codant pour les domaines C-terminal et intracellulaires de  $\beta_3$ AR ont été obtenus à partir de la construction HA- $\beta_3$ AR par amplification PCR et introduits dans le vecteur pGEX-4T1 (Amersham Biosciences) à l'aide des enzymes EcoRI et XhoI, afin d'obtenir les protéines de fusion GST. L'intégrité des séquences codantes a été vérifiée par séquençage Sanger. La construction pcDNA3-HA- $\beta_3$ AR était un généreux cadeau du laboratoire Hébert de l'Université de McGill.

### 6.3 Culture cellulaire et transfection

Les cellules HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*) étaient maintenues dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Invitrogen), supplémenté avec 10% (v/v) FBS (*Foetal Bovine Serum*), à 37 °C, dans un atmosphère humide contenant 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules ont par la suite été transfectées transitoirement, une fois qu'elles ont atteint une confluence de 50-70%, avec du TransIT-LT1 (Mirus, Madison, WI), selon les instructions du manufacturier. Du vecteur pcDNA3 vide était ajouté afin de garder la quantité d'ADN totale constante. La lignée de cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR a été générée comme décrit précédemment (Azzi *et al.*, 2003; Parent *et al.*, 2008). La culture de ces cellules a été faite de la même façon qu'avec les cellules transfectées transitoirement, à l'exception de l'addition de 200 µg/ml de G418.

Les duplexes synthétiques d'oligonucléotides PRMT5 12.1 et 12.2 ciblant le gène PRMT5 humain ainsi que le DsiRNA contrôle négatif ont été achetés de Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA). Les cellules HEK 293 ont été transfectées avec 50 nm d'oligonucléotides avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Les procédures du manufacturier ont été suivies, à l'exception d'une modification : les cellules étaient plaquées directement avec le mélange de transfection, à deux fois la densité de cellules recommandée par le protocole de base.

### 6.4 Immunoprécipitation

Des cellules HEK 293 transfectées transitoirement avec les constructions indiquées ont été maintenues, comme décrit plus haut, pour 48 h dans des pétris p60. Les cellules furent

par la suite lavées avec du PBS (*phosphate-buffered saline*) glacial et récoltées avec 350 µl de tampon de lyse (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% désoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1% IGEPAL, et 5 mM acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA)), supplémenté d'inhibiteurs de protéases (10 nM chymostatine, 10 nM leupeptine, 9 nM antipaïne et 9 nM pepstatine) (Sigma-Aldrich). Après une incubation de 60 min à 4 °C avec rotation, les lysats ont été centrifugés pour 20 min à 13500 x g, à 4 °C. Un microgramme d'anticorps spécifique a par la suite été ajouté au surnageant. Les échantillons ont ensuite été incubés à 4 °C avec rotation pour la nuit. Le lendemain, 35 µl de billes protéine G-agarose ont été ajoutées avant d'incuber les échantillons 60 min à 4 °C avec rotation. Ceux-ci ont par la suite été centrifugés 1 min dans une microcentrifugeuse et lavés quatre fois avec 1 ml de tampon de lyse. Les protéines immunoprécipitées ont été éluées des billes avec 50 µl de tampon de chargement SDS, avec une incubation de 60 min à température pièce. Les lysats initiaux et protéines immunoprécipitées ont été analysés par SDS-PAGE et immunobuvardage avec les anticorps indiqués.

Pour les essais de spectrométrie de masse, des cellules HEK 293 transfectées transitoirement avec les constructions indiquées ont été maintenues durant 48 h dans des pétris p100. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS glacial et récoltées avec 600 µl de tampon de solubilisation (1% octyl β-D-glucopyranoside (OCG), 75 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA et 5 mM MgCl<sub>2</sub>), supplémenté d'inhibiteurs de protéases (10 nM chymostatine, 10 nM leupeptine, 9 nM antipaïne et 9 nM pepstatine). Après une incubation de 60 min à 4 °C avec rotation, les lysats ont été centrifugés pour 20 min à 13500 x g, à 4 °C. Suivant un dosage protéique, 75 µl de billes magnétiques couplées à un anticorps monoclonal FLAG-spécifique (Sigma-Aldrich) a été ajouté aux lysats, suivi d'une incubation à 4 °C avec rotation pour la nuit. Le lendemain, quatre lavages des billes avec 1 ml de tampon de solubilisation sans inhibiteurs de protéases ont été réalisés, avec incubation de 5 min à 4 °C avec rotation pour chaque lavage. Par la suite, cinq autres lavages avec incubation de 5 min à 4 °C avec rotation ont été effectués, cette fois avec 1 ml de tampon ammonium bicarbonate (20 mM ammonium bicarbonate et 75 mM KCl). Une digestion à la chymotrypsine sur billes a finalement été réalisée, suivie de l'analyse par spectrométrie de masse par la plateforme de protéomique de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de

Sherbrooke. Les lysats initiaux et protéines immunoprécipitées ont été analysés par SDS-PAGE et immunobuvardage afin de vérifier les niveaux de récepteur.

### *6.5 Essais d'activation ERK1/2*

Des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR ou non ont été plaquées dans des plaques de 6 puits à une densité de  $2.7 \times 10^5$  cellules par puits et transfectées transitoirement comme décrit plus haut. Après 48 h, les cellules ont été privées de sérum pour 3 h et stimulées avec du CL316,243 (Sigma-Aldrich) ou véhicule (DMSO) pour les temps indiqués. Les cellules furent par la suite lysées avec l'addition de tampon de chargement SDS 1%. Après une incubation de 60 min à température pièce, les échantillons ont été davantage lysés par sonication. Les lysats ont par la suite été analysés par SDS-PAGE et immunobuvardage avec les anticorps indiqués. Les niveaux totaux de ERK1/2 ont été vérifiés en utilisant les mêmes membranes utilisées pour la détection des pERK1/2. Pour les essais avec ARNs interférents, les mêmes cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR ont été utilisées, à une densité de  $1.3 \times 10^5$  cellules par puits et les DsiRNAs indiqués ont été transfectés. Suivant une période d'incubation de 72 h, les étapes subséquentes ont été performées comme décrit plus haut.

### *6.6 Marquage à immunofluorescence et microscopie confocale*

Des lamelles de verre ont été déposées dans des plaques de 6 puits et enduites de 0.1mg/ml poly-L-lysine (Sigma-Aldrich). Des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR ont été plaquées directement sur les lamelles à une densité cellulaire de  $8 \times 10^4$  par puits, ainsi que transfectées avec les constructions pcDNA3-PRMT5S-FLAG (0.25  $\mu$ g) ou pcDNA3-PRMT5L-FLAG (0.25  $\mu$ g). Après 48 h, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS, puis immédiatement fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% (v/v) dans du PBS pour 30 min à 4 °C. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS et perméabilisées avec du tampon de perméabilisation (Triton X-100 0.1% (v/v) dans du PBS) et incubées 20 min à température pièce. Par la suite, les cellules ont été incubées 30 min dans du tampon de blocage (0.1% Triton X-100 (v/v) et 2% (p/v) BSA dans du PBS) à température pièce. Les lamelles ont par la suite été incubées 60 min à température pièce avec des anticorps HA ou FLAG-spécifiques dilués dans du tampon de blocage. Après deux lavages avec du



tampon de perméabilisation, les cellules ont été bloquées une fois de plus dans du tampon de blocage durant 10 min. Les lamelles ont ensuite été incubées avec les anticorps secondaires appropriés pour 60 min à température pièce. Après deux autres lavages avec du tampon de perméabilisation, du colorant DAPI (Sigma-Aldrich) dilué dans du tampon de blocage a été ajouté, précédant une incubation de 10 min à température pièce. Les cellules ont été lavées trois dernières fois avec du PBS. Les lamelles ont ensuite été montées avec du *ProLong Gold Antifade*. La microscopie confocale a été performée à l'aide d'un microscope confocal à balayage (Leica TCS SP8), couplé à un microscope inversé avec un objectif HC PL APO 63X à immersion (Leica). Tous les paramètres de laser ont été conservés entre les acquisitions d'image pour la même figure. Les images ont été traitées avec le logiciel Leica LAS X.

#### *6.7 Mesure des récepteurs de surface cellulaire par ELISA*

Des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR ont été plaquées à une densité de  $6 \times 10^4$  cellules par puits dans des plaques 24 puits pré-enduites de 0.1 mg/ml poly-L-lysine. Les cellules ont été transfectées avec les DsiRNAs indiqués et maintenus pour 72 h. Pour les essais d'internalisation, les cellules ont ensuite été stimulées avec du CL316,243 ou véhicule (DMSO) pour les temps indiqués. Immédiatement après, du formaldéhyde 3,7% dans du TBS (*Tris-buffered saline*; 20mM Tris-HCl pH 7.5 et 150mM NaCl) a été ajoutée. Après une incubation de 5 min à température pièce, les cellules ont été lavées deux fois avec du TBS et bloquées 30 min à température pièce dans du tampon de blocage (1% (p/v) BSA dans du TBS) pour prévenir les liaisons non spécifiques. Par la suite, des anticorps HA-spécifiques dilués 1:2000 dans du tampon de blocage furent ajoutés aux puits, suivi par une incubation de 60 min à température pièce. Après deux lavages avec du TBS, les cellules ont été bloquées une fois de plus pour 10 min. Par la suite, les cellules ont été incubées 60 min à température pièce avec un anticorps de chèvre anti-souris conjugué à la phosphatase alcaline, dilué 1:10000 dans du tampon de blocage. Suivant quatre derniers lavages avec du TBS, 250  $\mu$ l de substrat colorimétrique de la phosphatase alcaline furent ajoutés, selon les instructions du manufacturier. Les plaques ont ensuite été incubées à 37 °C, jusqu'à apparition d'une couleur jaune. La réaction fut arrêtée avec l'addition de 250  $\mu$ l de NaOH (0,4M) dans les puits. Un échantillon de 200  $\mu$ l a été prélevé de chaque puits et l'absorbance

a été lue à 405 nm avec un spectrophotomètre *NanoQuant Infinite M200*. Toutes les conditions ont été effectuées en triplicata pour chaque expérience.

### 6.8 Production de protéines recombinantes et essais GST-Pulldown

Afin de produire les protéines avec étiquette His, des fragments issus de PCR correspondants à l'ADNc codant pour PRMT5L et PRMT5S pleine longueur ont été insérés dans le vecteur d'expression pRSET A (Invitrogen), comme décrit plus haut. Ces constructions ont été utilisées pour produire les protéines de fusion dans la lignée *Escherichia coli OverExpress*<sup>TM</sup> C41 (DE3) (Avidis, Roubaix, France) en suivant les recommandations du fabricant. Les protéines recombinantes ont été purifiées à l'aide de billes Ni-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid-agarose resin*; Qiagen, Toronto, Canada) et éluées comme indiqué par le fabricant. Les fragments d'ADNc codant pour les domaines C-terminal et intracellulaires de  $\beta_3$ AR insérés dans le vecteur d'expression pGEX-4T1 (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Canada) ont été utilisés pour produire les protéines recombinantes GST dans la lignée *E. coli OverExpress*<sup>TM</sup> C41 (DE3), pour ensuite être purifiées à l'aide de billes *Glutathione Sepharose*<sup>TM</sup> 4B (Amersham Biosciences), selon les instructions du fabricant. Les protéines recombinantes purifiées ont ensuite été analysées par électrophorèse SDS-PAGE, suivi d'une coloration *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Pour les essais GST-Pulldown, 5  $\mu$ g de protéines de fusion GST liées aux billes *Glutathione Sepharose* ont été incubées 60 min à 4 °C avec rotation avec 5  $\mu$ g de protéines de fusion pleine longueur His dans du tampon de liaison (10mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycérol, 0.5% IGEPAL and 2mM dithiothréitol), supplémenté d'inhibiteurs de protéases (10 nM chymostatine, 10 nM leupeptine, 9 nM antipain et 9 nM pepstatine). Les réactions de liaison ont par la suite été lavées trois fois avec du tampon de liaison, avant l'addition de tampon de chargement SDS. Les échantillons ont ensuite été bouillis durant 5 min. Les réactions de liaison ont été analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage avec les anticorps indiqués.

### 6.9 Détection de la méthylation dans les lysats cellulaires

Des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR ont été plaquées dans des pétris p60 à une densité de  $7.5 \times 10^5$  cellules par pétris et transfectées transitoirement avec la

construction pcDNA-PRMT5L-FLAG. Après 48 h, les cellules ont été stimulées avec du CL316,243 ou véhicule (DMSO) pour les temps indiqués. Les cellules ont par la suite été lysées avec l'addition de tampon de chargement SDS 1%. Après une incubation de 60 min à température pièce, les échantillons ont été davantage lysés par sonication. Les lysats ont par la suite été analysés par SDS-PAGE et immunobuvardage avec un anticorps spécifique pour la diméthylation symétrique des arginines (SYM11). Les niveaux totaux de HA- $\beta_3$ AR et PRMT5L-FLAG ont été vérifiés en utilisant des anticorps monoclonaux HA-spécifiques et polyclonaux FLAG-spécifiques.

#### *6.10 Analyses statistiques*

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism version 8.0 (GraphPad), avec un test de Student bilatéral ou un ANOVA à deux facteurs, suivi d'un test de comparaison multiple de Sidak. Les données étaient considérées significatives lorsque les valeurs  $p$  étaient  $<0,05$  (\*),  $<0,01$  (\*\*) ou  $<0,001$  (\*\*\*) ou  $<0,0001$  (\*\*\*\*).

## RÉSULTATS

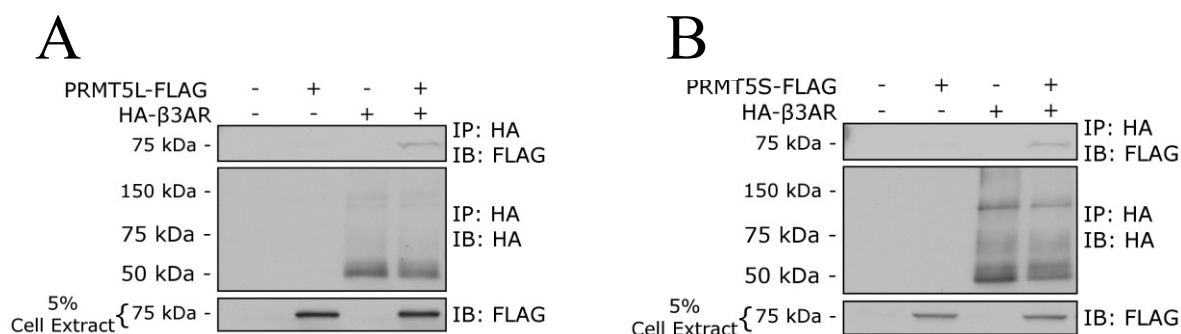
### *7.1 PRMT5 interagit avec le récepteur $\beta_3$ adrénergique*

Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction du récepteur  $\beta_3$  adrénergique, nous avons, en utilisant des lysats de cellules HEK 293T transfectées transitoirement avec pcDNA3 ou pcDNA3-FLAG- $\beta_3$ AR, procédé à une immunoprécipitation à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps FLAG-spécifique. Pour la préparation des échantillons, une digestion sur billes avec chymotrypsine a été réalisée. L'utilisation de la chymotrypsine permettait d'éviter les problèmes potentiels de digestion liés à la méthylation, puisqu'elle agit avec une sélectivité pour les résidus aromatiques phénylalanine, tryptophane et tyrosine. L'utilisation de trypsine aurait pu être problématique, puisqu'elle clive au niveau des résidus basiques lysine et arginine, qui peuvent être méthylés et pourraient ainsi bloquer l'action de l'enzyme, rendant l'obtention de peptides recherchés pour ce projet plus difficile. PRMT5 était l'un des partenaires de  $\beta_3$ AR les plus enrichis parmi ceux retrouvés dans l'analyse. Plusieurs de ses cofacteurs protéiques ont aussi été identifiés, en plus de quelques PRMTs : PRMT1, PRMT3 et PRMT6 (tableau 3).

