N° d'ordre NNT : 2017LYSE1252

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de

L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 340
(Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire)

Spécialité de doctorat : Cancérologie
Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire, Biochimie

Soutenue publiquement le 24/11/2017, par :

Hanine LATTOUF

CROSSTALK ENTRE LA KINASE LKB1 ET L'ARGININE METHYLTRANSFERASE PRMT5 DANS LE CANCER DU SEIN

Devant le jury composé de :

Nasr, Rihab	Professeure associée	Université Américaine de Beyrouth	Présidente/Rapporteure
Dubois, Thierry	HDR	Institut Curie	Rapporteur
Lincet, Hubert	HDR	Université Claude Bernard Lyon 1	Examinateur
Badran, Bassam	Professeur	Université Libanaise	Examinateur
Le Romancer, Muriel	HDR	Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon	Directrice de thèse
Diab-Assaf, Mona	Professeure	Université Libanaise	Directrice de thèse
Hussein, Nader	Professeur	Université Libanaise	Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

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

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

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

Remerciements

Ce travail n'aurait pas pu être achevé sans les conseils, l'aide précieuse et le soutien de plusieurs personnes qui ont contribué à sa réalisation et qui ont fait de cette expérience une aventure incroyable. Je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude et à les remercier ainsi qu'à remercier ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse :

Docteur Rihab NASR et *Docteur Thierry DUBOIS* pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et pour le temps que vous avez consacré à l'évaluation de mon manuscrit.

Docteur Hubert LINCET et *Professeur Bassam BADRAN* pour avoir accepté de juger la qualité de mon travail en tant qu'examinateurs.

Professeur Alain PUISIEUX pour avoir accepté de m'accueillir au sein du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon.

Docteur Muriel Le Romancer, ma directrice de thèse en France et la chef de l'équipe « Signalisation des stéroïdes et cancer du sein » pour ton accueil et ton encadrement continuel afin de mener à bien ce projet. Ton enthousiasme scientifique, ton dynamisme et ta patience m'ont toujours impressionnée! Je te suis très reconnaissante pour tout ce que tu m'as apporté et pour la confiance que tu m'as accordée afin d'avancer ce projet malgré toutes les difficultés que nous avons rencontrées. Merci Chef pour tous tes conseils et tous les bons moments que nous avons vécus. Merci d'avoir été présente dans mes périodes de doute, de m'avoir remonté le moral et encouragée toujours.

Professeure Mona DIAB-ASSAF, ma directrice de thèse au Liban, pour ton encadrement et ton support. Je te présente mon profond respect pour ton dévouement.

Professeur Nader HUSSEIN, mon co-directeur de thèse au Liban, pour ton engagement dans mon projet. Grand merci pour ta disponibilité et ta poursuite incessantes. Ta présence me rassurait tant et j'apprécie tes efforts pour me soutenir. Je te suis reconnaissante pour tout ce que tu as fait le long de ces années, m'aidant ainsi à surmonter les difficultés qui limitaient la poursuite de ma thèse. Grand Merci.

Docteur Ruth RIMOKH et *Docteur Jennifer RIEUSSET* pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, pour m'avoir permis de faire le point chaque année sur le progrès de mon projet et pour les précieux conseils que vous m'avez donnés.

Je tiens à remercier les organismes qui ont soutenu financièrement ma thèse.

Tous les membres de l'équipe, anciens et nouveaux, que j'ai fréquentés avec un grand bonheur et qui contribuent tous les jours au succès de notre équipe sur le plan professionnel et humain.

Docteur Laura Corbo pour tes encouragements, ta gentillesse, ainsi que pour tous tes bons conseils scientifiques qui m'ont guidée le long de ma thèse.

Docteur Chang Zhang pour tes conseils, ta gentillesse et ton encouragement continus.

Julien pour la participation précieuse que tu as apportée au projet notamment dans les derniers mois. Tu m'as bien aidée à le faire avancer. J'apprécie beaucoup l'effort et le temps que tu as consacré dessus. Grand Merci.

Ali pour ton amitié si précieuse, ton support et ton aide tout le long de ces années qu'on a partagées ensemble. Tu vas me manquer malgré les blagues que tu fais, dont je suis bien sûr l'héroïne. Je te souhaite tout le bonheur et le succès dans ta vie professionnelle et personnelle. C'était un honneur de travailler avec toi au sein de la même équipe. Bonne chance dans la recherche de mon remplaçant pour notre 'tea break'. « Time's Up for Me… Be Ready, You're Next! »

Diana pour l'ambiance familiale et rigolote que tu crées parmi nous. Ton sourire rayonnant et ton humour m'ont aidée à supporter de longues journées de travail. C'est un privilège d'avoir fait ta connaissance et d'avoir partagé avec toi pleins de souvenirs inoubliables. Courage pour le reste de ta thèse, je n'ai pas de soucis pour toi surtout en western blot…tu en es pro ! Et prends bien soin de ma P2 !

Lucie pour ton amitié et l'amour de vie que tu manifestes. Tu as participé à rendre mon séjour dans l'équipe plus agréable et amusant. Merci pour ton support lors de ma rédaction et tes opinions objectives dans ce contexte-là. Je te souhaite une très bonne continuation ; je suis sûre que tu auras un avenir prometteur.

Henri-Philippe pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Très bon courage dans ton projet et ne te décourage pas…C'est la Recherche !

Farida pour toutes les solutions que tu nous fais et les plasmides que tu nous prépares. Merci pour ton écoute et nos discussions toujours intéressantes.

Cécile pour ta gentillesse, ton aide technique et tes consignes d'hygiène et de sécurité.

Raana et *Soleilmane* pour votre support dès mon arrivée dans l'équipe ainsi que pour l'ambiance amicale que vous avez créée au labo. C'était un grand plaisir de travailler avec vous. Votre présence me manque tant.

Juste deux petits rappels à vous tous : n'oubliez pas de rendre les pipettes à leurs propriétaires après les avoir utilisées et Guys attention à la porte, deal ?

Docteur Loay KASSEM pour toutes les analyses cliniques que tu nous as faites.

Docteur Véronique MAGUER-SATTA et *Docteur Ruth RIMOKH* ainsi que les membres de vos équipes en particulier *Florence*, *Mario*, *Kevin*, *Thibaut*, *Léa*, *Margaux*, *Delphine*, *Ivan* et *Adrien*, pour votre aide et pour la bonne ambiance qu'on a partagée ensemble pendant ces années.

Les gestionnaires et *les équipes* du Cheney D pour avoir rendu mon séjour au centre très agréable.

Tous mes amis à Lyon, en particulier *Nathalie*, *Hala* et *Oussama*. Vous étiez toujours là pour moi. Nous avons vécu des moments inoubliables et vous m'avez facilité la vie loin de mon pays. Vous êtes devenus ma deuxième famille. Le lien que nous partageons persistera à jamais. Je vous aime tant.

Mes amies au Liban *Rime*, *Elise*, *Riham*, *Rola* et *Fatima* pour votre présence à mon côté. Vous m'avez encouragée à chaque instant, m'avez aidée à dépasser toutes les difficultés et à me battre pour réaliser mon rêve et terminer ma thèse. Un grand merci du fond de mon cœur.

Samer pour ton amour et ta patiente inconditionnels. Mes remerciements ne pourront jamais égaler ton grand cœur qui m'a toujours apporté du soutien. Ton encouragement à ce moment si particulier de ma vie est un véritable cadeau. « Je t'aime ».

Une spéciale dédicace à *ma famille et surtout ma mère*…Les mots ne seront jamais suffisants pour exprimer mon respect et ma profonde gratitude pour tout ce que vous ayez vécu et sacrifié pour moi. Votre présence et vos encouragements sont les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Sans votre soutien infini et votre amour illimité, je n'aurai pas pu vaincre tous les obstacles et réaliser mes ambitions et rêves. Vous êtes ma source éternelle d'amour et de force. J'espère que vous soyez toujours fiers de moi. Que Dieu vous protège !

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour mon ange gardien, mon oncle *Jean-Luc*. Tu restes à jamais gravé dans mon cœur. Je t'avais promis que je réussirai mes études et que je suivrai mes rêves jusqu'au bout, pour toi. Cette victoire t'est en partie dédiée. J'espère que de là où tu es, tu veilles sur moi.

Sommaire

Liste des Figures……...….9

Liste des Tableaux……10

Liste des Abréviations……...…11

Préface……...…….16

Introduction……17

I. Cancer du sein 17

1. Anatomie des glandes mammaires..... 17

2. Notion générale sur le cancer du sein 18

2.1. Incidence..... 18

2.2. Etiologie..... 18

2.3. Classification 19

2.3.1. TNM (Tumor Node Metastasis)..... 19

2.3.2. SBR (Scarff Bloom Richardson)..... 19

2.3.3. Marqueurs moléculaires 20

2.4. Traitements 21

3. Les œstrogènes..... 22

3.1. Synthèse et rôles physiologiques..... 22

3.2. Les récepteurs aux œstrogènes : structure et fonction..... 23

3.3. Les voies de signalisation du récepteur aux œstrogènes 24

3.3.1. Voie génomique 24

3.3.2. Voie non génomique 26

II. Les protéines arginine méthyltransférases (PRMTs)..... 28

1. Introduction générale 28

2. PRMT5..... 30

2.1. Structure, expression et localisation cellulaire 30
2.2. Substrats majeurs 31
2.3. Partenaires 32
2.4. Régulations post-traductionnelles 36
2.4.1. Phosphorylation 36
2.4.2. Ubiquitination 37
2.5. Rôles physiologiques 38
2.6. Implication dans les cancers 40
2.6.1. Cancer du poumon 41
2.6.2. Cancer gastrique 42
2.6.3. Cancer ovarien 42
2.6.4. Cancer de la prostate 43
2.6.5. Cancer du sein 44
2.7. Inhibiteurs de PRMT5 46
III. *LKB1*, gène suppresseur de tumeur 48
1. Généralités 48
1.1. Structure, expression et localisation cellulaire 48
1.2. Partenaires 49
1.3. Rôles physiologiques 50
2. Régulations post-traductionnelles 51
2.1. Phosphorylation 53
2.2. Acétylation/Déacétylation 54
2.3. Prénylation 55
3. LKB1 et le cancer du sein 55
3.1. Etude dans les modèles murins 55

3.2. Etude dans les tumeurs mammaires..... 56

Résultats…….59

Résultats Complémentaires……96

Discussion……..98

Conclusion Générale et Perspectives……...103

Annexe……105

Références Bibliographiques……...126

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Anatomie du sein. 17
Figure 2: Rôles physiologiques de l'E2 23
Figure 3: Voies de signalisation génomiques d'ERα. 26
Figure 4: Voies de signalisation non génomiques d'ERα. 27
Figure 5: Processus de méthylation des résidus arginines protéiques 29
Figure 6: Domaines des membres de la famille des PRMTs. 30
Figure 7: Structure de la protéine PRMT5 31
Figure 8: Schéma du complexe PRMT5-MEP50 33
Figure 9: Modifications post-traductionnelles de PRMT5. 38
Figure 10: Activation epigénétique de la transcription du gène AR par PRMT5. 44
Figure 11: Modifications post-traductionnelles de LKB1 51
Figure 12 : PRMT5 interagit avec LIP1 *in cellulo* 96
Figure 13 : LKB1 est essentielle pour l'interaction entre PRMT5 et LIP1 97
Figure 14 : Modèle proposé pour la régulation de la voie TGFβ par LKB1 101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification du cancer du sein: différents sous-types moléculaires. 21
Tableau 2. Substrats majeurs de PRMT5 et conséquences biologiques de leur méthylation. 32
Tableau 3. Modifications post-traductionnelles de LKB1 52

LISTE DES ABREVIATIONS

17AAG : 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin

4E-BP1 : 4E-Binding Protein 1

aa : acides aminés

ADMA : ω-N^G,N'^G-asymmetric dimethylarginine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMP : Adénosine Monophosphate

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

AMPK : AMP-activated Protein Kinase

AP-1 : Activator Protein-1

AR : Androgen Receptor

Arg : Arginine

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messager

ATF-1 : Activating Transcription Factor-1

ATM : Ataxia-Telangiectasia Mutated

ATP : Adénosine Triphosphate

BRCA1/2 : Breast Cancer 1/2

BRG1 : Brahma-like 1

CARM1 : Coactivator-Associated arginine Methyltransferase 1

CD44 : Cluster de différenciation 44

CK : Cytokératine

COPR5 : Cooperator of PRMT5

CoReg : CoRegulators

CREB : cAMP Response Element-Binding protein

Cys : Cystéine

DBD : DNA Binding Domain

DNA-PK : DNA-dependent protein kinase

E2 : Estradiol

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EMT : Epithelial – Mesenchymal Transition

EPCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule

ERE : Estrogen Response Element

ERK : Extracellular signal - Regulated Kinase

ERα : Estrogen Receptor α

ERβ : Estrogen Receptor β

FAK : Focal Adhesion Kinase

FT : Facteur de Transcription

H2A/3/4 : Histone 2A/3/4

HAT : Histone Acétyltransférase

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2

hnRNPA1 : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein

Hsp90 : Heat Shock Protein 90

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor

IL-6 : Interleukin – 6

IRES : Internal Ribosomal Entry Site

JAK2 : Janus Kinase 2

JBP-1 : JAk2-binding protein 1

Kb : Kilobases

kDa : KiloDalton

LBD : Ligand Binding Domain

LIP1 : LKB1 Interacting Protein 1

LKB1 : Liver Kinase B1

LOH : Loss Of Heterozygosity

Lys : Lysine

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

Me : Methyl

MEP50 : Methylosome protein 50

MMA : ω-N^G-monométhylarginine

MO25 : Mouse protein 25

mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

NES : Nuclear Exportation Signal

NLS : Nuclear Localization Signal

$p90^{RSK}$: p90 ribosomal S6 kinase

PARP : Poly ADP Ribose Polymerase

Pb : Paire de bases

PCa : Prostate Cancer

PDCD4 : Programmed Cell Death 4

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PJS : Peutz-Jeghers Symdrome

PLA : Proximity Ligation Assay

PR : Progesterone Receptor

PRMT : Protéine Arginine Méthyltransférase

PTM : Posttranslational Modification

R2/3/8 : Arginine 2/3/8

Rb : Rétinoblastome

RE : Response Element

RiOK1 : RiO kinase 1

RPS10 : Ribosomal Protease Regulatory Subunit

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

S6K1 : ribosomal protein S6 Kinase beta-1

SAH et AdoHcy : S-adénosylhomocystéine

SAM et AdoMet : S-adénosylméthionine

SBR : Scarff Bloom Richardson

SDMA : ω-N^{G},N'^{G}-symmetric dimethylarginine

Ser : Sérine

SGK : Serum- and Glucocorticoid- inducible Kinase

SIRT1 : NAD-dependent deacetylase Sirtuin-1

Sp1 : Specificity protein 1

STK11 : Serine Threonine Kinase 11

STRAD : STE-Related Adaptor Protein

TGF-β : Transforming Growth Factor-beta

Thr : Thréonine

TIM : triose-phosphate isomérase

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNM : Tumor Node Metastasis

TRAF4 : TNF receptor-associated factor 4

Tyr : Tyrosine

UTR : Untranslated Region

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

PREFACE

Le cancer du sein est classé parmi les cancers les plus fréquents dans le monde. Il touche en premier lieu les femmes avec une incidence de 10,4%. Cette tumeur maligne se développe à partir des tissus mammaires et est largement influencée par une exposition élevée aux œstrogènes. Ces hormones agissent *via* leur récepteur nucléaire ERα qui déclenche une voie de signalisation génomique régulant la transcription des gènes, ainsi qu'une voie non génomique activant des cascades de signalisation afin de stimuler la prolifération et la survie cellulaire.

De nombreuses protéines sont surexprimées dans le cancer mammaire, y compris PRMT5. C'est la majeure arginine méthyltransférase de type II chez les mammifères, responsable de la génération de la majorité des arginines protéiques symétriquement diméthylées. PRMT5 méthyle une variété des substrats histones et non histones et elle est impliquée dans divers processus oncogéniques tel que la progression tumorale et la croissance indépendante de l'ancrage. Parmi les partenaires de PRMT5, notre équipe a identifié la sérine/thréonine kinase LKB1 comme nouvel interactant. C'est un gène suppresseur de tumeur qui intervient dans la régulation de nombreuses voies de signalisation cellulaires par activation d'environ 14 kinases appartenant à la même famille qu'AMPK et impliquées dans les réponses des cellules face au stress énergétique.

Mon projet de thèse vise à évaluer les implications de PRMT5 et de LKB1 à l'échelle clinique dans une cohorte de 440 tumeurs mammaires provenant du Centre Léon Bérard (Lyon). De plus, ce projet s'intéresse à élucider la présence d'un potentiel « crosstalk » entre ces deux protéines dans le cancer du sein et les conséquences cellulaires qu'elle pourrait engendrer notamment sur leur localisation, leur activité catalytique et les voies de signalisation qu'elles activent.

Ce présent manuscrit va exposer les données bibliographiques tout d'abord sur le cancer du sein avec ses classifications, ses traitements et les voies de signalisation œstrogéniques qui l'influencent, ensuite sur la protéine arginine méthyltransférase PRMT5 notamment en ce qui concerne ses substrats, partenaires, rôles physiologiques et pathologiques pour finir avec les données de la littérature disponibles sur la kinase LKB1, ses partenaires, sa régulation et son implication physiologique et pathologique aussi. Par la suite, les résultats obtenus seront présentés et discutés afin d'en tirer des conclusions et des perspectives pour ce projet de thèse.

INTRODUCTION

I. Cancer du sein

Le cancer du sein est classé parmi les cancers les plus fréquents dans le monde. Il représente le tiers des cas de cancers récemment diagnostiqués et pose un problème majeur de santé publique (Dai et al., 2016). Il consiste en une tumeur maligne qui se développe à partir des tissus mammaires. Le cancer du sein peut être non invasif et appelé alors « *in-situ* », ou invasif et qualifié « infiltrant ». Il touche essentiellement les femmes, mais de rares cas sont dépistés chez les hommes où il représente 0.1% de la totalité des cancers masculins (Javidiparsijani et al., 2016).

1. Anatomie des glandes mammaires

Le sein est un organe innervé et richement vascularisé dont la fonction principale est la lactation. Il contient les glandes lactogènes formées de lobules ; elles sont activées en période d'allaitement pour produire le lait maternel déversé par des canaux, les canaux galactophores, au niveau du mamelon. Le sein est recouvert de peau s'étendant jusqu'à la région mamelonnaire, arrondie et pigmentée, appelée aréole **(Figure 1)**.

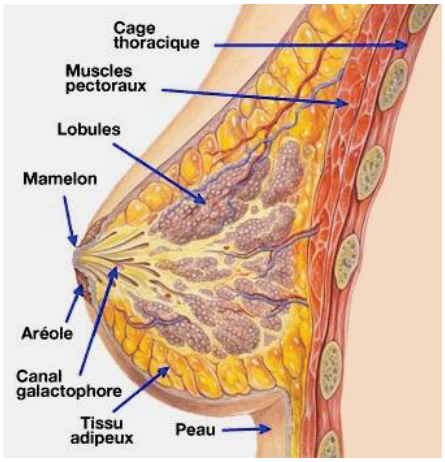


Figure 1: Anatomie du sein.

2. Notion générale sur le cancer du sein

2.1. Incidence

Le cancer du sein reste le cancer féminin le plus fréquemment diagnostiqué ; il représente 23% du nombre total des cas de cancer (Kumar and Aggarwal, 2016). En Europe, le Réseau National Alimentation Cancer Recherche (NACRe) a estimé 358 967 nouveaux cas du cancer du sein dans 27 pays de l'Union européenne en 2012 (Le réseau NACRe, 2015). En France plus particulièrement, le cancer du sein occupait le premier rang de mortalité chez les femmes devant le cancer colorectal et pulmonaire. En 2015, le nombre de nouveaux cas estimés atteignait 54062 cas, accompagné du décès de 11 913 patientes (Institut National Du Cancer, 2016). Il constitue 31,2% de l'ensemble des cancers incidents féminins et 14,1% de l'ensemble des cancers incidents tous sexes confondus.

Néanmoins, le taux de mortalité par le cancer du sein chez la femme diminue depuis près de 15 ans.

2.2. Etiologie

Le cancer du sein est multifactoriel et son initiation met en jeu de nombreux facteurs de risque. On en cite quelques-uns.

- Le sexe :

Le cancer du sein est considéré comme étant spécifiquement féminin, se développant dans 99% des cas chez les femmes. Malgré l'apparition accidentelle de ce type de tumeur chez les hommes, l'analyse des données épidémiologiques a montré une nette augmentation de la survenue du cancer du sein chez les hommes au cours des trois dernières décennies (Kamińska et al., 2015). Les traitements sont les mêmes pour les hommes et les femmes.

- L'âge :

Le risque d'apparition du cancer du sein augmente avec l'âge. En effet, environ deux tiers des patientes sont ménopausées, âgées de plus de 55 ans, alors que 10% des femmes ont moins que 40 ans. L'âge inférieur à 35 ou 40 ans est considéré de mauvais pronostic favorisant le risque de rechute (Colleoni et al., 2002).

- L'hérédité :

5 à 10% des cancers du sein sont d'origine héréditaire. Des études menées au cours des dernières décennies ont permis l'identification des gènes dont le trouble de fonction est associé à

un risque accru d'apparition de tumeurs malignes du sein ou de l'ovaire. Il s'agit essentiellement des gènes suppresseurs de tumeurs *BRCA1* et *BRCA2*. Lorsqu'une mutation de l'un de ces gènes est mise en évidence, les femmes envisagent un risque plus élevé de développer un cancer du sein: elles ont entre 40 et 85% de risque avant d'atteindre l'âge de 70 ans, alors que ce risque est de l'ordre de 10 % dans la population générale (Julian-Reynier, 2011).

- Les facteurs hormonaux :

L'exposition aux œstrogènes favorise l'apparition du cancer du sein. Ces hormones stimulent la prolifération des cellules mammaires, induisant alors une augmentation des divisions cellulaires et une élévation du risque d'altérations génétiques aléatoires. Plus la période d'activité génitale est longue (puberté précoce avant 12 ans et ménopause tardive après 55 ans) et la première grossesse est tardive, plus la sécrétion œstrogénique est accrue dédoublant ainsi le risque de cancer du sein (Colditz, 1998).

2.3. Classification

Le cancer du sein est classé en différents stades (classification TNM), différents grades (classification SBR) et en fonction des marqueurs moléculaires issus du profil d'expression du récepteur aux œstrogènes-alpha (ERα), du récepteur à la progestérone (PR) et du récepteur aux facteurs de croissance épidermiques humains (HER2).

2.3.1. TNM (Tumor Node Metastasis)

C'est la classification clinique des cancers du sein, adoptée par l'Union Internationale Contre le Cancer. Elle prend en considération la taille de la tumeur (T), l'envahissement ganglionnaire (N) et la présence de métastases à distance (M). Ces critères permettent de définir quatre stades tumoraux : les stades précoces I et II où le cancer est toujours localisé, les stades étendus dans lesquels le cancer est avancé *in situ* (stade III) ou métastatique (stade IV). Cette classification intervient dans la détermination du traitement approprié et l'évaluation du pronostic de la tumeur.

2.3.2. SBR (Scarff Bloom Richardson)

Cette classification prend en compte le pléomorphisme nucléaire, la formation de tubules et la fréquence des mitoses cellulaires. A chaque paramètre, on assigne un score de 1 à 3 et on les additionne ensuite ; le total ainsi obtenu, variant entre 3 et 9, permet de déterminer le grade de la

tumeur. En général, le grade I (score total de 3 à 5) est attribué aux tumeurs bien différenciées ayant le meilleur pronostic, le grade II (score total de 6-7) aux tumeurs moyennement agressives et le grade III (score total de 8-9) aux tumeurs non différenciées avec le pire pronostic (Pourteimoor et al., 2016).

2.3.3. Marqueurs moléculaires

Les cancers mammaires sont classés en trois groupes principaux en fonction des marqueurs cellulaires qu'ils expriment. On distingue alors les cancers ER et/ou PR positifs, les cancers HER2 positifs et les cancers triple-négatifs qui sont caractérisés par l'absence de l'expression de ER/PR et de l'amplification de HER2 (Dai et al., 2016; Kumar and Aggarwal, 2016; Lattouf et al., 2016; Norum et al., 2014) (**Tableau 1**).