Par la suite, nous voulions confirmer les interactions qui furent observées en spectrométrie de masse. Pour ce faire, nous avons procédé à des essais d'immunoprécipitation utilisant des cellules HEK 293 transfectées transitoirement avec pcDNA3-HA- $\beta_3$ AR, pcDNA3-PRMT5L-FLAG ou pcDNA3-PRMT5S-FLAG. Les lysats cellulaires ont été incubés avec des anticorps monoclonaux HA-spécifiques et la co-immunoprécipitation de PRMT5 a été confirmée avec des anticorps polyclonaux FLAG-spécifiques. Comme il est montré en figure 9, les deux variants, PRMT5L et PRMT5S, ont été co-immunoprécipités avec le récepteur, confirmant les données obtenues en spectrométrie de masse.

Enrichissement relatif		Fonction
<b>PRMT5</b>	n.d.	PRMT de type II majoritaire
<b>MEP50</b>	n.d.	Cofacteur protéique principal de PRMT5. Spécificité au substrat et facilite l'activité méthyltransférase
<b>CHTOP</b>	n.d.	Cofacteur protéique de PRMT5. Promotion de la méthylation H4R3
<b>COPRS</b>	2.86	Cofacteur protéique de PRMT5. Requis pour la méthylation H4R3
<b>pICln</b>	5.61x10 <sup>5</sup>	Cofacteur protéique de PRMT5. Recrutement des protéines Sm du spliceosome pour méthylation par PRMT5
<b>RioK1</b>	5.82x10 <sup>5</sup>	Cofacteur protéique de PRMT5. Compétitionne avec pICln. Recrutement de la nucléoline pour méthylation par PRMT5
<b>PRMT1</b>	n.d.	PRMT de type I majoritaire
<b>PRMT3</b>	n.d.	PRMT de type I
<b>PRMT6</b>	n.d.	PRMT de type I

**Tableau 3: Partenaires d'interaction de  $\beta_3$ AR identifiés par spectrométrie de masse.** Des lysats de cellules HEK 293T transfectées transitoirement avec pcDNA3 ou pcDNA3-FLAG- $\beta_3$ AR ont été immunoprécipités avec des billes magnétiques couplées à un anticorps FLAG-spécifique, puis une digestion sur billes avec chymotrypsine a été réalisée. On observe la présence de PRMT5 ainsi que plusieurs de ses cofacteurs protéiques. D'autres PRMTs ont aussi été détectées durant l'analyse. Chaque protéine identifiée dans le tableau était détectée avec une intensité au moins 1,5 fois plus élevée dans la condition FLAG- $\beta_3$ AR que contrôle. n.d., non déterminé, car aucun peptide n'a été détecté dans la condition contrôle.

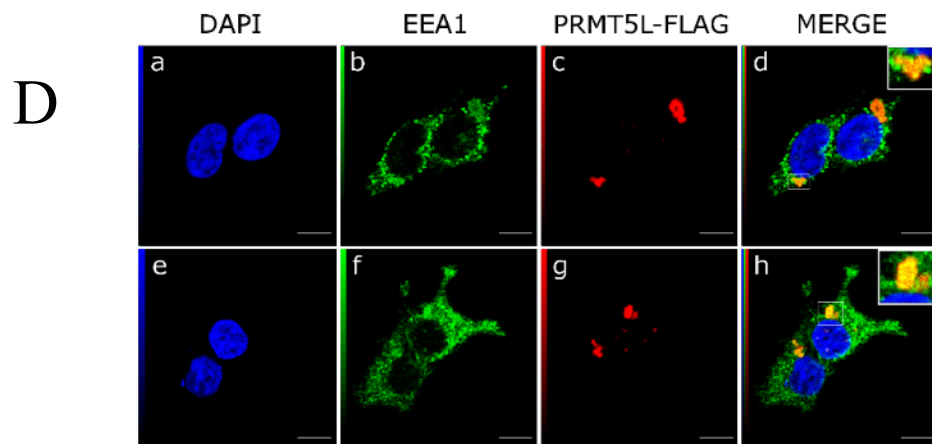
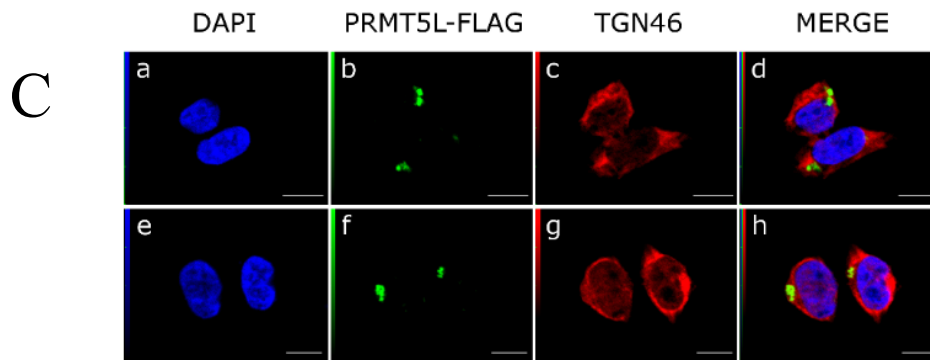
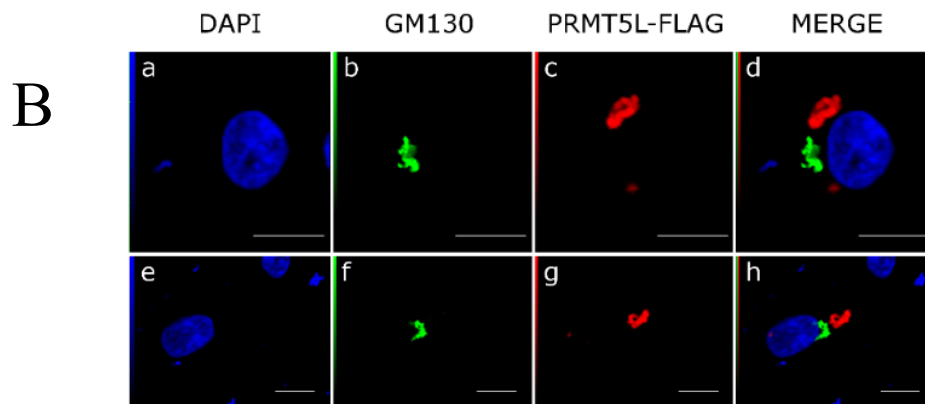
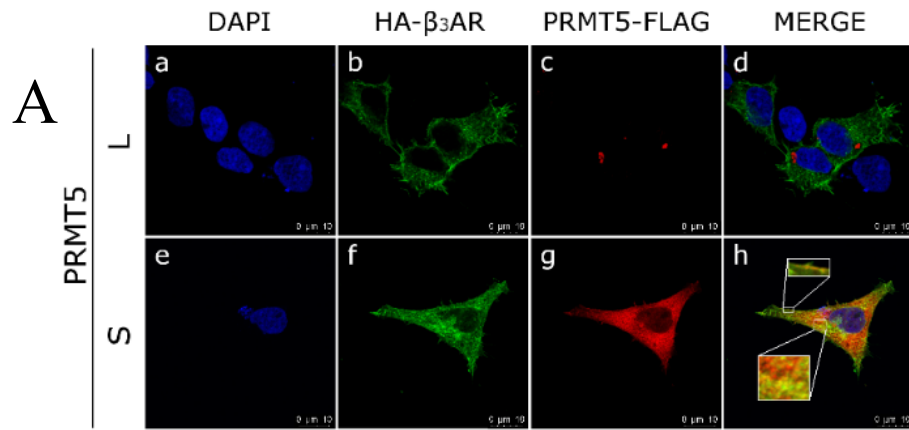


**Figure 9:  $\beta_3$ AR interagit avec PRMT5.** Des lysats de cellules HEK 293 transfectées transitoirement avec les constructions indiquées ont été immunoprécipités avec un anticorps monoclonal HA-spécifique. Les échantillons ont ensuite été analysés par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal FLAG-spécifique et un anticorps monoclonal HA-spécifique conjugué à la HRP. Une co-immunoprécipitation est observée avec les variants PRMT5L et PRMT5S (A et B). Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins trois expériences distinctes. IB, *immunoblotting*; IP, *immunoprecipitation*.

### 7.2 PRMT5S co-localise avec $\beta_3$ AR en microscopie confocale

Des essais en microscopie confocale ont ensuite été réalisés afin d'étudier la co-localisation entre le  $\beta_3$ AR et les deux isoformes de PRMT5. Des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR transfectées transitoirement avec pcDNA3-PRMT5L-FLAG ou pcDNA3-PRMT5S-FLAG ont été fixées, perméabilisées et marquées avec des anticorps monoclonaux HA-spécifiques et des anticorps polyclonaux FLAG-spécifiques. La figure 10A, panneau c montre PRMT5L sous forme agrégée, dans la région juxtanucléaire. PRMT5L a pourtant une distribution étendue dans la cellule, seulement visible avec une plus grande puissance de laser lors de l'acquisition d'image. Cependant, afin d'éviter la sursaturation des pixels, la puissance de laser devait être réduite, ne permettant que l'observation des agrégats de protéine. Dans le cas de PRMT5S, on observe une distribution ubiquitaire au niveau des cellules (figure 10A, panneau g). Les panneaux d et h représentent une superposition des signaux de laser bleus, verts et rouges. À cause de l'état agrégé qui masque le signal de PRMT5L retrouvée aux autres localisations intracellulaires, nous ne détectons pas de co-localisation entre PRMT5L et  $\beta_3$ AR. Cependant, la co-localisation entre PRMT5S et le récepteur est détectée, comme démontré par la présence de pixels jaunes, produits par la superposition de signaux verts (HA- $\beta_3$ AR) et rouges (PRMT5S-FLAG) co-localisés. La co-localisation a été observée dans le cytoplasme ainsi qu'à la membrane plasmique (figure 10A, panneau h). D'autres essais de microscopie ont été réalisés afin de déterminer la localisation des agrégats de PRMT5L. La figure 10B montre un marquage avec des anticorps GM130-spécifiques. Cette protéine, nommée *Golgi Matrix protein 130 kDa*, est souvent ciblée en microscopie confocale par un marquage avec des anticorps spécifiques afin d'observer l'appareil de Golgi (Nakamura *et al.*, 1995). Les panneaux d et h montrent la superposition des signaux de lasers du noyau, de PRMT5L et de GM130. Aucune co-localisation n'a été observée. Un autre essai de microscopie confocale a été réalisé, cette fois-ci en utilisant des anticorps TGN46-spécifiques (figure 10C). La protéine TGN46 (*trans-Golgi network protein 46 kDa*) est membranaire et est recyclée entre la surface cellulaire et le réseau trans golgien. Elle est toutefois majoritairement localisée dans le réseau trans golgien, faisant d'elle un marqueur reconnu pour ce compartiment cellulaire (McCrossan *et al.*, 2001). Comme montré par les panneaux de superposition des lasers d et h, aucune colocalisation significative n'est observée. Finalement, un dernier essai de microscopie a été

réalisé, avec des anticorps EEA1-spécifiques (figure 10D). Il a été démontré que la protéine EEA1 (*early endosome antigen 1*) est associée avec la face cytoplasmique de la membrane des endosomes précoces, qui eux sont impliqués dans le tri et le transport vers les lysosomes et le réseau-trans golgien (Mu *et al.*, 1995). La superposition des signaux PRMT5L et EEA1 (panneaux d et h) montre un signal jaune témoignant de la co-localisation des deux protéines.



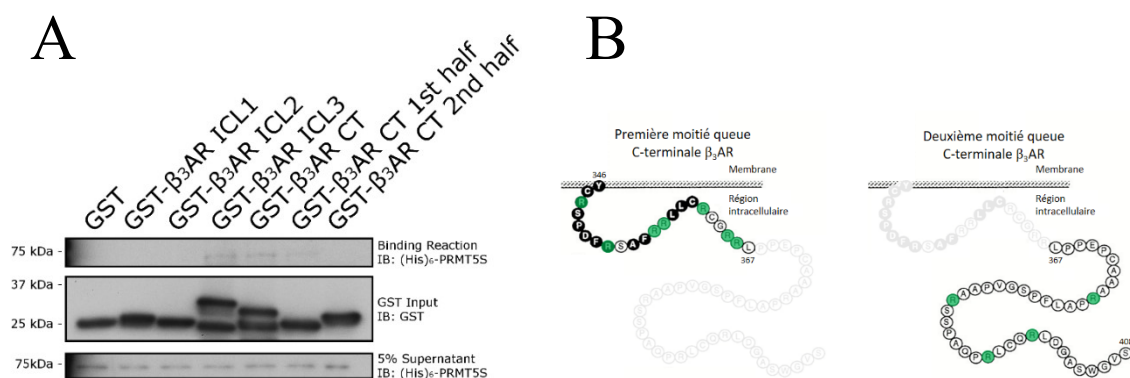


**Figure 10: PRMT5S co-localise avec  $\beta_3$ AR.** (A) La microscopie confocale a été effectuée sur des cellules HEK 293 exprimant de façon stable la construction HA- $\beta_3$ AR et transitoirement PRMT5L-FLAG ou PRMT5S-FLAG. Les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées avec des anticorps HA-spécifiques de souris et FLAG-spécifiques de lapin. Des anticorps IgG Alexa anti-souris conjugués au fluor 488 et Alexa anti-lapin conjugués au fluor 546 ont été utilisés comme anticorps secondaires. Du colorant DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) a été utilisé pour marquer les noyaux (a et e). PRMT5L présente une localisation agrégée dans la région juxtanucléaire, alors que PRMT5S est présente dans la plupart des compartiments cellulaires (c et g). Les panneaux d et h montrent une image superposée des signaux bleus, verts et rouges, résultant en une couleur jaune où  $\beta_3$ AR marqué en vert et PRMT5 marquée en rouge co-localisent. (B) Des cellules HEK 293 exprimant transitoirement PRMT5L-FLAG ont été marquées comme décrit en (A) avec des anticorps FLAG et GM130-spécifiques, ces derniers permettant l'observation de l'appareil de Golgi. En d et h, la superposition des signaux de laser; aucune co-localisation entre PRMT5L et l'appareil de Golgi n'a été observée. Chaque rangée de panneaux représente une série de cellules différente. (C) Des cellules HEK 293 exprimant transitoirement PRMT5L-FLAG ont été marquées comme décrit en (A) avec des anticorps FLAG et TGN46-spécifiques, ces derniers permettant d'observer le réseau trans golgien. En d et h, la superposition des signaux de laser; aucune co-localisation entre PRMT5L et le réseau trans golgien n'a été observée. Chaque rangée de panneaux représente une série de cellules différente. (D) Des cellules HEK 293 exprimant transitoirement PRMT5L-FLAG ont été marquées comme décrit en (A) avec des anticorps FLAG et EEA1-spécifiques, ces derniers permettant d'observer les endosomes précoces. La superposition des signaux de laser en d et h permet d'observer une co-localisation entre PRMT5L et les endosomes précoces, résultant en une couleur jaune. Chaque rangée de panneaux représente une série de cellules différente. Les images montrées sont représentatives d'au moins trois expériences distinctes.

### 7.3 PRMT5 interagit avec les domaines ICL3 et CT de $\beta_3$ AR

Suivant les expériences d'immunoprécipitations précédentes, des essais de liaison *in vitro* ont été réalisés, afin de déterminer si PRMT5 pouvait interagir directement avec le  $\beta_3$ AR et d'identifier les domaines intracellulaires de ce dernier étant impliqués. Des formes purifiées du domaine C-terminal (CT) et des boucles intracellulaires (ICL) de  $\beta_3$ AR recombinantes fusionnées à la protéine glutathion S-transférase (GST) liée à des billes de *glutathione-sepharose* ont été incubées avec la protéine PRMT5S-FLAG recombinante fusionnée avec une étiquette hexa-His (His<sub>6</sub>-PRMT5S-FLAG) purifiée. Des moitiés de la queue C-terminale de  $\beta_3$ AR ont aussi été utilisées afin d'aider à déterminer les séquences d'interaction (figure 11B). Ces constructions ont permis de déterminer quelle portion de la queue C-terminale interagit avec PRMT5. La première moitié (*GST- $\beta_3$ AR CT 1<sup>st</sup> half*) débute

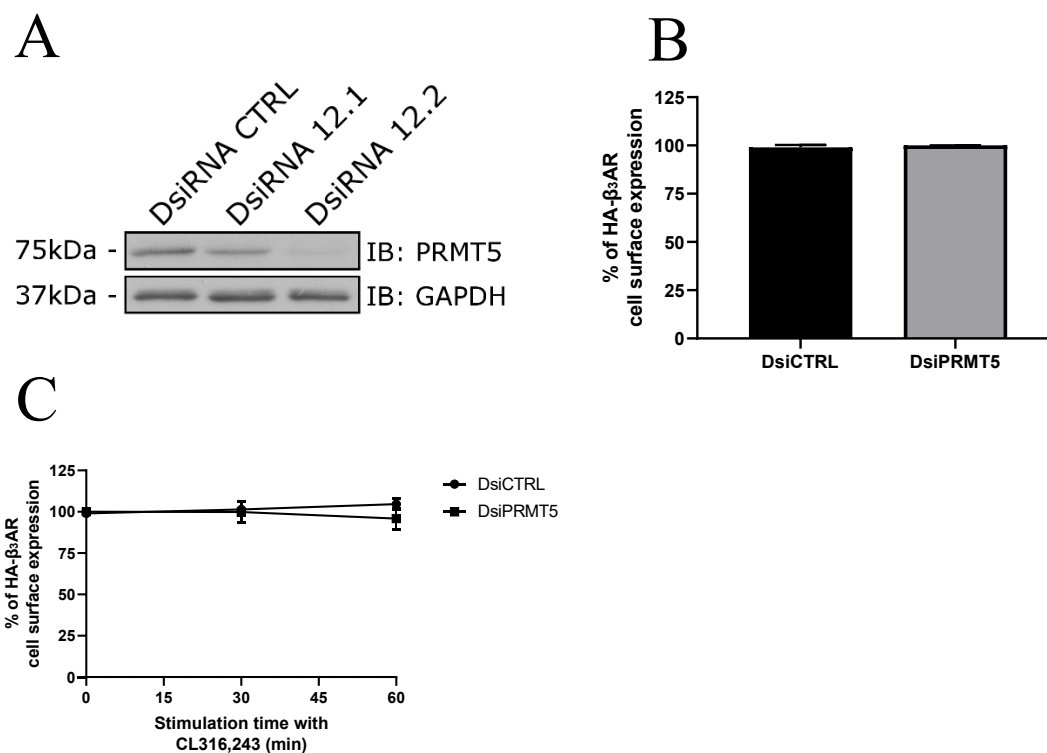
à la Tyr346 membranaire et se termine à la Leu367, alors que la deuxième moitié (*GST-β<sub>3</sub>AR CT 2<sup>nd</sup> half*) débute à la Leu367 et finit à la Ser408 terminale. La figure 11A montre que la protéine PRMT5S purifiée peut interagir directement avec l'ICL3 ainsi que la première moitié de la queue C-terminale de β<sub>3</sub>AR. Aucune interaction significative n'a été observée pour les autres domaines du récepteur testés.



**Figure 11: Identification des domaines intracellulaires de β<sub>3</sub>AR liant PRMT5.** (A) Des essais GST-pull-down ont été effectués en utilisant la queue C-terminale (*GST-β<sub>3</sub>AR CT*) et les boucles intracellulaires (*GST-β<sub>3</sub>AR ICL*) de β<sub>3</sub>AR avec étiquette GST liées à des billes *glutathione-sepharose*, incubées avec (His)<sub>6</sub>-PRMT5S-FLAG purifiée. Les protéines avec étiquette GST ont été détectées par immunobuvardage avec un anticorps GST-spécifique conjugué à la HRP, alors que l'interaction avec (His)<sub>6</sub>-PRMT5S-FLAG a été détectée avec un anticorps polyclonal (His)<sub>6</sub>-spécifique. (B) Séquences des moitiés de la queue C-terminale β<sub>3</sub>AR (Y346 à L367 et L367 à S408) fusionnées à la GST utilisées pour les essais GST-pull-down. Les arginines sont colorées en vert. Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences distinctes. IB, *immunoblotting*.

#### *7.4 La déplétion de PRMT5 n'affecte pas l'expression de surface ou l'internalisation de $\beta_3AR$*

Notre prochain but était de vérifier si PRMT5 jouait un rôle dans l'expression de surface ou l'internalisation de  $\beta_3AR$  suite à la stimulation par son agoniste. Ces deux paramètres ont été étudiés en conditions de déplétion de PRMT5 en utilisant deux DsiRNAs différents ciblant l'ARNm codant pour cette protéine. Des cellules HEK 293 transfectées avec des DsiRNA contrôle ou les DsiRNAs PRMT5 12.1 ou PRMT5 12.2 ont été lysées et un immunobuvardage a été effectué avec des anticorps PRMT5 et GAPDH-spécifiques. La figure 12A montre la déplétion protéique de PRMT5 qui est plus robuste avec le DsiRNA 12.2. Ce dernier a donc été utilisé pour toutes les expériences où la déplétion de PRMT5 était requise. Des ELISAs (enzyme-linked immunosorbant assays) ont été réalisés dans des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3AR$  transfectées avec les DsiRNAs PRMT5 12.2 ou les DsiRNAs contrôle. L'expression de surface a été mesurée avec des anticorps monoclonaux HA-spécifiques. La figure 12B montre que la déplétion de PRMT5 n'affecte pas de façon significative l'expression de surface de  $\beta_3AR$ . Les cellules ont aussi été stimulées avec le CL316,243 (agoniste spécifique du récepteur) ou le véhicule pour les temps indiqués et soumises à des ELISAs afin d'évaluer si PRMT5 avait un effet sur l'internalisation du récepteur. Comme montré par la figure 12C, les niveaux de  $\beta_3AR$  à la surface cellulaire n'ont pas significativement changé suivant la stimulation et ce, indépendamment de la déplétion de PRMT5. Pour tous les essais ELISA, les niveaux de récepteur totaux ont été vérifiés sur des lysats cellulaires avec un immunobuvardage avec des anticorps monoclonaux HA-spécifiques (non montré).



**Figure 12: PRMT5 n'influence pas l'expression de surface ou l'internalisation du  $\beta_3$ AR.** (A) Des lysats de cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR transfectées avec des DsiRNAs contrôle négatif ou avec les DsiRNAs PRMT5 12.1 ou 12.2 ont été analysés par immunobuvardage avec des anticorps polyclonaux PRMT5 et GAPDH-spécifiques. (B) L'expression de surface du récepteur a été mesurée par ELISA en utilisant des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR transfectées avec le DsiRNA PRMT5 12.2 ou le DsiRNA contrôle négatif avec un anticorps monoclonal HA-spécifique comme décrit dans *Matériel et méthodes*. Les résultats montrés représentent le pourcentage de l'expression de surface comparé avec HA- $\beta_3$ AR en présence du DsiRNA contrôle négatif (CTRL : 100%). (C) L'internalisation du récepteur a été mesurée par ELISA pour les temps de stimulation indiqués en utilisant des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR transfectées avec le DsiRNA PRMT5 12.2 ou le DsiRNA contrôle négatif avec un anticorps monoclonal HA-spécifique. Les résultats montrés représentent le pourcentage de l'expression de surface comparé avec HA- $\beta_3$ AR en présence du DsiRNA contrôle négatif (0 min: 100%). Les résultats sont affichés comme moyenne  $\pm$  erreur type d'au moins trois expériences indépendantes.

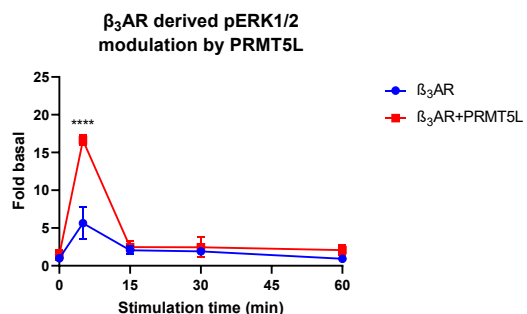
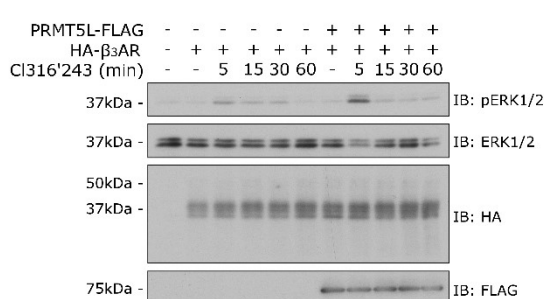
### 7.5 PRMT5 module la signalisation par $\beta_3$ AR

Puisque jusqu'à maintenant très peu d'exemples de modulation de la signalisation de RCPG par PRMT5 ont été démontrés, nous avons entrepris de tester l'activation de ERK1/2 par le  $\beta_3$ AR dans des environnements cellulaires dans lesquels PRMT5 était surexprimée ou déplétée. Pour ce faire, des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR transfectées avec pcDNA3-PRMT5L-FLAG ou pcDNA3-PRMT5S-FLAG ont été stimulées avec le CL316,243 ou le véhicule pour les temps indiqués et la phosphorylation de ERK1/2 a été mesurée par immunobuvardage avec un anticorps polyclonal pERK1/2-spécifique. Une augmentation significative de pERK1/2 après 5 min de stimulation du récepteur a été observée lorsque les constructions PRMT5L et PRMT5S étaient transfectées par rapport à la transfection du vecteur contrôle (figure 13A et B, respectivement). Les niveaux d'expression totale des ERK1/2, HA- $\beta_3$ AR et PRMT5-FLAG ont été vérifiés par immunobuvardage avec des anticorps ERK1/2, HA et FLAG-spécifiques. Des analyses de densitométrie ont été effectuées afin de mieux quantifier ces observations. La figure 13A montre une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 médiée par  $\beta_3$ AR d'environ trois fois après 5 min de stimulation à l'agoniste lorsque PRMT5L était transfectée par rapport à la condition transfectée avec le vecteur vide. Quant à elle, la transfection de PRMT5S a mené à une augmentation d'environ 2.2 fois, comme montré à la figure 13B. Cependant, la transfection de PRMT5S a mené à une activation de ERK1/2 plus soutenue à travers les différents temps testés lorsque comparé au variant plus long. En effet, après 15 min de stimulation du  $\beta_3$ AR, la surexpression de PRMT5S a causé une augmentation d'environ 2.7 fois par rapport au contrôle, tandis que les niveaux de pERK1/2 étaient revenus au niveau de la condition contrôle en présence de PRMT5L surexprimée.

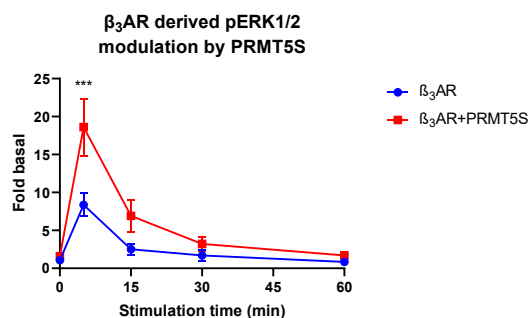
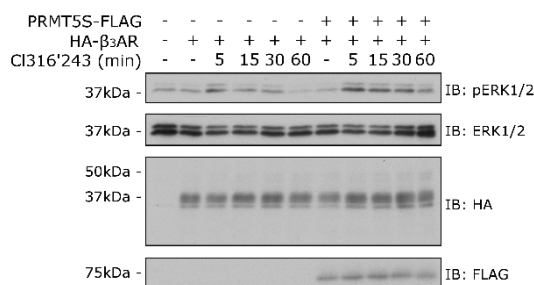
La modulation par PRMT5 de la voie ERK1/2 suite à l'activation du  $\beta_3$ AR a par la suite été confirmée davantage par l'utilisation d'ARNs interférents. Des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR transfectées avec les DsiRNAs PRMT5 12.2 ou les DsiRNAs contrôles ont été stimulées avec le CL316,243 ou le véhicule durant 5 min et la phosphorylation de ERK1/2 fut mesurée par immunobuvardage comme décrit plus haut. Une réduction de l'activation de ERK1/2 a été observée dans les conditions où la PRMT5 endogène était déplétée (figure 13C). Cette dernière observation suggère que PRMT5 joue

bel et bien un rôle dans la signalisation du  $\beta_3$ AR. Par la suite, nous nous sommes demandé si cette modulation de la signalisation du récepteur était restreinte à PRMT5 parmi les différentes PRMTs. Nous avons donc réalisé des expériences avec la PRMT responsable de jusqu'à 85% de l'activité arginine méthyltransférase cellulaire, soit PRMT1, une PRMT de type I. Jusqu'à maintenant, aucun lien entre le  $\beta_3$ AR et PRMT1 n'a été établi. Des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR transfectées avec pcDNA3-PRMT1-FLAG ont été stimulées avec le CL316,243 ou le véhicule pour les temps indiqués et la phosphorylation de ERK1/2 a été mesurée une fois de plus comme décrit plus haut. La figure 13D montre que PRMT1 mène à un effet opposé à PRMT5 sur l'activation de ERK1/2  $\beta_3$ AR-spécifique, soit une diminution de la phosphorylation de ERK1/2.