Le cancer du sein « luminal A » est le plus commun et représente 50 à 60% de la totalité des cancers mammaires. Il est caractérisé par l'expression de gènes cibles d'ERα, classiquement exprimés dans l'épithélium luminal bordant les canaux mammaires. Les cellules tumorales ont un phénotype ERα (+)/PR (+) et expriment la cytokératine CK8/18. A noter que le statut ERα positif est attribué aux tumeurs dont les cellules montrent une expression nucléaire du récepteur ERα. Ce sous-type présente le meilleur pronostic avec un taux de survie accru par rapport aux autres.

Le groupe luminal A montre des similarités moléculaires avec le « luminal B » qui peut être soit ERα (+)/ PR(+)/ HER2(+) soit ERα (+)/ PR(+)/ HER2(-) avec une forte expression du marqueur de prolifération Ki67 (Dai et al., 2016; Eroles et al., 2012). Le luminal B constitue 10 à 20% de tous les cancers du sein et est associé à un mauvais pronostic, avec un phénotype plus agressif et un grade plus élevé comparé au luminal A. En outre, ce qui distingue le plus les deux sous-types, A et B, c'est l'augmentation de l'expression des gènes de la prolifération cellulaire dans le deuxième, à titre d'exemples Ki67, cycline B1 et EGFR.

Le troisième sous-type « HER2 positif » doit son nom à l'amplification du gène *HER2*, responsable d'une croissance et d'une division non contrôlées des cellules mammaires. Il constitue 15 à 20% des cancers du sein. Les cancers HER2 positifs sont généralement négatifs pour l'expression d'ERα et de PR (Pourteimoor et al., 2016) et sont associés à un mauvais pronostic et au développement de métastases.

Le sous-type « basal-like », qualifié de triple négatif, représente 10 à 20% de tous les carcinomes mammaires. Il est nommé ainsi suite à l'expression des gènes trouvés dans les

cellules myoépithéliales du sein normal tel que les cytokératines CK5 et CK17, la P-cadhérine, le CD44 et l'EGFR. Ce sous-type de cancer mammaire apparait à un âge précoce chez les femmes notamment celles d'origine africaine et est associé à une grande taille tumorale au moment du diagnostic, à un grade histologique élevé ainsi qu'à une fréquence élevée de métastases ganglionnaires. Ces tumeurs sont de mauvais pronostic et induisent des rechutes rapides chez les patientes.

Tableau 1. Classification du cancer du sein: différents sous-types moléculaires.

Sous-Type	Marqueurs Moléculaires	Grade Histologique	Origine	Pronostic	Autres Caractéristiques
Luminal A	ER+/PR+/HER2-	Faible	Cellules épithéliales luminales	Bon	- Meilleure survie globale
Luminal B	ER+/PR+/HER2+ **Ou** ER+/PR+/HER2- avec Ki-67 élevé	Intermédiaire/ Elevé	Cellules épithéliales luminales	Intermédiaire/ Mauvais	- Métastases dans le foie
HER2 positif	ER-/PR-/HER2+	Elevé	Progéniteurs luminaux tardifs	Mauvais	- Apparition de métastases précoces notamment au niveau des ganglions lymphatiques - Rechute fréquente
Basal-like	ER-/PR-/HER2-	Elevé	Cellules basales-myoépithéliales	Mauvais	- Fréquent chez les femmes africaines - Agressif - Dysfonctionnement de BRCA1

2.4. Traitements

L'hormonothérapie est recommandée pour le traitement des cancers exprimant ERα dans le noyau des cellules tumorales. Elle consiste d'une part à cibler la voie de signalisation des œstrogènes (**cf.** section 3) en utilisant des médicaments bloquant l'ERα chez les femmes préménopausées, et d'autre part à inhiber la synthèse des œstrogènes en utilisant des inhibiteurs de l'aromatase chez les femmes ménopausées (Lattouf et al., 2016; Lumachi et al., 2015). Comme les cancers du sein de type ERα positif sont étroitement affectés par E2, ERα constitue par conséquence un bon marqueur prédictif de la sensibilité des tumeurs aux hormones et de l'efficacité de l'hormonothérapie comme plan de traitement adopté.

Les tumeurs surexprimant HER2 sont généralement ciblées par des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase, des anticorps monoclonaux ou des anticorps conjugués aux agents cytotoxiques (Michel et al., 2015). A titre d'exemple, la combinaison de deux anticorps monoclonaux ciblant

HER2, le pertuzumab et le trastuzumab, augmente significativement la survie globale des patientes atteintes de cancer du sein (McCormack, 2015; Rocca et al., 2015).

Quant aux tumeurs triples négatives, aucune thérapie ciblée n'est validée, mais de nombreux médicaments sont en développement (Mirzania, 2016). Les auteurs ont montré que certains nouveaux médicaments se présentent comme des traitements potentiels, à citer les inhibiteurs des kinases de la famille Src, les inhibiteurs de PARP et les agents de platine chez les patientes présentant des mutations de BRCA.

Tinoco et al. ont rapporté qu'au cours des deux dernières décennies, les taux de mortalité par le cancer du sein ont diminué d'environ 30%, avec des améliorations du taux de survie globale allant jusqu'à 90% (Tinoco et al., 2013). Cependant, les stratégies de traitement adoptées font face à des problèmes de résistance couplée à l'activation, d'une part, des mécanismes de croissance indépendants des œstrogènes et d'autre part des voies de signalisation de survie. Toutes ces données révèlent les défis actuels rencontrés par les chercheurs et les cliniciens et soulignent la nécessité d'identifier de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la réponse des patientes aux traitements.

3. Les œstrogènes

3.1. Synthèse et rôles physiologiques

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes dérivant du cholestérol. Le 17 β-estradiol (appelé E2) constitue l'hormone la plus puissante et la prédominante chez les femmes par comparaison avec l'œstriol produit par le placenta pendant la grossesse et l'œstrone produit après la ménopause. Après leur synthèse, les œstrogènes sont sécrétés dans la circulation sanguine où ils se lient à des protéines porteuses telles que l'albumine.

E2 est impliqué dans le fonctionnement des systèmes cardiovasculaire, immunitaire, squelettique et nerveux central et il joue un rôle crucial dans le développement humain et le maintien des fonctions sexuelles et reproductives de l'organisme (Heldring et al., 2007; Kowalska and Piastowska-Ciesielska, 2016) (**Figure 2**). Il exerce ses effets en se liant à ses récepteurs ERα et ERβ (Björnström and Sjöberg, 2005). En effet, ERα et son ligand sont connus pour jouer des rôles essentiels dans le développement des caractères sexuels féminins secondaires, le cycle de reproduction féminin, l'infertilité et le maintien de la grossesse. Ceci est mis en évidence dans un modèle murin généré par une altération du gène codant pour ERα

aboutissant à une perte de la réponse à l'E2 (Lubahn et al., 1993). Les souris mâles et femelles survivent jusqu'à l'âge adulte avec des phénotypes normaux. Cependant, les femelles sont stériles, présentent des utérus hypoplasiques et des hyperhémies ovariennes avec absence de corps jaunes. Quant aux mâles, ils manifestent une fertilité diminuée.

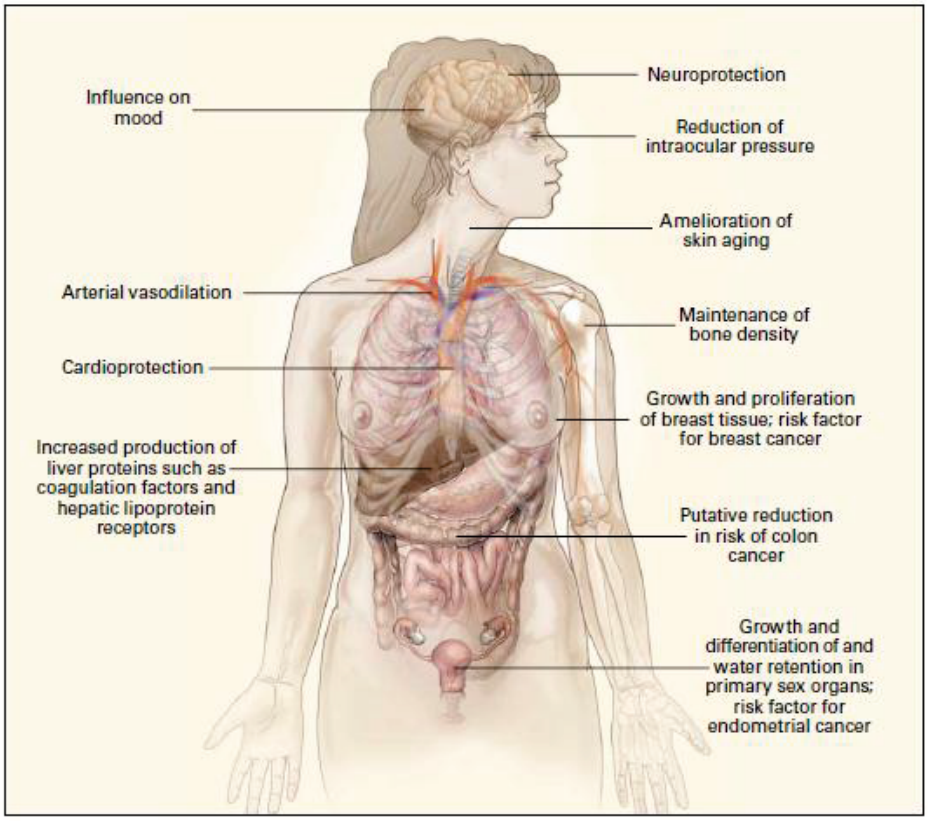


Figure 2: Rôles physiologiques de l'E2 (Gruber et al., 2002).

3.2. Les récepteurs aux œstrogènes : structure et fonction

Les récepteurs aux œstrogènes (ER) appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il s'agit des facteurs de transcription ligand-dépendants qui induisent une variété de réponses physiologiques suite à la fixation de l'hormone (Renoir et al., 2013). Deux isoformes d'ER sont connus : ERα de 66kDa, identifié en 1962 et cloné en 1986, et ERβ de 60kDa identifié 10 ans après (Le Romancer et al., 2011; Nilsson et al., 2001; Renoir et al., 2013). Ils sont codés par deux gènes distincts, cependant ils partagent un degré élevé d'homologie structurale au niveau de certains de leurs domaines. Les deux isoformes d'ER sont exprimés à de faibles

niveaux dans le tissu mammaire normal. Pourtant, les cellules cancéreuses mammaires expriment plus d'ERα que d'ERβ et 70% des cancers mammaires sont ERα positifs (Hamilton et al., 2015; Renoir et al., 2013). Ce manuscrit se focalisera essentiellement sur ERα.

ERα, comme les autres récepteurs nucléaires, est constitué de six domaines fonctionnels désignés par les lettres A-F (Tsai et O'Malley, 1994):

- le domaine A/B constitue le domaine de transactivation de la transcription AF-1. Il est responsable de la transcription indépendante du ligand.
- le domaine C appelé aussi DBD pour « DNA Binding Domain » est le domaine permettant la liaison du récepteur aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) sur l'ADN. Il est composé de deux doigts de zinc, le premier renfermant un P-box responsable de la liaison aux ERE et le deuxième contenant un D-box responsable de la dimérisation du récepteur. Ce domaine est hautement conservé entre ERα et ERβ avec plus de 94% d'identité.
- le domaine D constitue une région charnière entre les domaines C et E, conférant la flexibilité au DBD. Il contient le signal de localisation nucléaire d'ERα permettant son importation dans le noyau.
- le domaine E formé du domaine de liaison au ligand (LBD) et du domaine de transactivation de la transcription AF-2. Il est responsable de la transcription dépendante du ligand et se montre impliqué aussi dans la dimérisation du récepteur (homo- et hétéro-dimérisation).
-le domaine F est un domaine variable dont la fonction spécifique n'est pas encore entièrement clarifiée.

3.3. Les voies de signalisation du récepteur aux œstrogènes

Comme les autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, en absence de tout ligand, ERα se trouve localisé dans le cytoplasme et complexé aux protéines chaperonnes Hsp90. Son activation nécessite la fixation du ligand déclenchant ainsi une séquence d'évènements qui permettent au récepteur de transmettre le signal en question. ERα exerce ses effets *via* plusieurs voies de signalisation, activée chacune selon la nature du signal transmit et le contexte cellulaire.