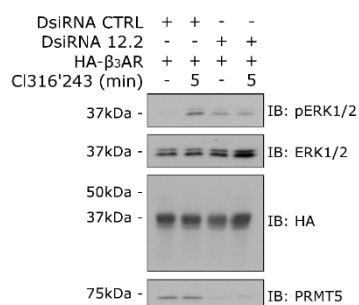
A



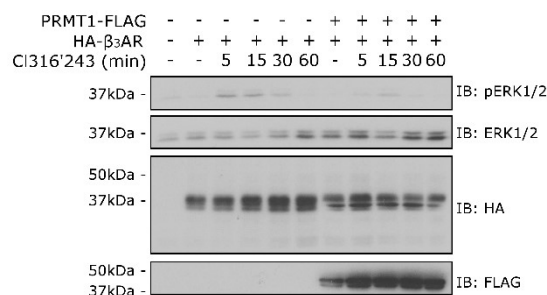
B



C



D

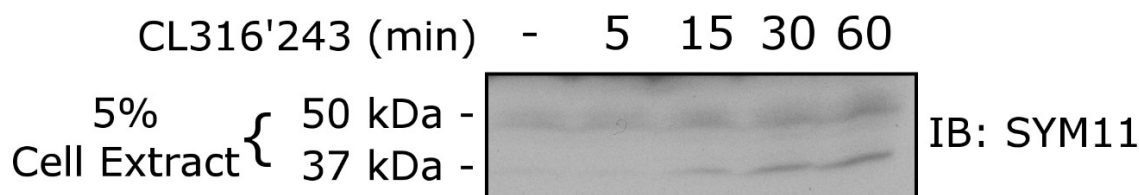


**Figure 13: PRMT5 module la phosphorylation de ERK1/2 suite à la stimulation du  $\beta_3$ AR.** Des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR ont été transfectées transitoirement avec pcDNA3, pcDNA3-PRMT5L-FLAG (A) ou pcDNA3-PRMT5S-FLAG (B). Après 48 h d'incubation, les cellules ont été privées de sérum pour 3 h et stimulées avec le CL316,243 ou le véhicule (DMSO) pour les temps indiqués. Les niveaux de HA- $\beta_3$ AR et PRMT5-FLAG ont été vérifiés en utilisant des anticorps monoclonaux HA-spécifiques conjugués à la HRP et polyclonaux FLAG-spécifiques. Les niveaux de phospho-ERK1/2 et ERK1/2 ont été vérifiés à l'aide d'anticorps polyclonaux pERK1/2 et ERK1/2-spécifiques. (C) Des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR ont été transfectés avec les DsiRNAs contrôle ou PRMT5 12.2. Les cellules furent stimulées pendant 5 min et les lysats analysés par immunobuvardage. Les mêmes anticorps que (A) et (B) ont été utilisés en plus d'un anticorps polyclonal PRMT5-spécifique pour la vérification des niveaux de PRMT5. (D) La phosphorylation des ERK1/2 a été évaluée dans des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR transfectées transitoirement avec pcDNA3 ou pcDNA3-PRMT1-FLAG. Les échantillons ont été analysés avec les mêmes anticorps que (A) et (B). Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins trois expériences distinctes. Les analyses de densitométrie (pERK1/2/ERK) sont présentées selon les moyennes  $\pm$  erreur type d'au moins trois expériences indépendantes. IB, *immunoblotting*.

#### 7.6 La stimulation de $\beta_3$ AR induit l'activité arginine méthyltransférase en cellules

Dans le but de vérifier si l'activation du  $\beta_3$ AR induisait l'activité arginine méthyltransférase, des lysats de cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR transfectées transitoirement avec pcDNA3-PRMT5L-FLAG et stimulées avec le CL316,243 ou le véhicule pour les temps indiqués ont été utilisées. La méthylation des protéines cellulaires a été détectée par immunobuvardage avec un anticorps spécifique pour la diméthylation symétrique des arginines, qui révéla un patron de méthylation apparaissant en fonction de la stimulation du récepteur dans le temps (figure 14). Le substrat méthylé observé ici semble posséder un poids moléculaire de 37 kDa, mais il est impossible de confirmer qu'il s'agit de  $\beta_3$ AR avec cette méthode. Le patron de méthylation observé suite à la stimulation du récepteur est donc issu d'un substrat encore non identifié. Des expériences d'immunoprécipitation du  $\beta_3$ AR dans les mêmes conditions de stimulation, suivies d'immunobuvardage avec le même anticorps contre la diméthylation symétrique pour détecter la méthylation du récepteur, n'ont pas démontré de méthylation aux poids moléculaires attendus pour le récepteur immunoprécipité. Également, des essais de protéomique/spectrométrie de masse sur le récepteur immunoprécipité dans les mêmes conditions n'ont pas révélé de peptides méthylés sur arginine du  $\beta_3$ AR. Des essais en

transfectant transitoirement pcDNA3-PRMT5S-FLAG ont été réalisés, mais aucun signal de méthylation clair n'a été détecté en immunobuvardage. Cela est probablement dû au fait que PRMT5S est exprimée en moins grande quantité, ou est moins stable en milieu cellulaire que le variant PRMT5L. Le signal de méthylation étant difficile à observer, la présence réduite de PRMT5S comparée à PRMT5L en cellules ne mène pas à l'obtention d'un bon signal en immunobuvardage.



**Figure 14: La stimulation de  $\beta_3$ AR mène à l'augmentation de l'activité arginine méthyltransférase.** Des cellules HEK 293 exprimant de façon stable HA- $\beta_3$ AR ont été transfectées transitoirement avec pcDNA3-PRMT5L-FLAG. Après 48 h d'incubation, les cellules ont été stimulées avec le CL316,243 pour les temps indiqués. Les niveaux de HA- $\beta_3$ AR et PRMT5-FLAG ont été vérifiés par immunobuvardage en utilisant des anticorps monoclonaux HA-spécifiques conjugués à la HRP et polyclonaux FLAG-spécifiques (non montré). La méthylation a été détectée avec un anticorps spécifique pour la diméthylation symétrique des arginines. L'apparition d'un patron de méthylation est observée en fonction du temps de stimulation du récepteur. Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins trois expériences distinctes.



# DISCUSSION

## *8.1 Mise en contexte et étapes initiales du projet*

Les modifications post-traductionnelles sont au cœur d'une foule de mécanismes de régulation cellulaire. La compréhension des voies moléculaires et des fonctions en jeu nous apporte de nouvelles et importantes pièces d'information sur un grand nombre d'événements encore méconnus. Avec l'intention de comprendre davantage la régulation du  $\beta_3$ AR, le sous-type le moins bien caractérisé des récepteurs  $\beta$  adrénergiques, nous avons effectué des analyses de spectrométrie de masse, suivant son immunoprécipitation dans des cellules HEK 293. Dû à certaines contraintes, seulement un essai a été réalisé. Des essais futurs sont prévus pour confirmer les résultats obtenus. PRMT5 fut identifiée parmi les partenaires potentiels d'interaction, en plus de quelques-uns de ses cofacteurs protéiques. MEP50 était, sans surprise, le cofacteur protéique de PRMT5 le plus quantitativement significatif durant l'analyse. Comme mentionné précédemment, dans la cellule, PRMT5 n'agit jamais vraiment sous forme de monomère, mais plutôt sous la forme d'un complexe. Dans pratiquement la totalité des cas, PRMT5 s'associe avec MEP50, formant un tétramère d'hétérodimères. À cela peuvent s'ajouter les différents cofacteurs protéiques identifiés, menant à différents effets mécanistiques. Ceux identifiés dans notre analyse sont CHTOP, COPRS, pICln et RioK1, des partenaires classiques s'associant au méthylosome. L'identification de ces cofacteurs est intéressante, puisque ceux-ci peuvent modifier l'activité et la spécificité au substrat de PRMT5. Ces différentes interactions pourraient potentiellement avoir un impact sur  $\beta_3$ AR, via l'action de PRMT5. Les résultats obtenus nous ont donc incités à approfondir l'interaction  $\beta_3$ AR-PRMT5, puisque très peu d'exemples de régulation des RCPGs par la méthylation ont été publiés jusqu'à présent.

Le travail effectué par Sohail *et al.* en 2015 a mené à l'identification et la caractérisation d'un variant plus court de PRMT5, PRMT5S. Étant le résultat de l'excision de l'exon 3 ainsi qu'une portion de l'exon 4, PRMT5S représente environ 30% des transcrits PRMT5. Sa différence majeure avec l'autre isoforme utilisée dans ce travail (PRMT5L) est sa capacité entravée à interagir avec MEP50, puisque la région épissée correspond à une partie N-terminale d'un domaine baril TIM (un terme dérivé de l'enzyme métabolique

*triosephosphate isomerase*), impliqué dans cette interaction. De plus, PRMT5L et PRMT5S possèdent des rôles différents, voire opposés, dans la modulation d'expression des gènes (Sohail and Xie, 2015; Sohail *et al.*, 2015). Cette différence observée est peut-être justement liée à la variation de capacité d'interaction avec MEP50, menant à un changement dans la spécificité au substrat. Nous avons donc inclus les deux variants dans nos travaux.

## 8.2 Caractérisation de l'interaction entre PRMT5 et $\beta_3AR$

Des expériences de co-immunoprécipitation ont mené à la confirmation de l'interaction entre le  $\beta_3AR$  et les deux isoformes PRMT5L et PRMT5S dans un contexte cellulaire, confirmant les résultats obtenus en spectrométrie de masse. Cet essai ne confirme cependant pas que PRMT5 interagisse directement avec le récepteur. Il pourrait y avoir plusieurs scénarios expliquant l'interaction observée. Il se pourrait que MEP50 ou un autre partenaire de PRMT5 soit responsable d'interagir directement avec  $\beta_3AR$ . PRMT5 pourrait de plus interagir avec un partenaire du  $\beta_3AR$ , menant à l'observation d'une interaction indirecte en co-immunoprécipitation. Nous avons donc procédé à des essais GST-pulldown, afin de déterminer si l'interaction entre PRMT5 et  $\beta_3AR$  est directe, en plus de déterminer lesquels des domaines du récepteur sont impliqués. Nous montrons ainsi que PRMT5S interagit avec la troisième boucle intracellulaire ainsi que la première moitié de la queue C-terminale (Y346 à L367) du récepteur. Ce résultat concorde avec deux publications de 2018 démontrant l'interaction entre PRMT5 avec trois autres RCPGs, via la troisième boucle intracellulaire (Likhite *et al.*, 2015; Bowitch *et al.*, 2018). Nous observons de plus une interaction avec la queue C-terminale du récepteur. Il s'agit d'une interaction qui est aussi observée chez l'EGFR. Comme discuté en introduction, PRMT5 interagit avec la queue C-terminale de ce récepteur et la méthyle, dans ce cas-ci menant à la suppression de la signalisation ERK1/2 (Hsu *et al.*, 2011). Un autre point intéressant est la séquence des domaines d'interaction du  $\beta_3AR$  identifiés dans nos essais. La troisième boucle intracellulaire ainsi que la première moitié de la queue C-terminale du récepteur possèdent des séquences GRR, soit une séquence glycine-arginine, qui est un motif consensus de méthylation par PRMT5. Nous avons initialement émis l'hypothèse que ces deux domaines seraient ceux interagissant avec PRMT5, considérant la présence de ces motifs. Un dernier exemple supportant ces résultats est l'identification en spectrométrie de masse avec des

anticorps spécifiques pour la diméthylation symétrique de peptides issus de la digestion des récepteurs adrénergiques  $\alpha_{2A}$  et  $\alpha_{2CII}$ , qui possèdent cette même séquence consensus : une glycine flanquée d'un doublet d'arginines (Boisvert *et al.*, 2003). D'autres essais sont en cours afin de déterminer les domaines d'interaction de  $\beta_3AR$  pour l'isoforme longue de PRMT5.

Avec l'utilisation de la microscopie confocale, nous démontrons que PRMT5S co-localise avec  $\beta_3AR$  dans le cytoplasme et à la membrane plasmique. Le variant plus long, PRMT5L, apparaît sous forme d'agrégats dans la région juxtanucléaire. Cela ne reflète cependant fort probablement pas son état endogène. D'autres groupes ont pourtant observé PRMT5L sous une forme plus distribuée en cellules. Par exemple, dans des cellules HCT 116 (cellules humaines de cancer du côlon), PRMT5L a un aspect semblable à ce que l'on observe dans nos essais avec PRMT5S (Rehman *et al.*, 2018). Le comportement de PRMT5L surexprimée semble donc être dépendant du type cellulaire utilisé. Par exemple, nos résultats ne sont pas les seuls montrant l'agrégation de PRMT5L dans des cellules HEK 293 (Sohail *et al.*, 2015). Ce même groupe observe aussi cette agrégation dans des cellules HeLa (cellules humaines de cancer cervical). L'agrégation de protéines surexprimées est souvent liée à une quantité de vecteur d'expression transfecté trop importante. Nous avons donc fait l'essai de plusieurs quantités de transfection au niveau de PRMT5L. Dans tous les cas, nous pouvions observer de l'agrégation. De plus, aucun changement significatif dans la localisation des protéines n'a été observé après stimulation du récepteur. Dans l'optique de déterminer la localisation précise de ces agrégats, d'autres essais de microscopie ont été réalisés, avec différents marqueurs de compartiments cellulaires. Un premier essai a été réalisé avec des anticorps ciblant GM130, une protéine impliquée dans le maintien de la structure de l'appareil de Golgi. Se basant sur la localisation apparente des agrégats, nous avons d'abord émis l'hypothèse que ceux-ci étaient situés au niveau de l'appareil de Golgi, mais aucune co-localisation n'a été observée. Un autre essai, cette fois-ci ciblant le réseau trans golgien avec la protéine TGN46, a été réalisé. Le réseau trans golgien fait le lien entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Il est particulièrement impliqué dans la sécrétion de protéines, où il participe au ciblage et triage de protéines vers leur destination finale. Aucune co-localisation significative n'a été observée entre PRMT5 et ce compartiment cellulaire.

Finalement, un dernier essai utilisant des anticorps spécifiques pour la protéine EEA1 a été réalisé. Cette protéine, comme mentionné plus tôt, est localisée au niveau des endosomes précoces. Ces derniers sont impliqués dans le tri et le transport vers la membrane plasmique pour recyclage du cargo, ou vers les lysosomes, pour dégradation. PRMT5 n'étant pas une protéine membranaire, nous pouvons émettre l'hypothèse que, dans ce cas-ci, nous observons une concentration de cette dernière dans les endosomes précoces pour transport vers les lysosomes. Dans les conditions de surexpression comme celles reproduites dans nos essais, les cellules produisent probablement un surplus de PRMT5L, qui doit être éliminé. Le ciblage vers les lysosomes serait le moyen employé. Considérant la taille des agrégats, il est peu probable que le protéasome ait la capacité de remédier à cette accumulation anormale de protéines. Les lysosomes sont ainsi probablement fortement suscités pour participer à l'élimination de ces agrégats. Cette co-localisation avec les endosomes précoces supporte de plus l'hypothèse que l'agrégation de PRMT5L ne reflète pas sa situation endogène. On note que, malgré la co-localisation observée, il y a une différence entre la structure des agrégats et des endosomes précoces et nous ne pouvons affirmer avec certitude que les agrégats sont réellement localisés à cet endroit. Malgré cela, il est possible que nous observions ici le moyen utilisé par la cellule pour remédier au problème : un ciblage du surplus de PRMT5L vers les lysosomes pour dégradation.

### *8.3 Détermination du rôle modulateur de PRMT5 sur l'expression de surface du $\beta_3AR$*

Afin de réaliser des essais qui incluent la déplétion de PRMT5, nous avons procédé à des tests d'efficacité avec deux ARN interférents. Ceux-ci ne sont pas toujours aptes à dépléter de façon efficace la protéine ciblée. C'est ce que l'on observe dans le cas du DsiRNA 12.1. Nous observons une diminution par rapport à l'utilisation d'un ARN interférant contrôle (DsiRNA CTRL), mais cette diminution n'est pas assez drastique et ne permettrait donc pas d'obtenir des résultats fiables. Le DsiRNA 12.2, cependant, montre une efficacité marquée. C'est donc ce dernier que nous avons utilisé pour tous les tests demandant la déplétion de PRMT5L et PRMT5S. Puisque PRMT5 a précédemment été rapportée comme régulant à la hausse l'expression de surface du canal sodique cardiaque Nav1.5, nous voulions vérifier son influence potentielle sur le  $\beta_3AR$  (Beltran-Alvarez *et al.*, 2013). Il est

pertinent de mentionner qu'aucun lien direct entre le  $\beta_3$ AR et le Nav1.5 n'a été établi jusqu'à présent. La stimulation adrénérgique au niveau du cœur augmente le courant sodique via le Nav1.5, mais cette modulation est causée majoritairement par le  $\beta_1$ AR. Le  $\beta_3$ AR agit plutôt sur le canal calcique de type L, inhibant la force de contraction du cœur. Des ELISAs ont donc été réalisés afin d'évaluer l'effet de la déplétion de PRMT5 sur l'expression de surface du  $\beta_3$ AR. Aucun changement significatif n'a été observé. PRMT5 ne semble ainsi pas influencer la maturation ou le trafic de celui-ci. Même si le trafic du récepteur n'est pas affecté, cela n'exclut pas l'implication de PRMT5 dans sa maturation. Comme mentionné dans l'introduction, PRMT1 peut influencer la capacité d'activation de l'EGFR avant même que celui-ci soit transporté à la membrane. PRMT1 méthyle ce récepteur dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Lorsque celui-ci est finalement envoyé à la membrane plasmique, il possède une meilleure capacité à lier ses ligands et à s'activer. Ce type de mécanisme pourrait très bien impliquer PRMT5. C'est peut-être même le mécanisme responsable des résultats observés en essais d'activation ERK1/2 durant ce projet. L'expression totale de HA- $\beta_3$ AR a aussi été vérifiée en réalisant un immunobuvardage des lysats des cellules utilisées pour ces essais, et la déplétion de PRMT5 n'a pas d'influence à ce niveau. Si ce récepteur est méthylé par PRMT5, cette modification pourrait également être ajoutée lorsque celui-ci se retrouve à la membrane plasmique que lorsqu'il se trouve dans des compartiments cellulaires lors de sa maturation. Une augmentation de l'expression de surface du récepteur aurait pu expliquer les résultats obtenus en essais d'activation ERK1/2. Une plus grande population de récepteur disponible à la membrane mènerait à une signalisation plus prononcée. Nous pouvons en déduire qu'un autre mécanisme est responsable de l'augmentation de la signalisation ERK1/2 par  $\beta_3$ AR. Ce récepteur, comme mentionné dans l'introduction, n'est pas connu pour être internalisé. Sa désensibilisation est majoritairement observée après des périodes d'activation prolongées, via régulation à la baisse de l'expression du gène. Sa demi-vie n'est pas non plus affectée par ces longues périodes d'activation, donc aucune dégradation protéique de court à moyen terme du récepteur préexistant ne contribue à sa régulation à la baisse (Nantel *et al.*, 1994). Puisque la méthylation des RCPGs est un sujet relativement nouveau, nous avons tout de même effectué des essais d'internalisation afin de confirmer l'inhabileté du récepteur à internaliser, en se concentrant spécifiquement sur la modulation par PRMT5. Comme attendu, la déplétion de

PRMT5 n'a pas significativement changé l'expression de surface du  $\beta_3$ AR, suivant la stimulation. Ce résultat indique une fois de plus que la modulation par PRMT5 ne se fait pas via un changement dans la quantité de récepteur à la membrane, mais se fait plutôt via un autre mécanisme.

#### 8.4 Implication de PRMT5 dans la modulation de la signalisation du $\beta_3$ AR

Par la suite, nous avons évalué la capacité de PRMT5 à moduler l'activation de ERK1/2  $\beta_3$ AR-spécifique après stimulation. Nous montrons que la surexpression de PRMT5 mène à la promotion de la phosphorylation ERK1/2 suivant la stimulation de  $\beta_3$ AR, alors que la déplétion de PRMT5 mène à une réduction de la phosphorylation ERK1/2. Une différence dans le patron d'activation a été observée dépendamment du variant PRMT5 transfecté. PRMT5S cause une augmentation plus soutenue de l'activation de ERK1/2, alors que l'augmentation observée dans le cas de PRMT5L atteint son maximum à la marque de 5 min, pour finalement regagner les niveaux contrôles immédiatement après. Nous démontrons ainsi que PRMT5 favorise l'activation ERK1/2 issue du  $\beta_3$ AR. La relation entre PRMT5 et ERK1/2 n'est pas nouvelle; via la méthylation des protéines RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*), PRMT5 peut moduler à la baisse l'activation de ERK1/2. Les facteurs de croissance mènent à l'activation de la voie RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2 (annexe I). Cette réponse aux facteurs de croissance mène aussi PRMT5 à méthyler les différentes isoformes de RAF, promouvant leur dégradation, limitant ainsi leur capacité de phosphorylation et diminuant ultimement l'amplitude d'activation de ERK1/2. L'inhibition de la méthylation des arginines dans des cellules PC12 (cellules de rat de phéochromocytome, une tumeur qui se développe à partir des cellules chromaffines de la médullosurrénale) mène à une augmentation de l'amplitude de signal ainsi que la prolongation de la durée de la signalisation ERK1/2. Un autre phénomène important à mentionner est l'activation de l'activité arginine méthyltransférase par PRMT5 en réponse au facteur de croissance épidermique (EGF) et de sa diminution en réponse au facteur de croissance nerveuse (NGF) (Andreu-Pérez *et al.*, 2011). Puisque nous démontrons que la présence de PRMT5 favorise la signalisation ERK1/2 issue de  $\beta_3$ AR au lieu de la diminuer comme observé dans le cas de l'EGFR, nous sommes menés à penser que la modulation de l'activation de la voie ERK1/2 par PRMT5 est contexte dépendante, voire récepteur dépendante. Cette modulation pourrait

ainsi être potentiellement impliquée dans plusieurs voies de signalisation impliquant ERK1/2 et jouer un rôle important dans la réponse aux signaux externes. Les différences observées au niveau des patrons de signalisation ERK1/2 selon l'isoforme de PRMT5 surexprimée pointent vers des effets cellulaires différents. La voie ERK1/2 est fortement impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires importantes comme la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. Pourtant, c'est la même cascade qui mène la cellule à prendre ces différentes décisions. Comme illustré dans l'annexe II, des différences dans la durée et l'intensité de l'activité ERK1/2 vont grandement influencer la réponse, tout dépendamment du type cellulaire (Ebisuya *et al.*, 2005). Dans le cas de la modulation de la signalisation du  $\beta_3$ AR par PRMT5, nous observons que PRMT5L cause une activation ERK1/2 intense mais de courte durée, alors que PRMT5S mène à une activation de moins grande intensité, mais de plus longue durée, lorsque l'on compare aux conditions sans surexpression de PRMT5. Peut-être ces différences de patron observées entre les isoformes de PRMT5 causent une différence dans la réponse de la cellule. Il pourrait donc y avoir une différence dans la modulation du  $\beta_3$ AR et conséquemment dans la réponse cellulaire selon les ratios d'expression PRMT5S/PRMT5L. Cette modulation pourrait alors provenir de l'épissage alternatif de PRMT5, priorisant l'une ou l'autre des isoformes. La différence de distribution cellulaire entre PRMT5L et PRMT5S observée en microscopie confocale pourrait aussi jouer un rôle dans cette modulation, si elle est reflétée au niveau endogène.

Comme il existe plus qu'une PRMT, avec chacune comportant ses particularités, nous avons aussi testé la PRMT principale au niveau cellulaire, soit la PRMT de type I, PRMT1. Cette isoforme est responsable de la grande majorité de l'activité arginine méthyltransférase dans la cellule, ce qui souligne son importance dans les processus cellulaires (Tang *et al.*, 2000). De façon intéressante, la surexpression de PRMT1 a mené à l'effet opposé à celui observé pour PRMT5 : une diminution de la signalisation ERK1/2 suivant la stimulation du récepteur. On considère, dans certains contextes comme la modulation de l'expression des gènes, que PRMT1 et PRMT5 ont des rôles opposés. Dans ce cas, PRMT1 est généralement associée à une activation de l'expression des gènes, alors que PRMT5 est associée à leur répression. Peut-être que la modulation de la signalisation du  $\beta_3$ AR est un tel exemple. Cette différence pourrait être le résultat de la méthylation de résidus

différents, de la simple différence au niveau du type de méthylation catalysée, ou une combinaison des deux. Une différence au niveau du patron de migration du  $\beta_3$ AR en immunobuvardage a été observée dans les conditions où PRMT1 était aussi surexprimée. Il s'agit d'une piste qui reste à investiguer : PRMT1 a-t-elle un réel effet sur la signalisation du récepteur, ou est-ce que sa surexpression nuit à la maturation du  $\beta_3$ AR, menant à la diminution de l'activation de ERK1/2 après stimulation du récepteur? Étant la PRMT responsable de la grande majorité de l'activité arginine méthyltransférase dans la cellule, il n'est peut-être pas étonnant que celle-ci soit présente en grande quantité dans nos conditions, comme observé dans plusieurs de nos essais en immunobuvardage. Peut-être est-elle beaucoup plus stable que PRMT5 et s'accumule plus facilement en cellule. Cette accumulation excessive semble être la cause du défaut de maturation du récepteur observé. Des essais avec des quantités de transfection diminuées pour PRMT1 pourraient permettre de répondre à ces questions. La relation entre PRMT1 et la voie de signalisation ERK1/2 est peu connue. Dans les fibroblastes pulmonaires humains, la stimulation au facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines mène à l'expression marquée de PRMT1, via la voie ERK1/2. Cette augmentation de l'expression de PRMT1 favorise par la suite la prolifération des fibroblastes (Sun *et al.*, 2016). Cependant, il ne semble pas y avoir d'étude démontrant l'influence de PRMT1 sur la voie ERK1/2. PRMT1 possède toutefois un rôle de régulation envers la p38 MAPK, qui est une protéine faisant partie d'une autre famille de MAP kinase que celle de la voie ERK1/2. La p38 MAPK joue un rôle dans l'apoptose, la différenciation, la survie cellulaire et l'inflammation. Dans les cellules K562 (lignée cellulaire de leucémie myéloïde humaine), PRMT1 méthyle et active la p38 MAPK, empêchant la différenciation des cellules. Cependant, la présence de PRMT1 ne semble pas inhiber l'activation de la voie ERK1/2, qui elle est essentielle pour la différenciation (Chang *et al.*, 2010). Nos résultats obtenus ici pourraient donc être parmi les premiers démontrant l'influence de PRMT1 sur la signalisation ERK1/2. Vu le nombre impressionnant de rôles que PRMT1 joue dans la modulation de mécanismes cellulaires, on peut se demander si PRMT1 n'a pas une capacité de régulation de PRMT5. Jusqu'à présent, aucune preuve d'une telle capacité n'a été démontrée. Dans le cas de la modulation de la voie ERK1/2, l'activation de PRMT1 pourrait mener à une population de récepteurs  $\beta_3$  adrénergiques diméthylés majoritairement de façon asymétrique, vu la présence dominante de cette isoforme



comparativement à PRMT5. Dans le cas où PRMT1 n'est pas fortement recrutée au récepteur, PRMT5 pourrait prendre le dessus et mener à une population de récepteurs diméthylés majoritairement de façon symétrique.