3.3.1. Voie génomique

En présence de E2, ce dernier se lie à ERα induisant un changement de la conformation du récepteur, ce qui permet sa dissociation des protéines chaperonnes et sa phosphorylation. ERα se dimérise alors et se transloque dans le noyau où il se lie, par interaction directe, aux ERE sur

l'ADN des gènes cibles. Ces derniers sont impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire, la différenciation, la stimulation de l'invasion, les métastases et l'angiogenèse. Le complexe E2-ERα recrute divers régulateurs impliqués dans le remodelage de la chromatine tels l'histone acétyltransférase (HAT) et les méthyltransférases CARM1 et PRMT1, afin de renforcer l'activité transcriptionnelle (Le Romancer et al., 2011; Renoir et al., 2013). ERα peut également réguler l'expression génique sans se lier directement à l'ADN, *via* l'interaction protéine-protéine avec d'autres classes de facteurs de transcription dans le noyau. Plusieurs exemples illustrent ce type de régulation, parmi lesquels on cite l'interaction avec le facteur de transcription AP-1 (Activator Protein-1) pour le gène de IGF-1 et celle avec ATF-1/CREB pour le gène de Bcl2 (O'Lone et al., 2004).

D'autres facteurs peuvent aussi initier la voie génomique d'ERα. C'est le cas des chimiokines et des facteurs de croissance (exemple EGF) qui, en se liant à leurs récepteurs, déclenchent la voie MAPK et celle-ci active à son tour le récepteur ERα pour enchainer la suite de la voie génomique déjà décrite (**Figure 3**).

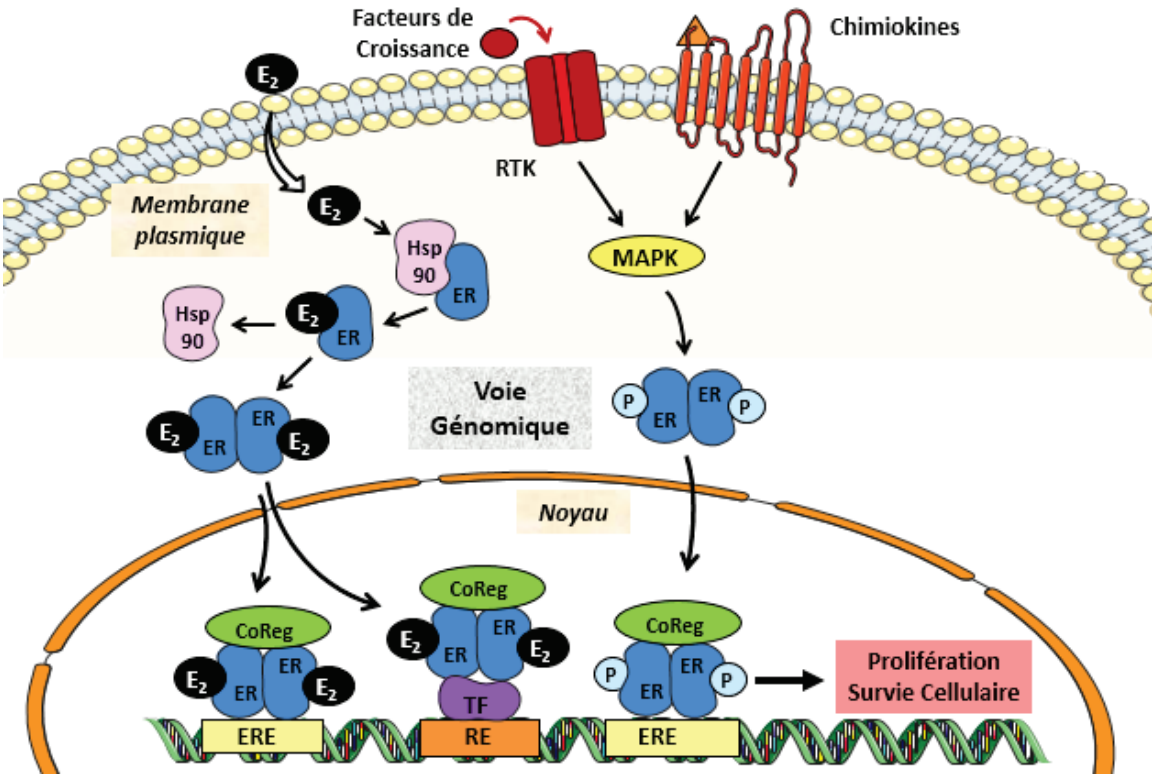


Figure 3: Voies de signalisation génomiques d'ERα (Le Romancer et al., 2011; modifiée).
Suite à la fixation de E2, ERα se détache de Hsp90 et se dimérise. Le complexe ligand-récepteur se transloque dans le noyau et se lie, soit directement soit indirectement *via* des facteurs de transcription, aux éléments de réponse correspondante sur l'ADN. Il déclenche ainsi la transcription des gènes cibles impliqués dans la survie cellulaire, en recrutant les corégulateurs adéquats. Cependant, ERα peut être activé indépendamment d'E2 : des facteurs de croissance sont capables d'induire sa phosphorylation suivie de sa translocation nucléaire pour stimuler les voies de la prolifération et la survie cellulaire.
E2: 17-β-œstradiol; Hsp 90: Heat shock protein 90; ER: Récepteur ostrogénique; CoReg: Corégulateurs ; ERE : éléments de réponse à l'œstrogène ; FT : facteurs de transcription ; RE : éléments de réponse ; RTK : Récepteur tyrosine kinase ; MAPK : Mitogen-activated protein kinase.

3.3.2. Voie non génomique

Outre les effets génomiques, E2 induit au niveau cellulaire des réponses rapides, indépendantes de l'activation de l'ARN et de la synthèse protéique, comme la mobilisation du calcium intracellulaire, la stimulation de l'adénylate cyclase et de la production d'AMPc. Ces actions constituent la voie non génomique qui met en jeu une fraction d'ERα localisée au niveau de la membrane plasmique ou à proximité et qui se lie à Src et PI3K, constituant ainsi le cœur du complexe (Björnström et Sjöberg, 2005; Levin et Pietras, 2008). Cependant, le complexe cytoplasmique contient également d'autres protéines telles que la protéine adaptatrice

membranaire Shc et FAK (Focal Adhesion Kinase). La formation du complexe non génomique entraîne l'activation des protéines kinases en aval, comme les MAPK ou Akt (Lattouf et al., 2016; Le Romancer et al., 2008, 2011). Les travaux du laboratoire ont montré que la formation du complexe ERα/Src/PI3K est médiée par la méthylation de la fraction cytoplasmique d'ERα, par l'arginine méthyltransférase PRMT1 (**Figure 4**).

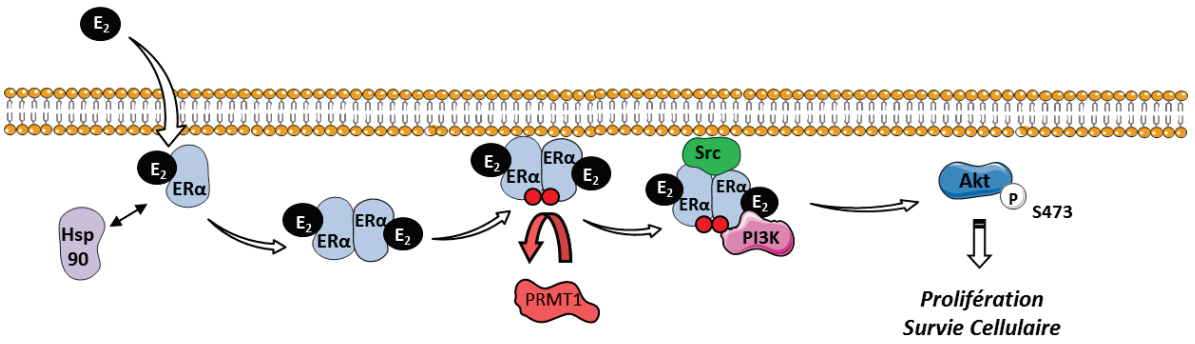


Figure 4: Voies de signalisation non génomiques d'ERα (Lattouf et al., 2016; modifiée).
Après fixation de E2, les récepteurs ERα se dimérisent et restent localisés dans le cytoplasme. Ils sont ensuite méthylés par PRMT1 (modification représentée par les 2 cercles rouges) leur permettant de former un complexe avec Src et PI3K et d'activer ainsi les voies de signalisation d'Akt médiant la survie et la prolifération cellulaire.
E2: 17-β-œstradiol; Hsp 90: Heat shock protein 90; ERα: Récepteur ostrogénique; PRMT1 : Protein Arginine Methyltransferase 1 ; PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase.

Cette modification post-traductionnelle est rapide et transitoire, après 5 minutes de stimulation à l'E2 (Le Romancer et al., 2008). Elle constitue un processus physiologique, non seulement détecté dans les cellules mammaires épithéliales normales, mais aussi fortement exprimé dans le cytoplasme des cellules tumorales. Dans ce contexte, Poulard et al. ont étudié le lien entre la formation des complexes ERα/Src et ERα/PI3K d'une part et l'expression d'ERα méthylé d'autre part, dans une cohorte de 175 tumeurs invasives du cancer du sein (Poulard et al., 2012). Les auteurs ont révélé une forte corrélation entre ces facteurs, mais aussi avec la phosphorylation d'Akt, témoignant de l'activation de cette voie en aval du complexe non génomique. De plus, ils ont montré que la voie non génomique est activée dans les tumeurs agressives. Bouchekioua-Bouzaghou et al. ont identifié la protéine LKB1 comme un nouveau partenaire de ERα/Src/PI3K dans des lignées tumorales mammaires ainsi que dans des tumeurs primaires du sein (Bouchekioua-Bouzaghou et al., 2014).

II. Les protéines arginine méthyltransférases (PRMTs)

La méthylation des protéines est une modification post-traductionnelle moins étudiée que la phosphorylation ou l'acétylation et qui consiste à ajouter un ou plusieurs groupements méthyles sur des acides aminés chargés positivement, notamment les lysines et les arginines. Il en résulte ainsi une augmentation de leur encombrement stérique et de leur hydrophobicité, ce qui altère les interactions de la protéine (Migliori et al., 2012).

Ce projet de thèse s'intéresse en particulier à la méthylation des arginines. Elle est impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la transcription, la réparation de l'ADN, l'épissage des ARNm, les interactions protéiques, la transduction du signal et la localisation subcellulaire des protéines (Baldwin et al., 2014; Poulard et al., 2016). Cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes appelées les protéines arginine méthyltransférases (PRMTs). Les histones sont les premières cibles rapportées comme méthylées (Murray, 1964). Environ 0,3% de tous les résidus arginine qui existent dans les protéines cellulaires sont méthylés (Gao et al., 2017).

1. Introduction générale

Les PRMTs constituent une famille de 9 protéines identifiées chez les mammifères. Elles sont responsables de l'ajout du groupe(s) méthyle(s) provenant d'un donneur, le S-adénosylméthionine (AdoMet noté aussi SAM), sur un ou deux atomes d'azote de la guanidine des résidus arginine. Il en résulte la formation de S-adénosylhomocystéine (AdoHcy ou SAH) et de méthylarginine qui existe sous trois formes principales identifiées: ω-N^G-monométhylarginine (MMA), ω-N^G,N^G-diméthylarginine asymétrique (ADMA) et ω-N^G,N'^G-diméthylarginine symétrique (SDMA). En fonction de la réaction catalysée et du produit formé, les PRMTs sont classées en trois types principaux (**Figure 5**). Les enzymes du type I (PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4 notée CARM1, PRMT6 et PRMT8) et celles du type II (PRMT5 et PRMT9) sont capables de générer des MMA ainsi que des ADMA et SDMA, respectivement ; quant au troisième type représenté par PRMT7, il ne catalyse que la formation de MMA (Blanc and Richard, 2017; Lorenzo and Bedford, 2011; Yang and Bedford, 2013).

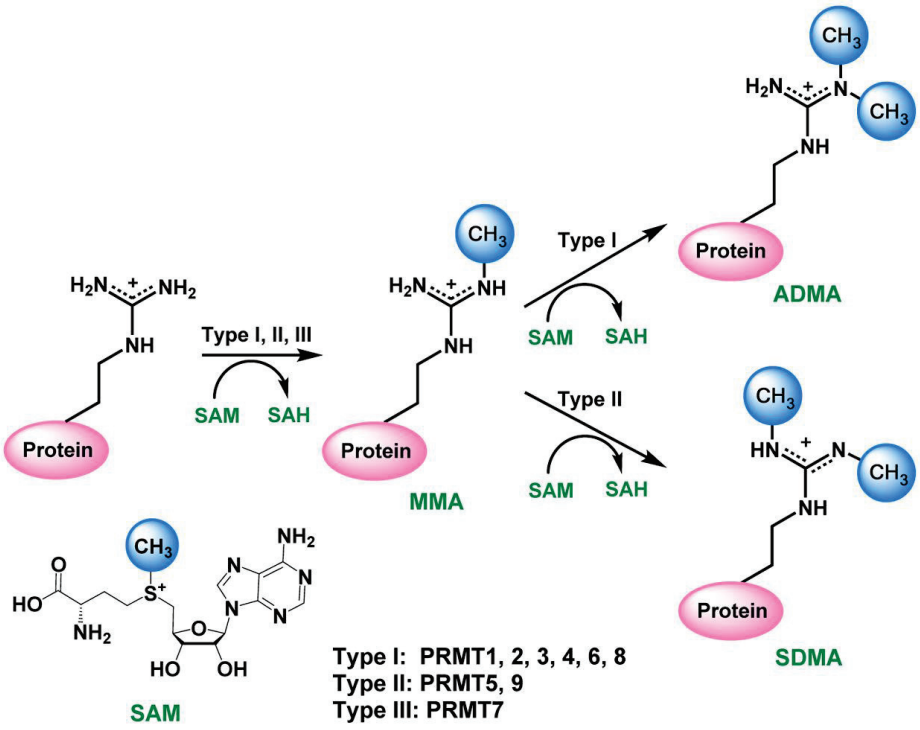


Figure 5: Processus de méthylation des résidus arginines protéiques (Hu et al., 2016).
SAM: S-adénosylméthionine; SAH: S-adénosylhomocystéine; MMA: ω-N^G-monométhylarginine; ADMA: ω-NG,N'G-asymmetric dimethylarginine; SDMA : ω-NG,N'G-symmetric dimethylarginine.

La structure globale des PRMTs se ressemble avec des variations d'un membre à l'autre, ce qui rend chacune unique (**Figure 6**). En général, les enzymes de type I et II agissent sous forme de complexes avec une cavité centrale et deux sites actifs opposés ; ces derniers lient le SAM grâce à une poche hautement conservée et caractérisée par la présence d'une boucle indispensable pour la reconnaissance et la méthylation du substrat (Blanc and Richard, 2017). Quant au type III constitué de PRMT7, il agit en tant que monomère dépourvu de la cavité centrale. Cependant, PRMT7 possède deux domaines catalytiques essentiels à son activité lui permettant d'acquérir une structure semblable à celle des types I et II et de méthyler par la suite ses substrats.

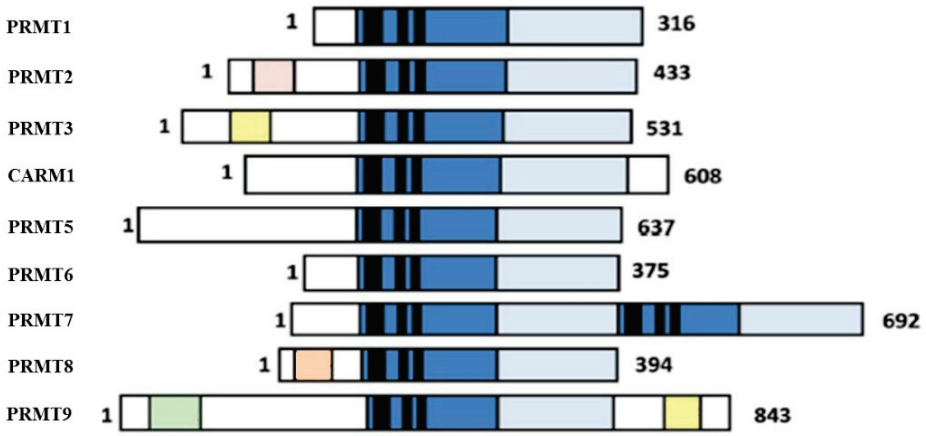


Figure 6: Domaines des membres de la famille des PRMTs (Poulard et al., 2016; modifiée).
Les domaines en bleu clair et bleu foncé représentent les domaines catalytiques des PRMTs. Ils contiennent plusieurs motifs hautement conservés, représentés en noir, importants pour leur activité méthyltransférase. Plusieurs domaines additionnels sont présents, désignés par différentes couleurs, notamment en N-terminal.

La suite du manuscrit s'intéressera essentiellement à PRMT5.

2. PRMT5

2.1.Structure, expression et localisation cellulaire

PRMT5 constitue l'enzyme principale de type II chez les mammifères, responsable de la génération de la majorité des SDMA au niveau protéique. La méthylation touche essentiellement les résidus arginine localisés dans les motifs GAR, riches en glycine et arginine (Hu et al., 2016). PRMT5 fut d'abord identifiée comme un partenaire de la tyrosine kinase Janus impliquée dans la transduction du signal de nombreuses cytokines, facteurs de croissance et hormones et fut nommée JAK2-binding protein 1 ou JBP1. Elle constituait un potentiel médiateur de l'influence de JAK2 sur le cycle cellulaire (Pollack et al., 1999). Cette arginine méthyltransférase est codée par le gène *PRMT5* localisé sur le bras long du chromosome 14 (locus 14q11.2), formée de 637aa et d'environ 72kDa (Bao et al., 2013). L'étude structurale de cette méthyltransférase montre qu'elle est composée d'un domaine tonneau TIM (triose-phosphate isomérase), renfermant 8 hélices α et 8 feuillets β, au niveau duquel PRMT5 interagit avec ses cofacteurs. Ces motifs sont suivis d'un pli Rossmann avec 6 feuillets β et 2 paires d'hélices α permettant la

fixation du SAM. Elle présente enfin à son extrémité C-terminale un tonneau β contenant un domaine de dimérisation protéique (Stopa et al., 2015; Sun et al., 2011) (**Figure 7**).

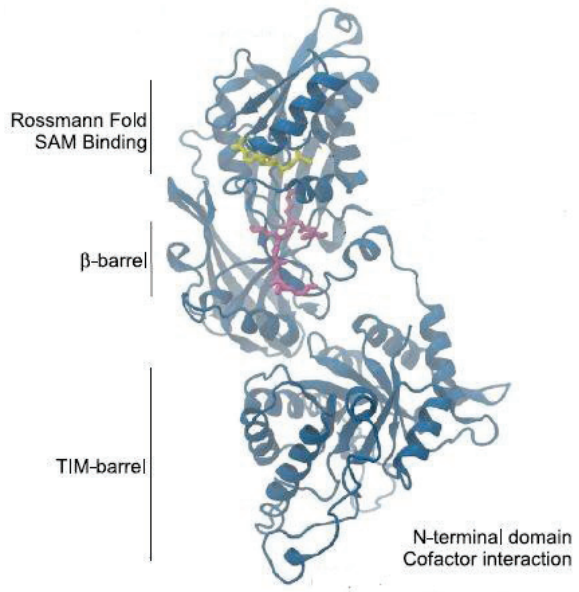


Figure 7: Structure de la protéine PRMT5 (Stopa et al., 2015; modifiée).

PRMT5 est hautement conservée chez les levures, les animaux et les plantes supérieures. Elle est exprimée dans divers organes avec une prédominance dans le muscle cardiaque, les muscles squelettiques, les testicules et les ovaires (Pollack et al., 1999). Sa séquence ne possède pas de signal de localisation nucléaire mais présente trois signaux d'exportation nucléaire, situés l'un à l'extrémité N-terminale (1-90aa) et les deux autres à l'extrémité C-terminale (500-560aa et 576-637aa). Toutefois, PRMT5 se trouve à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules des mammifères (Gu et al., 2012). Dans le noyau, PRMT5 fait partie de plusieurs complexes comme le complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine, méthylant ainsi les histones et des facteurs de transcription (Bedford and Clarke, 2009). De plus, dans le cytoplasme, PRMT5 s'associe avec d'autres cofacteurs pour former un complexe appelé méthylosome responsable de l'activité catalytique de PRMT5.

2.2. Substrats majeurs

PRMT5 méthyle une variété de substrats cellulaires, histones et non histones. Le **tableau 2** cite ses substrats majeurs ainsi que les conséquences fonctionnelles de la méthylation.

Tableau 2. Substrats majeurs de PRMT5 et conséquences biologiques de leur méthylation.

Substrats	Fonction Biologique	Références
Histone H2A et H4 R3	Répression transcriptionnelle	Chen et al., 2017; Tae et al., 2011; Tee et al., 2010
Histone H3 R2	Activation transcriptionnelle	Chen et al., 2017; Migliori et al., 2012
Histone H3 R8	Répression transcriptionnelle	Tae et al., 2011
Protéines Sm	Faciliter l'assemblage du spliceosome	Friesen et al., 2002; Guderian et al., 2011; Li et al., 2015; Meister et al., 2001
Protéine ribosomale RPS10	Faciliter l'assemblage des ribosomes	Ren et al., 2010
P53	Favoriser la survie et l'arrêt du cycle cellulaire et inhiber l'apoptose	Jansson et al., 2008; Scoumanne et al., 2009
Nucléoline	Favoriser la synthèse et la maturation des ribosomes	Guderian et al., 2011

2.3. Partenaires

PRMT5 interagit avec différents cofacteurs pour moduler son activité enzymatique.

- Methylosome Protein 50 (MEP50) :

MEP50 est une protéine d'environ 50kDa, codée par le gène *WDR77* localisé sur le bras court du chromosome 1 (locus 1p13.2). Elle présente une structure en hélice β avec des domaines répétitifs WD composés de tryptophane et d'acide aspartique. La séquence de MEP50 montre la présence de deux signaux d'exportation nucléaire mais aussi de trois signaux de localisation nucléaire, ce qui contrôle sa localisation et par la suite son action cellulaire en fonction des complexes qu'elle forme (Antonysamy et al., 2012).

MEP50 fut identifiée comme l'un des cofacteurs de PRMT5 impliqués dans la formation du méthylosome (Friesen et al., 2002). En effet, PRMT5 et MEP50 forment une structure hétéromérique, de poids moléculaire d'environ 450kDa, mettant en jeu quatre protéines PRMT5 et quatre protéines MEP50; le tétramère formé par les PRMT5 représente le noyau auquel les MEP50 se fixent suite à leur interaction avec les domaines tonneaux TIM des PRMT5 (**Figure 8**)

(Antonysamy et al., 2012; Stopa et al., 2015). D'une part, cette association aboutit à la formation du complexe de base du méthylosome capable de lier, parmi d'autres, la protéine pICLn méthylant ainsi les protéines Sm du spliceosome ou la protéine RiOK1 afin de méthyler la nucléoline. D'autre part, elle augmente l'affinité de PRMT5 pour ses substrats et renforce son activité méthyltransférase dans le méthylosome.

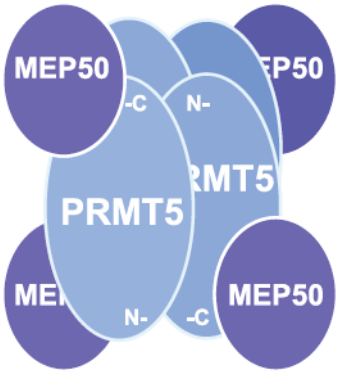


Figure 8: Schéma du complexe PRMT5-MEP50 (Stopa et al., 2015).

- pICLn :

pICLn est une protéine d'environ 26kDa, ubiquitaire, hautement conservée et considérée auparavant comme un régulateur des canaux anioniques. Il s'agit d'une protéine acide, soluble dans l'eau et localisée essentiellement dans le cytoplasme cellulaire (Sanchez-Olea et al., 1998). pICLn est une phosphoprotéine dont la structure présente de nombreux sites consensus, cibles de diverses kinases régulant ainsi sa fonction (Sanchez-Olea et al., 1998).