#### 8.5 Caractérisation de la méthylation par PRMT5

La méthylation des arginines change considérablement la grande capacité habituelle d'interaction de ce résidu. Comme démontré par Bowitch *et al.* et Likhite *et al.*, PRMT5 peut méthyler trois RCPGs : D2, SER-2 et DOP-3. Plus spécifiquement, cette méthylation a lieu sur la troisième boucle intracellulaire. Ce domaine est normalement un site crucial pour l'interaction de protéines régulatrices et de signalisation, incluant les protéines G. La méthylation des arginines semble alors avoir un impact significatif sur la signalisation dérivée des protéines G. Comme décrit dans l'introduction, les arginines sont des résidus ayant une grande capacité d'interaction. La méthylation de ces résidus modifie grandement cette capacité et a un impact significatif sur les interactions protéine-protéine. La méthylation de résidus arginine de la troisième boucle intracellulaire module donc l'interaction récepteur-protéine G, ce qui cause ultimement des changements dans la signalisation. De façon très intéressante, nous avons observé que la stimulation du  $\beta_3$ AR a mené à l'activation de l'action arginine méthyltransférase de manière temps-dépendante. Puisque l'anticorps utilisé permet la détection de la diméthylation symétrique, nous ne pouvons exclure l'action de PRMT9, la deuxième PRMT de type II, dans les résultats obtenus. Peut-être que celle-ci est toutefois négligeable, puisque PRMT5, dans ces conditions, était surexprimée et avait ainsi un niveau d'expression bien supérieur. Le substrat méthylé observé en immunobuvardage semble avoir un poids d'environ 37 kDa, ce qui est semblable à celui de  $\beta_3$ AR observé en lysats cellulaires, comme dans les essais d'activation ERK1/2. Des bandes à 50 kDa sont aussi observées, mais leur modulation ne semble pas claire entre les essais. Pour ces dernières, il pourrait s'agir de liaisons non spécifiques de l'anticorps. Gardant en tête les limites de l'essai, nous ne pouvons confirmer que les bandes à 37 kDa sont en effet le récepteur. Il s'agit de résultats encourageants, mais il faut considérer que la méthylation est un processus très répandu en cellule et un grand nombre de protéines substrats peuvent être méthylées. La stimulation du récepteur pourrait mener à sa méthylation par PRMT5, ou pourrait mener à la méthylation d'un autre substrat, impliqué ou non dans la signalisation de  $\beta_3$ AR. Les limites de cette

méthode sont surtout reliées à l'anticorps utilisé pour visualiser la méthylation. Celui-ci est propice aux liaisons non spécifiques et donne rarement un résultat clair et net. Nous pouvons ajouter à cela que, puisque la méthylation est un phénomène très répandu dans la cellule, on obtient un signal qui est très répandu et peu localisé. Il en résulte donc que l'identification de protéines méthylées en lysats cellulaires est peu aisée. Nous pouvons toutefois conclure que la stimulation de  $\beta_3$ AR mène à la méthylation d'arginine d'une ou des protéines encore non identifiée(s). Ce résultat apporte ainsi une deuxième dimension importante au projet : nous avons démontré que PRMT5 peut moduler positivement l'activité du récepteur  $\beta_3$  adrénergique, mais la stimulation de ce dernier mène aussi à l'activation de l'activité arginine méthyltransférase de type II. Ce résultat est appuyé par ce qui est observé dans le cas des facteurs de croissance comme l'EGF, le HGF (facteur de croissance des hépatocytes) et le FGF (facteur de croissance des fibroblastes), qui causent l'activation de l'activité méthyltransférase de PRMT5, via leurs récepteurs respectifs (Andreu-Pérez *et al.*, 2011). Il s'agirait donc du premier exemple de modulation de l'activité d'une PRMT par un RCPG.

Suivant l'observation du substrat méthylé, nous avons aussi pensé qu'il s'agissait peut-être de protéines G hétérotrimériques associées au  $\beta_3$ AR. Ces dernières sont composées de trois sous-unités distinctes. La sous-unité  $\alpha$  possède un poids moléculaire d'environ 45 kDa, ce qui est trop élevé pour le 37 kDa obtenu. Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  possèdent un poids moléculaire d'approximativement 35 et 10 kDa, respectivement. La sous-unité  $\beta$  est donc celle qui se rapproche le plus du signal obtenu. Bien sûr, avec seulement les résultats obtenus, il est difficile de conclure sur l'identité du substrat méthylé observé. Des essais préliminaires effectués en parallèle avec le projet ont toutefois démontré une co-immunoprécipitation de la sous-unité  $G_{\alpha s}$  avec PRMT5. Cette interaction pourrait se faire directement et donc indiquer que cette sous-unité est un substrat de PRMT5, mais vu que cet essai est réalisé en milieu cellulaire,  $G_{\alpha s}$  interagit possiblement avec d'autres protéines, comme le complexe des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Peut-être que cette interaction se fait via ces autres protéines. Des essais de méthylation en immunoprécipitant  $G_{\alpha s}$  pourront aussi être réalisés pour la continuité du projet. Il n'y a, jusqu'à maintenant, aucune démonstration de la méthylation des protéines G. Il s'agirait ici d'une découverte importante en matière de modulation des RCPGs. Certains motifs dans la séquence des sous-unités  $\alpha$  sont très intéressants. Par exemple, les résidus 225

à 232 de la sous-unité  $G_{\alpha s}$  forment le motif GGXRXXRR, qui est glycine-arginine-riche et probablement ciblé par les PRMTs. Ce qui est le plus intéressant, c'est que le motif GXRXXR est conservé dans toutes les isoformes des sous-unités  $G_{\alpha}$  et se trouve dans la région *switch II*, qui est impliquée dans la liaison avec la sous-unité  $G_{\beta}$  et se situe dans la région générale de liaison du GTP (McIntire, 2009; Baltoumas *et al.*, 2013). Une méthylation à cet endroit aurait potentiellement un effet marqué sur la signalisation, via interférence avec la liaison au GTP et en modulant les capacités d'interaction entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ .

Les essais de spectrométrie de masse effectués en début de projet avaient un potentiel d'identifier des séquences méthylées du  $\beta_3$ AR. Avec cette méthode, il est possible d'identifier les arginines méthylées, à condition d'identifier les peptides contenant ces résidus. Cependant, suivant la digestion des protéines FLAG- $\beta_3$ AR immunoprécipitées, nous n'avons pas obtenu de peptides du  $\beta_3$ AR méthylés. Là est la grande faiblesse de cette méthode : on ne peut choisir les séquences peptidiques qui seront analysées, la digestion détermine lesquelles le seront. La détection de telles séquences relève ici de la chance. Ce résultat négatif ne signifie donc pas que  $\beta_3$ AR n'est pas méthylé par PRMT5. Une méthode plus aisée en spectrométrie de masse serait d'utiliser un anticorps dirigé contre la diméthylation symétrique pour immunoprécipiter les substrats méthylés du récepteur à partir de lysats cellulaires surexprimant  $\beta_3$ AR et PRMT5 et en les comparant à des conditions où seulement  $\beta_3$ AR est surexprimé. Afin d'identifier le substrat méthylé de 37 kDa décrit plus haut, nous pourrions répéter l'essai réalisé avec les lysats cellulaires, mais avec une immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre la diméthylation symétrique et, suivant la migration SDS-PAGE, la portion de gel vis-à-vis le marqueur de poids moléculaire à 37 kDa pourrait être extraite et analysée en spectrométrie de masse. Afin de déterminer quel domaine intracellulaire du  $\beta_3$ AR est méthylé (si celui-ci est méthylé), nous avons développé des essais en milieu cellulaire. Cette méthode utilise le vecteur d'expression pcDNA3 pour exprimer les différents domaines intracellulaires du récepteur avec l'étiquette FLAG. Ces protéines seront surexprimées avec ou sans PRMT5 et seront par la suite immunoprécipitées avec des anticorps FLAG-spécifiques. Un immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre la diméthylation symétrique pourra ensuite être réalisé afin de déterminer s'il y a présence de méthylation sur les différents domaines, en comparant avec les conditions où PRMT5

n'était pas surexprimée. La taille des domaines intracellulaires étant très réduite (on pourrait les qualifier de peptides), des méthodes alternatives devront être utilisées afin de faire la migration SDS-PAGE, avec des gels spéciaux et des membranes de transfert avec de plus petits pores. Cette méthode est relativement simple et se fait en milieu cellulaire, ce qui est plus représentatif de la réalité qu'un essai *in vitro*. Afin de caractériser les résidus méthylés, nous pourrions réaliser des mutations ponctuelles aux positions des différentes arginines des domaines qui sont identifiés lors de l'essai décrit. Ces arginines pourront être remplacées par des alanines, qui ont une charge neutre, mais pourraient aussi être changées pour des lysines, qui possèdent une charge semblable, mais ne peuvent être méthylées par les PRMTs.

### *8.6 Implication du projet dans le contexte cardiologique*

Le récepteur  $\beta_3$  adrénergique en particulier a montré un bon potentiel dans le traitement de plusieurs maladies tel que dans le cas de la vessie hyperactive (Vij and Drake, 2015). Dans le cœur, le  $\beta_3$ AR possède une propriété unique, soit opposer l'effet inotrope classique des récepteurs adrénergiques  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , agissant ainsi en tant que contre-acteur et prévenant la surstimulation adrénergique dans un contexte de maladie cardiaque. Cette capacité provient du couplage de  $\beta_3$ AR à l'oxyde nitrique synthase, menant ultimement à la relaxation du myocarde. Des approches utilisant des agonistes  $\beta_3$ AR-spécifiques ont déjà démontré un bon potentiel dans le traitement de l'hypertrophie cardiaque (Niu *et al.*, 2013; Watts *et al.*, 2014). L'étude de la relation entre le  $\beta_3$ AR et PRMT5 dans un contexte cardiaque s'avérerait donc très intéressante.

Nous avons, en collaboration avec le laboratoire du Pr Auger-Messier à l'Université de Sherbrooke, développé et optimisé des shRNAs (*short hairpin RNA*) qui pourront être utilisés pour dépler PRMT5 en cardiomyocytes, via infection virale. Plusieurs shRNAs ont d'abord été testés. Après quantification en densitométrie, le shRNA le plus efficace pour diminuer l'expression de PRMT5 a été sélectionné. Des tests additionnels ont révélé qu'une MOI de trente était optimale. La *multiplicity of infection*, ou MOI, est le terme désignant le nombre de virions utilisés par cellule infectée. De plus, il a été déterminé qu'un temps d'incubation de 144 heures permet une déplétion optimale. La combinaison de ces conditions permet d'obtenir une déplétion protéique de PRMT5 dans des cardiomyocytes ventriculaires

néonataux de rats Sprague Dawley avec une efficacité de plus de 95%, tel qu'observé en immunobuvardage. Cet outil permettra de réaliser plusieurs essais fonctionnels, au niveau de la signalisation du  $\beta_3$ AR. Nous pourrions ainsi évaluer la production d'oxyde nitrique via l'activation du  $\beta_3$ AR, en déplétant ou non PRMT5. Cet essai servira à déterminer si PRMT5 peut influencer la capacité du récepteur à mener indirectement à la production d'oxyde nitrique, menant ultimement à la relaxation du myocarde. Le projet pourra de plus être poussé plus loin en étant intégré dans un modèle animal d'hypertrophie cardiaque, où l'on évaluerait la contribution de PRMT5 dans la prévention du développement de l'hypertrophie cardiaque via l'action cardioprotectrice du  $\beta_3$ AR.

L'ensemble de nos résultats propose un nouveau mécanisme modulant l'isoforme moins connue du récepteur adrénergique  $\beta$ . L'implication de PRMT5 pourrait ainsi être une cible pharmacologique dans le traitement de plusieurs maladies liées à ce récepteur. Des travaux futurs sur la méthylation des arginines des RCPGs et des protéines impliquées dans leur régulation vont permettre l'acquisition de connaissances précieuses sur un nouveau mécanisme de modulation de récepteurs potentiellement très important.

## CONCLUSION

La nouvelle relation entre la protéine PRMT5 et le récepteur  $\beta_3$ AR détaillée dans ce document permet d'approfondir les connaissances présentement très limitées en ce qui concerne le nouveau champ d'études de la méthylation des RCPGs. Nous démontrons que PRMT5 module l'activité du récepteur au niveau de sa signalisation ERK1/2. Ces résultats supportent les quelques articles publiés dernièrement, suggérant que les PRMTs sont potentiellement impliquées à grande échelle dans la modulation des RCPGs. Plus spécifiquement, nous démontrons une nouvelle voie de régulation de l'activité de l'isoforme trois du récepteur  $\beta$  adrénergique. La régulation de cette dernière étant présentement peu connue, ces résultats permettent d'éclaircir quelques questions à son sujet. Nous démontrons de plus que l'activation du  $\beta_3$ AR cause l'activation de l'activité arginine méthyltransférase, très probablement de PRMT5, ce qui n'a jamais été démontré dans le cas d'un RCPG. Le  $\beta_3$ AR pourrait donc causer l'activation ou la modulation d'autres voies via l'action de PRMT5, dépendamment du substrat méthylé. Plus important encore, nous décrivons une nouvelle voie pouvant potentiellement être une cible pharmacologique dans la modulation de l'hypertrophie cardiaque via l'action cardioprotectrice du récepteur  $\beta_3$  adrénergique.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Andreu-Pérez, P. *et al.* (2011) 'Protein arginine methyltransferase 5 regulates ERK1/2 signal transduction amplitude and cell fate through CRAF', *Science Signaling*, 4(190), pp. 1–15.
- Anthony, A. *et al.* (1996) 'The  $\beta$ 3-adrenoceptor agonist CL316243 prevents indomethacin-induced jejunal ulceration in the rat by reversing early villous shortening', *Journal of Pathology*, 179(3), pp. 340–346.
- Antonysamy, S. *et al.* (2012) 'Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44), pp. 17960–17965.
- Arch, J. R. S. *et al.* (1984) 'Atypical  $\beta$ -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs', *Nature*, 309(5964), pp. 163–165.
- Auclair, Y. and Richard, S. (2013) 'The role of arginine methylation in the DNA damage response', *DNA Repair*. Elsevier B.V., 12(7), pp. 459–465.
- Azzi, M. *et al.* (2003) ' $\beta$ -arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors', *PNAS*, 100(20), pp. 11406–11411.
- Balligand, J. L. (2016) 'Cardiac salvage by tweaking with beta-3-Adrenergic Receptors', *Cardiovascular Research*, 111(2), pp. 128–133.
- Baltoumas, F. A., Theodoropoulou, M. C. and Hamodrakas, S. J. (2013) 'Interactions of the  $\alpha$ -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: A critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials', *Journal of Structural Biology*. Elsevier Inc., 182(3), pp. 209–218.
- Bedford, M. T. and Clarke, S. G. (2009) 'Protein Arginine Methylation in Mammals : Who, What, and Why', *Molecular cell*, 33(1), pp. 1–13.
- Belge, C. *et al.* (2014) 'Enhanced expression of  $\beta$ 3-adrenoceptors in cardiac myocytes attenuates neurohormone-induced hypertrophic remodeling through nitric oxide synthase', *Circulation*, 129(4), pp. 451–462.
- Beltran-Alvarez, P. *et al.* (2013) 'Protein arginine methyl transferases-3 and -5 increase cell surface expression of cardiac sodium channel', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 587(19), pp. 3159–3165.
- Bengtsson, T., Cannon, B. and Nedergaard, J. (2000) 'Differential adrenergic regulation of the gene expression of the  $\beta$ -adrenoceptor subtypes  $\beta$ 1 ,  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 in brown adipocytes', *Biochemical Journal*, 651(347), pp. 643–651.