Des études ont montré qu'elle est impliquée dans la méthylation des protéines Sm (tel que SmD1, SmD3 et SmB) par PRMT5 et dans l'assemblage du spliceosome (Friesen et al., 2002; Meister et al., 2001; Pesiridis et al., 2009). En effet, pICLn agit comme une protéine adaptatrice qui lie d'une part les protéines Sm et d'autre part le complexe PRMT5-MEP50 en interagissant avec l'extrémité N-terminale de PRMT5. Il en résulte une régulation de la spécificité du méthylosome en orientant son activité vers la diméthylation symétrique des protéines Sm sur des motifs riches en arginine et glycine, mécanisme indispensable pour la formation de ribonucléoprotéines nucléaires (Friesen et al., 2001; Sun et al., 2011).

- RiO Kinase 1 (RiOK1) :

RiOK1 est une protéine d'environ 90kDa et constitue un membre d'une famille des protéines kinases RiOK. Il s'agit d'anciennes kinases atypiques qui présentent un manque structural au niveau des sites de reconnaissance des substrats et des motifs de la boucle d'activation généralement conservée chez les kinases typiques (Weinberg et al., 2017). RiOK1 intervient comme une protéine adaptatrice dans le complexe PRMT50-MEP50 où elle entre en compétition avec pICLn pour le même site d'interaction en N-terminal, impliquant alors une fixation exclusive de l'une ou de l'autre (Guderian et al., 2011; Sun et al., 2011). RiOK1 est exclusivement dans le cytoplasme bien que le complexe actif de PRMT5 soit détecté dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules. Elle interagit avec la nucléoline, une protéine impliquée dans la synthèse et la maturation des ribosomes (Guderian et al., 2011; Stopa et al., 2015). RiOK1 permet ainsi son recrutement au méthylosome et stimule, par l'interaction RiOK1-PRMT5, l'activité méthyltransférase de cette dernière qui par conséquence méthyle symétriquement la nucléoline. Cette modification post-traductionnelle est cruciale pour l'interaction avec l'ARN.

- Heat-shock protein 90 (Hsp90):

Les protéines de choc thermique sont des protéines chaperonnes impliquées dans le bon repliement des autres protéines, leur stabilité vis-à-vis du stress thermique ainsi que leur dégradation protéasomale. Elles constituent 1 à 2% de la totalité des protéines cellulaires et ce pourcentage tend à atteindre 4 à 6% en cas de stress (Prodromou, 2016). Hsp90 en constitue le type majeur. C'est une protéine d'environ 90kDa exprimée sous forme de deux isoformes: le premier noté Hsp90α et induit en cas de stress thermique et le deuxième noté Hsp90β constitutivement exprimé dans les cellules. Ils sont codés par des gènes différents localisés sur deux chromosomes distincts.

Hsp90 est responsable de la maturation des protéines clés dans diverses voies de signalisation y compris les kinases, les récepteurs des hormones stéroïdiennes et les facteurs de transcription et elle est impliquée dans l'assemblage et la dissociation des complexes protéiques (Prodromou, 2016). Les analyses du profil d'expression des gènes cellulaires en présence de 17-AAG, inhibiteur de Hsp90, ont montré une diminution de l'expression de la protéine PRMT5 permettant ainsi de la classifier comme un nouvel interactant de Hsp90 (Maloney et al., 2007).

En effet, Hsp90 facilite le bon repliement de PRMT5 afin d'aboutir à une protéine entièrement fonctionnelle. L'absence de ce mécanisme oriente les protéines PRMT5 mal repliées vers une dégradation protéasomale ultérieure. Cette constatation est confirmée par le traitement des cellules avec 17-AAG qui empêche Hsp90 d'exercer son rôle et améliore par conséquent l'ubiquitination de PRMT5 et sa dégradation par le protéasome (Zhang et al., 2016).

- SWI/SNF:

Les complexes de remodelage de la chromatine consistent en des enzymes ATP-dépendantes qui altèrent le contact existant entre l'ADN et les histones par hydrolyse de l'ATP, afin de réguler l'expression des gènes cibles. Ils appartiennent à la famille SNF2 qui renferme plusieurs membres répartis selon leurs domaines fonctionnels en groupes parmi lesquels on cite le groupe SWI/SNF. Ce dernier est caractérisé par la présence du domaine bromo qui lit spécifiquement les histones acétylées. Chez les mammifères, ce complexe met en jeu les ATPases BRM et brahma-like 1 (BRG1) (de la Serna et al., 2006). Les analyses de spectrométrie de masse des sous-unités du complexe SWI/SNF ont permis d'identifier PRMT5 parmi d'autres protéines avec lesquelles SWI/SNF interagit (Pal et al., 2003). L'ensemble ainsi formé est capable de méthyler les arginines des histones H3 et H4, ayant les lysines en N-terminal hypoacétylées, et de réguler par la suite l'expression des gènes.

- Coopérateur de PRMT5 (COPR5):

COPR5 est une protéine d'environ 20kDa, constituée de 184 acides aminés et dont la séquence est riche en résidus acides. Elle est exprimée dans la majorité des tissus des mammifères. COPR5 est localisée dans le noyau des cellules et interagit, *via* son extrémité C-terminale, strictement avec la fraction nucléaire de PRMT5 (Lacroix et al., 2008). Ceci permet à COPR5 de moduler la spécificité du complexe actif de PRMT5 dans le noyau vis-à-vis des histones, aboutissant ainsi à la méthylation spécifique de l'histone H4 sur l'arginine R3. En effet, COPR5 agit comme protéine adaptatrice en se liant à l'extrémité N-terminale de H4 permettant ainsi à PRMT5 de se fixer sur la chromatine et de générer des résidus H4R3 symétriquement diméthylés (Lacroix et al., 2008). L'intervention de COPR5 dans le complexe de PRMT5 est indispensable pour le recrutement de cette méthyltransférase au niveau du promoteur du gène

codant pour la cycline E1, régulateur crucial de la prolifération cellulaire, et par la suite pour la répression de son expression.

Le complexe formé par COPR5 et PRMT5 est impliqué dans la différenciation myogénique où il intervient dans la coordination des mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire et de différenciation (Paul et al., 2012). En effet, COPR5 module la régulation transcriptionnelle de certains gènes clés dans la différenciation des cellules musculaires, notamment ceux codant pour p21 et la myogénine, en régulant le recrutement de PRMT5 à leurs promoteurs.

- Menin:

Menin est une protéine d'environ 68kDa, codée par le gène *MEN1* localisé sur le chromosome 11 (locus 11q13) et constituée de 615aa. C'est une protéine ubiquitaire hautement conservée entre les espèces. Elle est mutée chez les patients souffrant de néoplasie endocrinienne multiple de type 1, syndrome caractérisé par le développement des tumeurs dans plusieurs organes endocriniens comme l'hypophyse, les îlots pancréatiques et autres (Gurung and Hua, 2013). Au niveau cellulaire, menin occupe une localisation nucléaire. Elle interagit avec plusieurs partenaires tel que la protéine MLL1 qui est une histone H3 lysine 4 méthyltransférase et augmente l'expression de $p18^{Ink4c}$ et $p27^{Kip1}$, inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes, en favorisant la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 (Gurung and Hua, 2013). Les auteurs ont rapporté que menin interagit avec l'extrémité N-terminale de PRMT5 et avec son cofacteur MEP50. En effet, menin recrute PRMT5 aux gènes qu'elle régule et la stimule pour générer les histones H4 symétriquement diméthylées sur l'arginine 3 (H4R3m2s) au niveau de leur promoteur, inhibant ainsi leur expression génique (Gurung and Hua, 2013; Muhammad et al., 2017).

2.4. Régulations post-traductionnelles

La séquence de PRMT5 est modifiée par plusieurs modifications post-traductionnelles qui régulent ses interactions avec ses partenaires ainsi que son activité catalytique (**Figure 9**).

2.4.1. Phosphorylation

Bien que PRMT5 fût initialement identifiée comme une protéine liant la kinase JAK2, aucun lien fonctionnel n'était établi entre les deux protéines. Cependant, Liu et al. ont démontré que, par comparaison avec la protéine sauvage, PRMT5 interagit plus avec les formes mutées de JAK2, soient JAK2V617F et JAK2K539L retrouvées chez les patients souffrant de néoplasmes

myéloprolifératifs (Liu et al., 2011). L'interaction découverte avec les mutants *in vitro* et *in vivo* aboutit à une phosphorylation de PRMT5 au niveau de son extrémité N-terminale, notamment sur les résidus Tyr297, Tyr304 et Tyr307 empêchant ainsi son interaction avec MEP50. De plus, la phosphorylation des résidus Tyr304 et Tyr307, résidus impliqués dans la fixation du substrat, semble altérer la conformation spatiale du site correspondant au niveau de PRMT5 (Antonysamy et al., 2012). Ceci se traduit par une diminution significative de l'activité méthyltransférase régulant par la suite le niveau global de la diméthylation symétrique des histones au niveau génétique (Antonysamy et al., 2012; Liu et al., 2011).

Espejo et al. ont récemment démontré que PRMT5 est aussi phosphorylée au niveau de son extrémité C-terminale par la kinase Akt et les SGKs (Serum- and Glucocorticoid- inducible Kinases), sur le résidu Thr634 (Espejo et al., 2017). Cette modification médie l'interaction de PRMT5 avec la protéine 14-3-3, permettant probablement à cette dernière de séquestrer PRMT5 dans le cytoplasme l'empêchant d'une part d'accomplir son rôle au niveau epigénétique et d'autre part de se lier à des protéines membranaires dans les cellules.

2.4.2. Ubiquitination

Zhang et al. ont montré pour la première fois que la protéine PRMT5 subit une polyubiquitination dans les cellules LNCaP du cancer de la prostate (Zhang et al., 2016). Cette modification met en jeu une interaction spécifique entre PRMT5 et la protéine CHIP jouant le rôle d'une E3 ubiquitine ligase, au niveau du cytoplasme cellulaire. CHIP modifie plusieurs lysines s'étalant entre les résidus 229 et 451 de la séquence de PRMT5 et dont les mutations combinées diminuent significativement le niveau de polyubiquitination de PRMT5. Elle coopère avec Hsp90 pour la régulation de la dégradation des protéines PRMT5 mal repliées et les oriente par la suite vers la dégradation protéasomale (Zhang et al., 2016). Ceci est validé par le traitement des cellules avec l'inhibiteur 17-AAG qui induit une diminution de l'expression de PRMT5, cet effet étant accentué par la surexpression cellulaire de l'ubiquitine ligase CHIP.

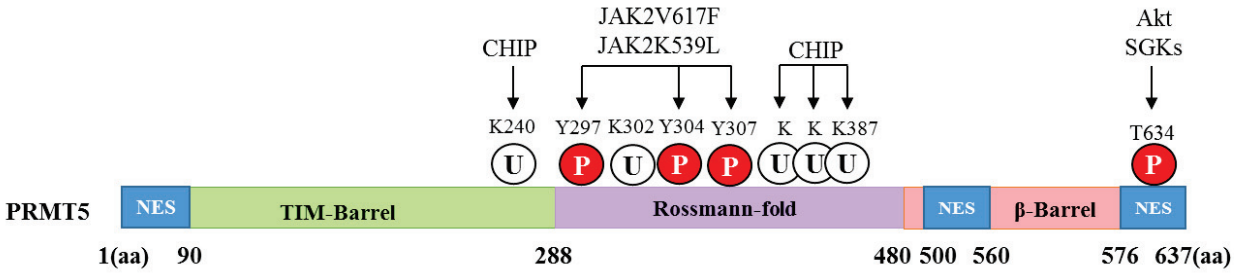


Figure 9: Modifications post-traductionnelles de PRMT5.
Les cercles en rouge représentent les sites de PRMT5 phosphorylés par diverses kinases. Les cercles en blanc représentent les sites de polyubiquitination de PRMT5 par CHIP, les lysines, s'étalant entre les résidus 229 et 451. Quant aux encadrés bleus, ils correspondent aux signaux d'exportation nucléaires (NES) que possède PRMT5.

2.5.Rôles physiologiques

PRMT5 est impliquée dans divers processus cellulaires et biologiques. Etant une arginine méthyltransférase, PRMT5 génère *in vivo* des histones symétriquement diméthylées et régule la transcription de nombreux gènes cibles, à titre d'exemples ceux codant pour la cycline E1 et la protéine Rb, contrôlant ainsi la prolifération cellulaire (Stopa et al., 2015). La régulation génique peut aussi avoir lieu indirectement *via* la méthylation des facteurs de transcription comme le gène suppresseur de tumeur p53 méthylé par PRMT5 sur 3 résidus, l'Arg333 étant monométhylée et les Arg335 et Arg337 qui sont diméthylées (Jansson et al., 2008). En effet, en cas de dommage de l'ADN, la faible expression de PRMT5 limite la capacité de p53 à se lier aux promoteurs de ses gènes cibles (exemple *p21*), réduisant ainsi leur expression et empêchant l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN : des mécanismes d'apoptose cellulaire sont alors déclenchés. Cette observation a été confirmée par Scoumanne et al. qui ont démontré que PRMT5 est indispensable pour l'expression et la stabilité de p53 dans des conditions de stress cellulaire, ainsi que pour son activité transcriptionnelle au niveau de ses cibles géniques (Scoumanne et al., 2009): le knockdown de PRMT5 induit une diminution de la prolifération cellulaire ainsi qu'une diminution du niveau protéique de p53 tout en maintenant un taux stable des ARNm correspondant.

PRMT5 intervient aussi dans la régulation de certains gènes au niveau post-transcriptionnel. Ce mécanisme nécessite la présence d'un site IRES (Internal Ribosomal Entry Site) en 5'-UTR

de l'ARNm : il s'agit de structures secondaires qui recrutent les ribosomes et initient la traduction indépendante du cap m^7GpppG en recrutant un nombre restreint de facteurs, y inclus la protéine hnRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) (Gao et al., 2017). En effet, PRMT5 diméthyle symétriquement hnRNPA1 sur deux résidus Arg218 et Arg225. Cette modification facilite l'interaction entre hnRNPA1 et les sites IRES cibles, lui permettant alors d'initier la traduction IRES-dépendante.

PRMT5 joue également un rôle dans la biogenèse des ribosomes : elle méthyle la protéine ribosomale RPS10 qui fait partie de la sous-unité 40S des ribosomes (Ren et al., 2010). Cette méthylation s'effectue à l'extrémité C-terminale de RPS10 sur les résidus Arg158 et Arg160. Elle confère une meilleure stabilité à la protéine face à la dégradation protéasomale et elle est indispensable pour une prolifération cellulaire normale ainsi que pour un assemblage correct des ribosomes, tout en respectant le ratio des sous-unités 40 S:60 S.

Au niveau développemental, PRMT5 est essentielle pour le développement précoce des embryons murins et elle intervient dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (Tee et al., 2010). Elle coopère avec la voie de signalisation de Stat3 dans le cytoplasme et met en jeu MEP50 pour médier la méthylation des histones H2A, réprimant ainsi l'expression de plusieurs gènes de différenciation cellulaire. La perte de PRMT5 chez les souris entraîne une diminution de l'expression des facteurs de la pluripotence (comme Oct4 et Nanog) et provoque une létalité embryonnaire avant l'implantation. Cependant, dans les cellules souches embryonnaires humaines, PRMT5 semble être impliquée, non dans la pluripotence, mais plutôt dans la prolifération des cellules souches en régulant la fraction cellulaire en phase G1 du cycle cellulaire (Gkountela et al., 2014). Elle génère toujours des histones H2A symétriquement diméthylées dans le cytoplasme mais, contrairement au phénomène observé dans les cellules souches murines, le niveau global de ces histones dans le noyau reste inaltéré.

De plus, PRMT5 est indispensable pour la survie des cellules germinales dans les deux gonades, masculines et féminines, lors du développement fœtal (Wang et al., 2015). L'inhibition de son expression affecte deux mécanismes majeurs ayant lieu dans les cellules germinales après la détermination du sexe de l'embryon : d'une part, elle enlève le blocage du cycle cellulaire devant avoir lieu en phase G0/G1 entrainant alors une prolifération aberrante et d'autre part, elle inhibe l'expression des gènes impliqués dans l'initiation de la division méiotique que subissent

les cellules germinales aboutissant ainsi à la mort cellulaire. A noter que, contrairement aux cellules souches embryonnaires, l'absence de PRMT5 dans les cellules germinales n'affecte pas l'expression des gènes codant pour les facteurs de pluripotence (Wang et al., 2015).

Liu et al. ont généré un modèle murin de knockout conditionnel du gène codant pour PRMT5, leur permettant d'étudier la fonction de cette protéine dans les cellules souches hématopoïétiques (Liu et al., 2015). Ce modèle a prouvé un rôle crucial de PRMT5 dans l'hématopoïèse des souris adultes. En effet, la perte de PRMT5 est traduite par une aplasie de la moelle osseuse, une pancytopénie létale reflétée par une grande réduction du nombre des cellules et des plaquettes du sang et par l'apparition d'anémie suivie de la mort des souris un à deux jours après. De plus, la perte de PRMT5 semble affecter la différenciation des cellules souches en progéniteurs hématopoïétiques et l'expansion de ces dernières: une diminution précoce et significative des progéniteurs est relevée chez les souris n'exprimant pas PRMT5 par rapport aux souris contrôles. Au niveau cellulaire, PRMT5 est détectée dans le cytoplasme des progéniteurs mais subit un « shuttling » entre le noyau et le cytoplasme des cellules souches. Ceci suggère que PRMT5 réside principalement dans le noyau des cellules souches maintenant ainsi leur pluripotence et que sa translocation dans le cytoplasme pourrait permettre la différenciation des cellules souches en progéniteurs.

Au niveau métabolique, PRMT5 potentialise la néoglucogenèse hépatique en réponse au jeûne, en régulant le niveau de la méthylation de l'histone H3 sur les gènes impliqués dans ce processus (Blanc and Richard, 2017). Comme l'absence de PRMT5 diminue la production de glucose hépatique, alors l'inhibition de cette méthyltransférase chez les patients diabétiques pourrait être utile pour abaisser la glycémie.

2.6. Implication dans les cancers

Dans le contexte de son rôle majeur de répresseur transcriptionnel et des interactions protéiques qu'elle établit, PRMT5 présente des propriétés oncogéniques en raison de sa capacité de réprimer l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs et d'interférer avec des protéines dérégulées dans le cancer. Son invalidation dans les cellules transformées ou cancéreuses est associée à un ralentissement de la croissance cellulaire et à une altération du phénotype des cellules, tandis que sa surexpression induit une prolifération accrue (Yang and

Bedford, 2013). PRMT5 et son cofacteur MEP50 sont surexprimés dans plusieurs types de cancer notamment dans le cancer de l'ovaire, des poumons, du sein, du colon, des cellules germinales ainsi que dans les mélanomes, les glioblastomes et les lymphomes (Kanda et al., 2016; Yang et al., 2015) ; ils se trouvent ainsi corrélés à une augmentation de la croissance tumorale, un mauvais pronostic et une diminution de la survie globale des patients. Cette surexpression est largement impliquée dans la tumorigénicité des deux protéines (Bedford and Clarke, 2009; Stopa et al., 2015) : elle entraîne la formation des colonies, stimule la croissance indépendamment de l'ancrage et induit la formation des tumeurs chez les souris nude. Cependant, les effets observés sur le comportement des cellules dépendent de leur type. A titre d'exemple, le knockdown de PRMT5 réduit la prolifération et la formation de colonies dans certaines lignées de mélanome alors qu'il les accroit dans d'autres lignées de ce même cancer (Stopa et al., 2015).

PRMT5 est impliquée non seulement dans la prolifération des cellules cancéreuses mais aussi dans leur capacité à métastaser. En effet, Hou et al. ont montré que PRMT5 se lie spécifiquement au promoteur proximal du gène codant pour la E-cadhérine et réprime son expression en marquant les histones par la méthylation H4R3 (Hou et al., 2008). De plus, dans des lignées de carcinome embryonnaire, ils ont identifié PRMT5 parmi les protéines interagissant avec SNAIL impliquée dans l'inhibition de l'expression du gène *E-cadhérine*. Cette interaction détectée renforce la méthylation effectuée par PRMT5 au niveau du promoteur du gène en question et par la suite sa conséquence sur l'expression de la protéine correspondante. Ceci augmente la capacité des cellules cancéreuses à migrer et à envahir des tissus avoisinants, favorisant ainsi la progression tumorale.

2.6.1. Cancer du poumon

Une étude récente sur des lignées du cancer du poumon a montré que PRMT5 et MEP50 sont indispensables d'une part pour maintenir l'expression de certains marqueurs de métastases et de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et d'autre part pour médier la réponse epigénétique au TGFβ qui promeut l'EMT et l'invasion (Chen et al., 2017). Les analyses transcriptomiques effectuées dans cette étude ont montré que le knockdown de PRMT5 et de MEP50 dans les lignées testées induit une surexpression des gènes impliqués dans l'organisation de la matrice extracellulaire et dans l'adhésion cellulaire, alors qu'il déclenche une répression de l'expression des gènes oncogéniques normalement surexprimés dans le cancer étudié. Ceci

témoigne de l'importance de PRMT5 et de MEP50 dans le maintien de l'identité des cellules cancéreuses. Le knockdown de PRMT5 abolit la réponse des cellules au TGFβ par rapport aux cellules contrôles traitées et aboutit ainsi *in vitro* à une perte significative de la capacité des lignées cancéreuses à former des colonies sur du soft-agar et à migrer. Les mêmes effets sont observés lors de l'utilisation de l'inhibiteur de PRMT5, le GSK591. Au niveau génétique, Chen et al. ont découvert que le complexe PRMT5-MEP50 est le médiateur direct des réponses transcriptionnelles induites par la signalisation de TGFβ qui génère plus de méthylations d'histones de types H3R2me2s (normalement corrélé à une activation génique) et H4R3me2s (corrélé à la répression génique) afin de promouvoir l'EMT et de réprimer les gènes suppresseurs de métastases.

2.6.2. Cancer gastrique

La surexpression de PRMT5 confère à cette protéine le rôle d'un oncogène et potentialise le phénotype malin des lignées cancéreuses gastriques (Kanda et al., 2016). Son knockdown réduit significativement la prolifération des cellules cancéreuses ainsi que leur capacité d'invasion et de migration. Kanda et al. ont montré que PRMT5 participe dans les voies de signalisation de l'EMT par son expression coordonnée avec d'autres molécules inductrices d'EMT dans les cellules du cancer gastrique. Les auteurs ont aussi évalué l'expression de PRMT5 et ses implications cliniques dans des tissus cancéreux gastriques issus des patients opérés. Ils ont trouvé d'une part que PRMT5 est surexprimée par rapport aux tissus normaux adjacents et d'autre part que les patients présentant des niveaux élevés d'ARNm de *PRMT5* sont plus susceptibles à survivre pour de courtes durées, comparés aux autres patients, et à développer des métastases péritonéales. Ceci permet de considérer PRMT5 comme un biomarqueur prometteur dans le cancer gastrique afin d'identifier les patients à risque notamment pour les métastases.

2.6.3. Cancer ovarien

Bao et al. se sont intéressés au profil d'expression de PRMT5 dans le cancer ovarien, ainsi qu'à ses corrélations avec les facteurs clinicopathologiques et son rôle dans la régulation de la prolifération, la croissance et l'apoptose des cellules cancéreuses ovariennes (Bao et al., 2013). Dans la cohorte investie, PRMT5 est localisée dans le cytoplasme et le noyau des cellules, avec une prédominance pour la localisation nucléaire. Elle est plus exprimée dans les cancers ovariens par rapport aux tissus contrôles. Cette expression est associée à une faible différenciation

cellulaire, à plus d'invasion ganglionnaire, à la présence de récidives et à la forte expression du marqueur de prolifération cellulaire Ki67 dans les cancers étudiés. De plus, la surexpression de PRMT5 constitue un facteur de mauvais pronostic lié à une faible survie globale des patientes ainsi qu'à une survie sans progression tumorale plus courte. Quant au rôle de PRMT5 dans les lignées cancéreuses ovariennes, son knockdown induit une diminution de la viabilité des cellules et une inhibition de leur prolifération accompagnée d'une augmentation de l'apoptose, témoignant de l'importance de PRMT5 dans la prolifération cancéreuse et de ses propriétés oncogéniques (Bao et al., 2013). Cet effet peut être dû à l'activité méthyltransférase de PRMT5 lui permettant de réguler l'expression d'E2F-1, membre crucial pour la programmation de l'apoptose cellulaire, dans les cellules cancéreuses ovariennes modulant ainsi leur prolifération et leur apoptose. En effet, la diminution de l'expression de PRMT5 entraine une augmentation de l'expression protéique d'E2F-1 responsable alors d'une part de l'inhibition de la prolifération cellulaire et d'autre part de l'induction de l'apoptose.