- Bezzi, M. *et al.* (2013) 'Regulation of constitutive and alternative splicing by PRMT5 reveals a role for Mdm4 pre-mRNA in sensing defects in the spliceosomal machinery', *Genes and Development*, pp. 1903–1916.
- Blanc, R. S. *et al.* (2016) 'PRMT7 Preserves Satellite Cell Regenerative Capacity', *Cell Reports*, 14(6), pp. 1528–1539.
- Blanc, R. S. and Richard, S. (2017) 'Arginine Methylation: The Coming of Age', *Molecular Cell*, 65(1), pp. 8–24.
- Boisvert, F. *et al.* (2003) 'A Proteomic Analysis of Arginine-methylated Protein Complexes', *Molecular and Cellular Proteomics*, pp. 1319–1330.
- Bowitch, A. *et al.* (2018) 'The protein arginine methyltransferase PRMT-5 regulates SER-2 tyramine receptor-mediated behaviors in *Caenorhabditis elegans*', *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(7), pp. 2389–2398.
- Bulau, P. *et al.* (2006) 'Quantitative assessment of arginine methylation in free versus protein-incorporated amino acids in vitro and in vivo using protein hydrolysis and high-performance liquid chromatography', *BioTechniques*, 40(3), pp. 305–310.
- Calnan, B. J. *et al.* (1991) 'Arginine-mediated RNA recognition: The arginine fork', *Science*, 252(5009), pp. 1167–1171.
- Cannavo, A. and Koch, W. J. (2017) 'Targeting  $\beta$ 3-adrenergic receptors in the heart: Selective agonism and  $\beta$ -blockade', *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 69(2), pp. 71–78.
- Castillo-Meléndez, M., McKinley, M. J. and Summers, R. J. (2000) 'Intracerebroventricular administration of the  $\beta$ 3-adrenoceptor agonist CL 316243 causes Fos immunoreactivity in discrete regions of rat hypothalamus', *Neuroscience Letters*, 290(3), pp. 161–164.
- Chan-Penebre, E. *et al.* (2015) 'A selective inhibitor of prmt5 with in vivo and in vitro potency in mcl models', *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group, 11(6), pp. 432–437.
- Chang, Y. *et al.* (2010) 'Protein-arginine Methyltransferase 1 Suppresses Megakaryocytic Differentiation via Modulation of the p38 MAPK Pathway in K562 Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), pp. 20595–20606.
- Charoensuksai, P. *et al.* (2015) 'O-GlcNAcylation of co-activator-associated arginine methyltransferase 1 regulates its protein substrate specificity', *Biochemical Journal*, 466(3), pp. 587–599.
- Chen, M., Yi, B. and Sun, J. (2014) 'Inhibition of Cardiomyocyte Hypertrophy by Protein Arginine Methyltransferase 5 \*', *Journal of Biological Chemistry*, 289(35), pp. 24325–



24335.

Cheng, D. *et al.* (2007) 'Article The Arginine Methyltransferase CARM1 Regulates the Coupling of Transcription and mRNA Processing', *Molecular Cell*, pp. 71–83.

Chini, B. and Parenti, M. (2009) 'G-protein-coupled receptors , cholesterol and palmitoylation : facts about fats', *Journal of Molecular Endocrinology*, (42), pp. 371–379.

Claing, A. *et al.* (2002) 'Endocytosis of G protein-coupled receptors : roles of G protein-coupled receptor kinases and  $\beta$ -arrestin proteins', *Progress in Neurobiology*, 66, pp. 61–79.

Coman, O. A. *et al.* (2008) 'Beta 3 adrenergic receptors: Molecular, histological, functional and pharmacological approaches', *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 50(2), pp. 169–179.

Daaka, Y., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (1997) 'Switching of the coupling of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor to different g proteins by protein kinase A', *Nature*, 390(6655), pp. 88–91.

Debler, E. W. *et al.* (2016) 'A glutamate/aspartate switch controls product specificity in a protein arginine methyltransferase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), pp. 2068–2073.

Desiraju, G. R. (2005) 'C – H ... O and other weak hydrogen bonds . From crystal engineering to virtual screening', *Chemical Communications*, (40), pp. 2995–3001.

Du, X.-J. *et al.* (2000) 'Age-dependent cardiomyopathy and heart failure phenotype in mice overexpressing  $\beta$ 2-adrenergic receptors in the heart', *Cardiovascular Research*, 48(3), pp. 448–454.

Ebisuya, M., Kondoh, K. and Nishida, E. (2005) 'The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: Mechanisms for providing signaling specificity', *Journal of Cell Science*, 118(14), pp. 2997–3002.

Emorine, L. *et al.* (1989) 'Molecular Characterization of the Human B3-Adrenergic Receptor', *Regulatory Peptides*, 54(1), pp. 279–280.

Engelhardt, S. *et al.* (1999) 'Progressive hypertrophy and heart failure in  $\beta$ 1-adrenergic receptor transgenic mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), pp. 7059–7064.

Evich, M. *et al.* (2015) 'Effect of methylation on the side-chain pKa value of arginine', *Protein Science*, 25(2), pp. 479–486.

Feng, Y. *et al.* (2013) 'Mammalian protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7) specifically targets RXR sites in lysine- and arginine-rich regions', *Journal of Biological*

*Chemistry*, 288(52), pp. 37010–37025.

Fletcher, D. S. *et al.* (1998) ‘Beta-3 adrenergic receptor agonists cause an increase in gastrointestinal transit time in wild-type mice, but not in mice lacking the Beta-3 adrenergic receptor’, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287(2), pp. 720–724.

Frankel, A. and Clarke, S. (2000) ‘PRMT3 is a distinct member of the protein arginine N-methyltransferase family PRMT3 Is a Distinct Member of the Protein Arginine N - Methyltransferase Family’, *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), pp. 32974–32982.

Fredericksson, R. *et al.* (2003) ‘The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families . Phylogenetic Analysis , Paralogon Groups , and Fingerprints’, *Molecular Pharmacology*, 63(6), pp. 1256–1272.

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

Fulton, M. D., Brown, T. and Zheng, G. (2018) ‘Mechanisms and Inhibitors of Histone Arginine Methylation’, *Physiology & behavior*, 176(1), pp. 139–148.

Gacasan, S. B., Baker, D. L. and Parrill, A. L. (2018) ‘G protein-coupled receptors: The evolution of structural insight’, *AIMS Biophysics*, 4(3), pp. 491–527.

Ganesh, L. *et al.* (2006) ‘Protein Methyltransferase 2 Inhibits NF- $\kappa$ B Function and Promotes Apoptosis †’, *Molecular and Cellular Biology*, 26(10), pp. 3864–3874.

Garcia-Marcos, M., Ghosh, P. and Farquhar, M. G. (2015) ‘GIV/Girdin transmits signals from multiple receptors by triggering trimeric G protein’, *Journal of Biological Chemistry*, 290(11), pp. 6697–6704.

Gauthier, C. *et al.* (1998) ‘The negative inotropic effect of  $\beta$ 3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle’, *Journal of Clinical Investigation*, 102(7), pp. 1377–1384.

Gouill, C. Le *et al.* (1997) ‘Role of the Cys90 , Cys95 and Cys173 residues in the structure and function of the human platelet-activating factor receptor’, *FEBS Letters*, 402, pp. 203–208.

Goulet, I. *et al.* (2007) ‘Alternative Splicing Yields Protein Arginine Methyltransferase 1 Isoforms with Distinct Activity , Substrate Specificity , and Subcellular Localization’, *Journal of Biological Chemistry*, 282(45), pp. 33009–33021.

Gros, L. *et al.* (2006) ‘Characterization of prmt7  $\alpha$  and  $\beta$  isozymes from Chinese hamster cells sensitive and resistant to topoisomerase II inhibitors’, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, pp. 1646–1656.

- Haberland, M. *et al.* (2009) ‘The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy’, *Nature Reviews Genetics*, 10(1), pp. 32–42.
- Hashimoto, M. *et al.* (2016) ‘Severe Hypomyelination and Developmental Defects Are Caused in Mice Lacking Protein Arginine Methyltransferase 1 ( PRMT1 ) in the Central Nervous System’, *Journal of Biological Chemistry*, 291(5), pp. 2237–2245.
- Ho, M. C. *et al.* (2013) ‘Structure of the Arginine Methyltransferase PRMT5-MEP50 Reveals a Mechanism for Substrate Specificity’, *PLoS ONE*, 8(2).
- Hoffmann, C. *et al.* (2004) ‘Comparative pharmacology of human  $\alpha$ -adrenergic receptor subtypes – characterization of stably transfected receptors in CHO cells’, *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, (369), pp. 151–159.
- Hopkins, A. L. and Groom, C. R. (2002) ‘The druggable genome’, *Nature reviews Drug Discovery*, 1(September), pp. 7–10.
- Hou, W. *et al.* (2018) ‘Arginine Methylation by PRMT2 Controls the Functions of the Actin Nucleator Cofilin A’, *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 45(2), pp. 262–275
- Hsu, J. *et al.* (2011) ‘Crosstalk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation’, *Nature Cell Biology*, 13(2), pp. 174–181.
- Ikenaka, K. *et al.* (2006) ‘Immunohistochemical and Western Analyses of Protein N-Methyltransferase 3 in the Mouse Brain’, *Neuroscience*, 141, pp. 1971–1982.
- Infantino, S. *et al.* (2010) ‘Arginine methylation of the B cell antigen receptor promotes differentiation’, *Journal of Experimental Medicine*, pp. 711–719.
- Iwasaki, H. *et al.* (2011) ‘Disruption of Protein Arginine N-Methyltransferase 2 regulates leptin signaling and produces leanness in vivo through loss of STAT3 methylation’, *Circulation Research*, 107(8), pp. 992–1001.
- Jain, K. *et al.* (2016) ‘Protein Arginine Methyltransferase Product Specificity Is Mediated by Distinct Active-site Architectures’, *Human Molecular Genetics*, 25(35), pp. 18299–18308.
- Jain, K., Jin, C. Y. and Clarke, S. G. (2017) ‘Epigenetic control via allosteric regulation of mammalian protein arginine methyltransferases’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(38), pp. 10101–10106.
- Jarrold, J. and Davies, C. C. (2019) ‘PRMTs and Arginine Methylation: Cancer's Best-Kept Secret?’, *Trends in Molecular Medicine*, 25(11), pp. 993–1009.

- Jing, P. *et al.* (2018) ‘The methylation induced by protein arginine methyltransferase 5 promotes tumorigenesis and progression of lung cancer’, *Journal of Thoracic Disease*, 10(12), pp. 7014–7019.
- Kim, D. *et al.* (2015) ‘PRMT3 Regulates Hepatic Lipogenesis Through Direct Interaction With LXR  $\alpha$ ’, *Diabetes*, 64(January), pp. 60–71.
- Kim, J. *et al.* (2015) ‘PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination’, *Neuroscience*, (December), pp. 1–10.
- Kousaka, A. *et al.* (2009) ‘The distribution and characterization of endogenous protein arginine N-methyltransferase 8 in mouse CNS’, *Neuroscience*. Elsevier Inc., 163(4), pp. 1146–1157.
- Keam, S.J. (2018) ‘Vibegron: First Global Approval’, *Drugs*, 78(17), pp. 1835-1839.
- Krief, S. *et al.* (1993) ‘Tissue distribution of  $\beta_3$ -adrenergic receptor mRNA in man’, *Journal of Clinical Investigation*, 91(1), pp. 344–349.
- Larsen, S. C. *et al.* (2016) ‘Proteome-wide analysis of arginine monomethylation reveals widespread occurrence in human cells’, *Science Signaling*, 9(443), pp. 1–15.
- Li, X. *et al.* (2019) ‘A patent review of arginine methyltransferase inhibitors (2010–2018)’, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. Taylor & Francis, 29(2), pp. 97–114.
- Liao, H. *et al.* (2015) ‘PRMT1-mediated methylation of the EGF receptor regulates signaling and cetuximab response’, *Journal of Clinical Investigation*, 125(12), pp. 4529–4543.
- Likhite, N. *et al.* (2015) ‘The protein arginine methyltransferase PRMT5 promotes D2-like dopamine receptor signaling’, *Science Signaling*, 8(402), pp. 1–10.
- Liu, J. *et al.* (2013) ‘Biased signaling pathways in  $\beta_2$  -adrenergic receptor characterized by 19 F-NMR’, *Science*, 335(6072), pp. 1106–1110.
- Lorton, B. M. and Shechter, D. (2019) ‘Cellular consequences of arginine methylation’, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 76(15), pp. 2933–2956.
- Lowell, B. and Flier, J. (2015) ‘Brown Adipose Tissue,  $\beta_3$  Adrenergic Receptors, and Obesity’, *Annual Review of Medicine*, (48), pp. 307–316.
- Luscombe, N. M., Laskowski, R. A. and Thornton, J. M. (2001) ‘Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level’, *Nucleic Acids Research*, 29(13), pp. 2860–2874.
- Luttrell, L. M., Maudsley, S. and Bohn, L. M. (2015) ‘Fulfilling the promise of “biased” g

protein-coupled receptor agonism', *Molecular Pharmacology*, 88(3), pp. 579–588.

McCrossan, M. *et al.* (2001) 'The trans Golgi Network Is Lost from Cells Infected with African Swine Fever Virus', *Journal of Virology*, 75(23), pp. 11755–11765.

McIntire, W. E. (2009) 'Structural determinants involved in the formation and activation of G protein  $\beta\gamma$  dimers', *NeuroSignals*, 17(1), pp. 82–99.

Meister, G. and Fischer, U. (2002) 'Assisted RNP assembly : SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs', *The EMBO Journal*, 21(21), pp. 5853–5863.

Migliori, V. *et al.* (2012) 'Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance', *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(2), pp. 136–145.

Milagro, F. I. *et al.* (1999) 'A  $\beta_3$ -adrenergic agonist increases muscle GLUT1/GLUT4 ratio, and regulates liver glucose utilization in diabetic rats', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 1(2), pp. 97–104.

Mitchell, J. B. *et al.* (1992) 'Towards an Understanding of the Interaction', *Journal of Biological Chemistry*, (226), pp. 251–262.

Mu, F.-T. *et al.* (1995) 'EEA1, an Early Endosome-Associated Protein.', *Journal of Biological Chemistry*, pp. 13503–13511.

Nakamura, N. *et al.* (1995) 'Characterization of a cis-Golgi Matrix Protein, GM130', *Journal of Cell Biology*, 131(6), pp. 1715–1726.

Nantel, F. *et al.* (1994) 'Cell-specific Down-regulation of the  $\beta_3$  -Adrenergic Receptor \*', *Journal of Biological Chemistry*, 269(18), pp. 13148–13155.

Neault, M. *et al.* (2012) 'Ablation of PRMT6 reveals a role as a negative transcriptional regulator of the p53 tumor suppressor', *Nucleic Acids Research*, 40(19), pp. 9513–9521.

Niewmierzycka, A. and Clarke, S. (1999) 'S -Adenosylmethionine-dependent Methylation in *Saccharomyces cerevisiae* ', *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), pp. 814–824.

Niu, X. *et al.* (2013) 'Cardioprotective Effect of Beta-3 Adrenergic Receptor Agonism: Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase: Beta3-AR prevents cardiac dysfunction through nNOS', *J Am Coll Cardiol*, 59(22), pp. 1979–1987.

Pahlich, S., Zakaryan, R. P. and Gehring, H. (2008) 'Identification of proteins interacting with protein arginine methyltransferase 8: The Ewing sarcoma (EWS) protein binds independent of its methylation state', *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 72(4), pp. 1125–1137.

- Paik, W. K. and Kim, S. (1968) 'Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme', *Journal of Biological Chemistry*, 243(9), pp. 2108–2114.
- Pal, S. *et al.* (2004) '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*, 24(21), pp. 9630–9645.
- Parent, A. *et al.* (2008) 'RACK1 regulates the cell surface expression of the G protein-coupled receptor for thromboxane A<sub>2</sub>', *Traffic*, 9(3), pp. 394–407.
- Pierce, K. L. *et al.* (2002) 'Seven-transmembrane receptors', *Molecular Cell Biology*, 3(September), pp. 639–650.
- Quan, X. *et al.* (2015) 'The protein arginine methyltransferase PRMT5 regulates A $\beta$ -induced toxicity in human cells and *Caenorhabditis elegans* models of Alzheimer's disease', *Journal of Neurochemistry*, (134), pp. 969–977.
- Rehman, I. *et al.* (2018) 'PRMT5-mediated arginine methylation of TDP1 for the repair of topoisomerase I covalent complexes', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 46(11), pp. 5601–5617.
- Ruan, Y. *et al.* (2018) 'Cardiovascular disease (CVD) and associated risk factors among older adults in six low-and middle-income countries: Results from SAGE Wave 1', *BMC Public Health*. BMC Public Health, 18(1), pp. 1–13.
- Sacco, E. and Bientinesi, R. (2012) 'Mirabegron, a review of recent data and its prospects in the management of overactive bladder', *Therapeutic Advances in Urology*, 4(6), pp. 315–324.
- Sakamaki, J. *et al.* (2011) 'Arginine methylation of BCL-2 antagonist of cell death ( BAD ) counteracts its phosphorylation and inactivation by Akt', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(15), pp. 1–6.
- Sanchez, G. *et al.* (2016) 'A novel role for CARM1 in promoting nonsense-mediated mRNA decay: Potential implications for spinal muscular atrophy', *Nucleic Acids Research*, 44(6), pp. 2661–2676.
- Scaramuzzino, C. *et al.* (2015) 'Protein Arginine Methyltransferase 6 Enhances Polyglutamine-Expanded Androgen Receptor Function and Toxicity in Spinal and Bulbar Muscular Atrophy', *Neuron*. The Authors, 85(1), pp. 88–100.
- Schiöth, H. B. and Fredriksson, R. (2005) 'The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective', *General and Comparative Endocrinology*, 142, pp. 94–101.
- Simandi, X. Z. *et al.* (2018) 'Arginine Methyltransferase PRMT8 Provides Cellular Stress

- Tolerance in Aging Motoneurons’, *Journal of Neuroscience*, 38(35), pp. 7683–7700.
- Singh, V. *et al.* (2004) ‘DAL-1 / 4 . 1B tumor suppressor interacts with protein arginine N-methyltransferase 3 ( PRMT3 ) and inhibits its ability to methylate substrates in vitro and in vivo’, *Oncogene*, 23(3), pp. 7761–7771.
- Singhroy, D. N. *et al.* (2013) ‘Automethylation of protein arginine methyltransferase 6 (PRMT6) regulates its stability and its anti-HIV-1 activity’, *Retrovirology*, 10(1), pp. 1–10.
- Skeberdis, V. A. (2004) ‘Structure and function of beta3-adrenergic receptors.’, *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 40(5), pp. 407–413.
- Skieterska, K., Rondou, P. and Craenenbroeck, K. Van (2017) ‘Regulation of G Protein-Coupled Receptors by Ubiquitination’, *International Journal of Molecular Sciences*, 923(18), pp. 1–23.
- Soeder, K. J. *et al.* (1999) ‘The  $\beta$ 3-adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a G(i)-dependent mechanism’, *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), pp. 12017–12022.
- Sohail, M. *et al.* (2015) ‘Differential expression, distinct localization and opposite effect on Golgi structure and cell differentiation by a novel splice variant of human PRMT5’, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(10), pp. 2444–2452.
- Sohail, M. and Xie, J. (2015) ‘Evolutionary Emergence of a Novel Splice Variant with an Opposite Effect on the Cell Cycle’, *Molecular and Cellular Biology*, 35(12), pp. 2203–2214.
- Solari, C. *et al.* (2016) ‘Protein arginine Methyltransferase 8 gene is expressed in pluripotent stem cells and its expression is modulated by the transcription factor Sox2’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(1), pp. 194–199.
- Stemmelin, J. *et al.* (2008) ‘Stimulation of the  $\beta$ 3-adrenoceptor as a novel treatment strategy for anxiety and depressive disorders’, *Neuropsychopharmacology*, 33(3), pp. 574–587.
- Stopa, N., Krebs, J. E. and Shechter, D. (2015) ‘The PRMT5 arginine methyltransferase: Many roles in development, cancer and beyond’, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(11), pp. 2041–2059.
- Strosberg, A. (1997) ‘Structure and function of the  $\beta$ 3-ADRENERGIC RECEPTOR’, *Obstetrics and gynecology annual*, pp. 1–38.
- Sun, L. *et al.* (2011) ‘Structural insights into protein arginine symmetric dimethylation by PRMT5’, *PNAS*, 108(51), pp. 20538–20543.
- Sun, Q. *et al.* (2016) ‘PDGF-BB induces PRMT1 expression through ERK1 / 2 dependent STAT1 activation and regulates remodeling in primary human lung fibroblasts’, *Cellular*

*Signalling*. Elsevier Inc., 28(4), pp. 307–315.

Swiercz, R. *et al.* (2007) ‘Ribosomal Protein rpS2 Is Hypomethylated in PRMT3-deficient Mice’, *Journal of Biological Chemistry*, 282(23), pp. 16917–16923.

Tan, S. and Curtis-Prior, PB. (1983) ‘Characterization of the Beta-Adrenoreceptor of the Adipose Cell of the Rat’, *International Journal of Obesity*, 7(5), pp. 409-414.

Taneda, T. *et al.* (2007) ‘Specific regional distribution of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) in the mouse brain’, *Brain Research*, 1155(1), pp. 1–9.

Tang, J. *et al.* (2000) ‘PRMT1 Is the Predominant Type I Protein Arginine Methyltransferase in Mammalian Cells’, *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), pp. 7723–7730.

Tate, K. M. *et al.* (1991) ‘Expression of three human  $\alpha$ -adrenergic-receptor subtypes in transfected Chinese hamster ovary cells’, *European Journal of Biochemistry*, 361, pp. 357–361.

Tee, W. *et al.* (2010) ‘Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency’, *Genes and Development*, pp. 2772–2777.

Tradewell, M. L. *et al.* (2011) ‘Arginine methylation by PRMT1 regulates nuclear-cytoplasmic localization and toxicity of FUS / TLS harbouring ALS-linked mutations’, *Human Molecular Genetics*, 21(1), pp. 136–149.

Tsai, W. *et al.* (2013) ‘PRMT5 modulates the metabolic response to fasting signals’, *PNAS*, 110(22).

Vij, M. and Drake, M. J. (2015) ‘Clinical use of the  $\beta_3$  adrenoceptor agonist mirabegron in patients with overactive bladder syndrome’, *Therapeutic Advances in Urology*, 7(5), pp. 241–248.

Vrydag, W. and Michel, M. C. (2007) ‘Tools to study  $\beta_3$ -adrenoceptors’, *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, 374(5–6), pp. 385–398.

Walport, L. J. *et al.* (2016) ‘Arginine demethylation is catalysed by a subset of JmjC histone lysine demethylases’, *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7(May).

Wang, L. *et al.* (2014) ‘CARM1 methylates chromatin remodeling factor BAF155 to enhance tumor progression and metastasis’, *Cancer Cell*. Elsevier Inc., 25(1), pp. 21–36.

Watts, V. L. *et al.* (2014) ‘Anti-hypertrophic and anti-oxidant effect of beta3-adrenergic stimulation in myocytes requires differential neuronal NOS phosphorylation’, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 62, pp. 8–17.

Wei, T. W. *et al.* (2012) ‘Protein arginine methyltransferase 5 is a potential oncoprotein that



upregulates G1 cyclins/cyclin-dependent kinases and the phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling cascade', *Cancer Science*, 103(9), pp. 1640-1650

Wess, J. (1997) 'G-protein-coupled receptors : molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of recognition', *Molecular Basis of G-Protein-Coupled Receptor Function*, 18(12), pp. 346–354.

Xiao, W. *et al.* (2019) 'Role of protein arginine methyltransferase 5 in human cancers', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier, 114(January), pp. 1-8.

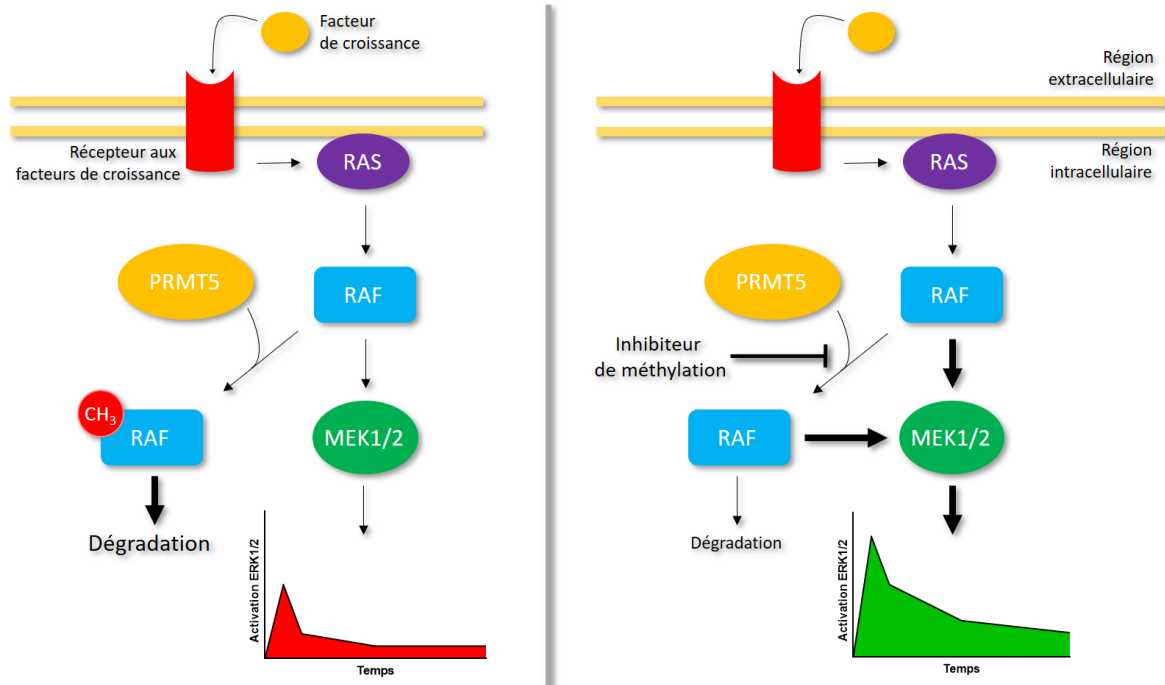
Yamagata, K. *et al.* (2008) 'Article Arginine Methylation of FOXO Transcription Factors Inhibits Their Phosphorylation by Akt', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 32(2), pp. 221–231.

Yang, Y. *et al.* (2015) 'PRMT9 is a Type II methyltransferase that methylates the splicing factor SAP145', *Nature Communications*, 6428(6), pp. 1-8.

Zhao, Q. *et al.* (2016) 'PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing', *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(3), pp. 304–311.

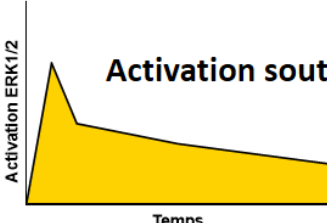
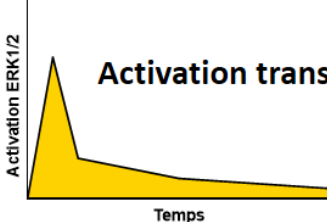
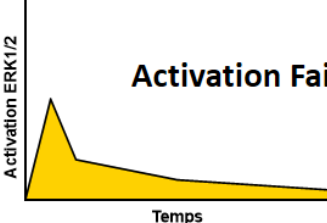
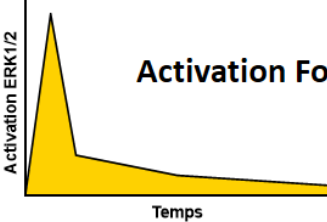
Zhao, X. X. *et al.* (2016) 'Protein arginine methyltransferase 6 (Prmt6) is essential for early zebrafish development through the direct suppression of gadd45 $\alpha$  stress sensor gene', *Journal of Biological Chemistry*, 291(1), pp. 402–412.

## ANNEXE I



**Annexe I : PRMT5 inhibe la voie de signalisation ERK issue des récepteurs aux facteurs de croissance.** L'activation d'un récepteur aux facteurs de croissance, tel l'EGFR, mène à l'activation de la voie RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2. RAF est alors méthylée par PRMT5, menant à sa dégradation (à gauche). Cela mène alors à la diminution de sa capacité d'activation de MEK1/2, qui est elle responsable de l'activation de ERK1/2. Il en résulte alors d'un plus faible signal d'activation de ERK1/2, avec une durée écourtée. À droite, l'utilisation d'inhibiteurs de méthylation réduit la méthylation de RAF par PRMT5 et réduit conséquemment sa dégradation. Sa capacité d'activation de MEK1/2 en est alors augmentée, menant à un plus grand signal d'activation ERK1/2, accompagné d'une durée prolongée de ce signal (Inspiré de Andreu-Pérez et al., 2011).

## ANNEXE II

Différences d'activité ERK1/2	Réponses cellulaires
 <p><b>Activation soutenue</b></p>	<p>Prolifération    Différentiation    Croissance filamenteuse</p> <p>Fibroblastes    Cellules PC12    Levures</p>
 <p><b>Activation transitoire</b></p>	<p>Quiescence    Prolifération    Accouplement</p>
 <p><b>Activation Faible</b></p>	<p>Prolifération    Prolifération    Apoptose</p> <p>Fibroblastes    Cellules PC12    Cellules de carcinome</p>
 <p><b>Activation Forte</b></p>	<p>Arrêt du cycle cellulaire    Différentiation    Survie</p>

**Annexe II : le motif de signalisation ERK1/2 influence la réponse cellulaire.** Les différences au niveau de la signalisation ERK1/2 mènent à différentes réponses cellulaires, en fonction du type cellulaire. Plusieurs facteurs sont responsables d'influencer la durée et l'intensité d'activation de cette voie. Dans la majorité des cas, la modulation de ces paramètres peut mener à des réponses divergentes, voire opposées. L'intensité et la durée de signalisation ERK1/2 peuvent être modulés par plusieurs mécanismes, comme la présence de protéines d'échafaudage, de protéines régulatrices ou de modifications post-traductionnelles des protéines impliquées dans cette signalisation (Adapté de Ebisuya *et al.*, 2005).