2.6.4. Cancer de la prostate

Gu et al. ont rapporté deux modes d'action opposés de PRMT5 dans le cytoplasme et le noyau des cellules du cancer de la prostate (Gu et al., 2012). Les auteurs ont trouvé que PRMT5, ayant trois signaux d'exportation nucléaire, occupe une localisation cytoplasmique prédominante dans les cellules du cancer de la prostate. La formation du complexe cytoplasmique entre PRMT5 et MEP50 témoigne de la nécessité de ces deux protéines pour la croissance des cellules cancéreuses de la prostate. De plus, Gu et al. ont montré que la présence de PRMT5 dans le noyau inhibe la croissance des cellules cancéreuses prostatiques. Conformément à ces observations, les analyses immunohistochimiques effectuées ont révélé une localisation nucléaire de PRMT5 au niveau de l'épithélium prostatique sain alors que dans les tissus cancéreux de la prostate, PRMT5 occupe une localisation cytoplasmique. Ceci suggère que la fonction de PRMT5 est régulée par sa localisation cellulaire et que ce transport nucléo-cytoplasmique peut jouer un rôle important dans la tumorigenèse de la prostate.

Dans le contexte du cancer de la prostate, Deng et al. ont mis en évidence l'implication de PRMT5 dans le développement cancéreux *via* l'activation epigénétique du récepteur aux androgènes AR qui constitue le facteur le plus important dans la stimulation du développement et la progression de ce cancer (Deng et al., 2016). Dans leur étude, Deng et al. ont investi la localisation de PRMT5 dans les tissus du cancer prostatique et une corrélation positive est

détectée entre la fraction nucléaire de PRMT5 et l'expression de *AR*. Ils ont démontré l'interaction de PRMT5 avec BRG1 et avec Sp1, facteur de transcription bien caractérisé comme régulant positivement la transcription de gène codant pour AR dans les cellules cancéreuses prostatiques. Il en résulte alors la liaison du complexe formé au promoteur proximal du gène *AR* et la diméthylation symétrique de H4R3 activant ainsi la transcription du gène (**Figure 10**). Le knockdown de la méthyltransférase inhibe l'expression du gène *AR* et réprime la croissance des xénogreffes du cancer prostatique chez les souris.

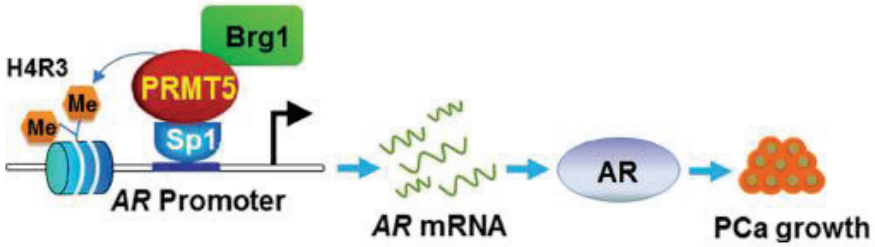


Figure 10: Activation epigénétique de la transcription du gène *AR* par PRMT5 (Deng et al., 2016).
AR: Androgen Receptor; Brg1: Brahma-like 1; Sp1: Specificity protein 1; mRNA: messenger RNA; PCa: Prostate Cancer.

2.6.5. Cancer du sein

PRMT5 est surexprimée dans divers types de cancers y inclus le cancer du sein. De nombreuses études ont investi son rôle dans les cellules tumorales mammaires, parmi lesquelles figure celle effectuée par Powers et al. qui a permis d'identifier PRMT5 comme un cofacteur de la protéine PDCD4 (Programmed Cell Death 4) responsable d'une altération radicale de sa fonction (Powers et al., 2011). PDCD4 joue le rôle d'un gène suppresseur de tumeur et constitue un biomarqueur corrélé à un meilleur pronostic des patients souffrant de cancer des poumons, du colon et ovarien. Son expression est faiblement détectée dans les carcinomes mammaires invasifs comparés aux tissus sains ce qui reflète la perte de son expression lors de la progression tumorale. Powers et al. ont analysé l'expression de PDCD4 dans une cohorte de 295 tumeurs mammaires et ont trouvé une corrélation significative entre sa forte expression et une meilleure survie des patientes. Cependant, une certaine fraction des tumeurs ne bénéficie pas du bon pronostic de PDCD4 malgré sa surexpression, reflétant alors la présence potentielle d'une protéine qui, en interagissant avec PDCD4, l'inactive ou change son rôle de suppresseur de tumeurs : il s'agit de PRMT5 identifiée par spectrométrie de masse dans ces tumeurs. En effet, la

surexpression simultanée de PRMT5 et de PDCD4 dans les cellules cancéreuses mammaires injectées chez des souris nude stimule la prolifération des tumeurs par rapport aux cellules contrôles et aux cellules exprimant PRMT5 ou PDCD4 seules. L'interaction entre ces deux protéines permet à PRMT5 de méthyler PDCD4 sur le résidu Arg110 en N-terminal et cette modification, mettant en jeu l'activité méthyltransférase de PRMT5, semble être nécessaire pour l'effet observé sur la croissance tumorale mammaire en présence de ces deux partenaires. Les analyses cliniques réalisées par Powers et al. sur d'autres cohortes ont confirmé ces observations: des niveaux élevés de PDCD4 dans les tumeurs confèrent un effet protecteur aux patientes avec une meilleure survie globale ; la présence d'une surexpression simultanée de PRMT5 induit la méthylation de PDCD4, rend ce facteur-là un facteur de mauvais pronostic et l'associe à une plus faible survie.

Yang et al. ont rapporté que la forte expression de PRMT5 constitue un facteur de mauvais pronostic pour les patients du cancer du sein et qu'elle est positivement corrélée à une surexpression de TRAF4 (TNF receptor-associated factor 4) (Yang et al., 2015). Les deux protéines se colocalisent, en prédominance dans le cytoplasme des lignées cancéreuses mammaires, mais aussi elles sont trouvées dans leur noyau. Les auteurs ont validé l'interaction entre PRMT5 et TRAF4 et ont mis en évidence l'importance de la structure de doigt de Zinc de TRAF4 dans cette interaction. Ceci confère à TRAF4 la capacité de réguler l'expression de PRMT5 au niveau nucléaire uniquement en induisant son augmentation, ce qui lui permet de promouvoir la survie et la prolifération cellulaire dans le cancer du sein.

Wu et al. ont étudié l'expression de PRMT5 dans une cohorte de tissus mammaires sains et cancéreux et ils ont établi des corrélations avec la survie des patientes (Wu et al., 2017). L'analyse des résultats a montré une expression de PRMT5 plus élevée dans les tumeurs que dans les tissus sains, associée à un mauvais pronostic et une survie sans rechute plus courte chez les patientes par rapport au groupe contrôle. Cette corrélation est aussi détectée au niveau des sous-groupes du cancer du sein, plus précisément dans les tumeurs HER2 positives et dans les tumeurs triples négatives. De plus, la forte expression de PRMT5 est significativement corrélée à un Ki67 plus élevé dans les tumeurs ainsi qu'à plus de métastase tumorale. Afin de mieux comprendre l'implication de PRMT5 dans le cancer du sein, Wu et al. ont contrôlé l'expression de PRMT5 dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 et ils ont investi la conséquence qui en résulte sur la prolifération et la progression du cycle cellulaire. Les tests effectués leur ont

permis de constater que PRMT5 stimule la prolifération cellulaire en sa présence et que son knockdown non seulement bloque la progression du cycle cellulaire mais aussi induit l'apoptose des cellules mammaires: le knockdown réduit la fraction des cellules en phase S, augmente celle en phase G1 tout en activant en parallèle l'expression de la caspase-3 et de PARP, protéines clés dans la voie apoptotique intrinsèque.

L'implication de l'axe TGFβ- PRMT5-MEP50 dans l'EMT est mise en évidence dans les lignées cancéreuses mammaires tout comme dans les lignées pulmonaires déjà décrites (Chen et al., 2017). En effet, dans le cancer du sein aussi, PRMT5 et MEP50 sont indispensables pour le maintien de l'expression de certains marqueurs métastatiques et de l'EMT ainsi que pour la réponse au TGFβ: le knockdown de ces deux protéines induit une surexpression des gènes impliqués dans l'organisation de la matrice extracellulaire et dans l'adhésion cellulaire, en réprimant l'expression des gènes oncogéniques activés dans le cancer du sein. Le knockdown de PRMT5 aboutit aussi à une perte significative de la capacité des lignées tumorales mammaires à former des colonies sur de l'agar mou et à migrer. Au niveau de la régulation transcriptionnelle des gènes, le complexe PRMT5-MEP50 médie directement les réponses induites par la signalisation de TGFβ: il stimule l'EMT en générant des méthylations activatrices de type H3R2me2s et réprime les gènes suppresseurs de la métastase en diméthylant symétriquement les histones H4R3 des gènes correspondant.

2.7. Inhibiteurs de PRMT5

La méthylation des protéines histones et non histones est un processus dynamique qui joue un rôle clé dans la régulation de la transcription et de l'expression des gènes. Elle est impliquée dans divers cancers et maladies et constitue une potentielle cible thérapeutique d'où l'intérêt confié à la découverte des inhibiteurs puissants et sélectifs pour chaque membre de la famille des PRMTs. Plusieurs molécules sont développées, dont certaines inhibent sélectivement l'activité de PRMT5 et parmi lesquelles on se contentera d'en exposer quelques-unes.

Chan-penebre et al. ont rapporté la découverte et la caractérisation du premier inhibiteur sélectif de PRMT5 administré par voie orale et présentant des effets antiprolifératifs, notamment dans les modèles *in vitro* et *in vivo* de lymphome non hodgkinien touchant les lymphocytes B (Chan-Penebre et al., 2015). Il fut appelé EPZ015666 et entre en inhibition non compétitive avec SAM pour inhiber l'activité de PRMT5. Le traitement des lignées cancéreuses avec des doses

d'EPZ015666 à l'échelle du nanomolaire inhibait la méthylation de SmD3 par PRMT5 *in cellulo* et induisait la mort cellulaire. En outre, la dose orale d'EPZ015666 administrée démontrait une activité anti-tumorale dose-dépendante dans de multiples modèles de xénogreffes de lymphomes, accompagnée d'une réduction significative du profil de diméthylation symétrique, confirmant ainsi que les effets antiprolifératifs relevés constituent une conséquence directe de l'inhibition de PRMT5 (Chan-Penebre et al., 2015; Duncan et al., 2015; Hu et al., 2016). Un analogue d'EPZ015666 a ensuite été généré en conservant toujours la sélectivité pour PRMT5 vis-à-vis des autres transférases ainsi que les caractéristiques du composé d'origine (Duncan et al., 2015). Il fut appelé EPZ015866 puis commercialisé sous le nom de GSK591. Les tests biochimiques ont montré qu'il inhibe potentiellement *in vitro* la capacité du complexe PRMT5-MEP50 à méthyler l'histone H4 et *in cellulo* à générer des résidus arginine symétriquement méthylés au niveau de SmD3.

En 2016, un autre inhibiteur puissant de PRMT5 appelé GSK3326595 a entamé les essais cliniques de phase I après avoir inhibé la croissance tumorale dans des modèles cellulaires et animaux (Kaniskan and Jin, 2017). De plus, un inhibiteur chimique sélectif pour PRMT5 fut récemment découvert et nommé LLY-283 (Kaniskan and Jin, 2017). Cette molécule entre en compétition avec le SAM, donneur du groupement méthyle, et empêche potentiellement l'activité catalytique de PRMT5. Elle est 100 fois plus sélective pour PRMT5 par rapport aux autres méthyltransférases et montre une activité anti-proliférative dans les essais cellulaires.

III. *LKB1*, gène suppresseur de tumeur

LKB1 est une sérine/thréonine kinase hautement conservée, mutée chez les patients atteints du syndrome de Peutz-Jeghers (PJS). Il s'agit d'un syndrome héréditaire autosomal dominant caractérisé d'une part par des pigmentations muco-cutanées notamment sur les lèvres, les bouts des doigts et la muqueuse buccale, et d'autre part par l'apparition de multiples polypes gastro-intestinaux (harmatomes) accompagnés d'un risque accru de développer divers types de cancers, y inclus le cancer du sein (32 à 54%) (Korsse et al., 2013; Smith et al., 1999).

1. Généralités

1.1. Structure, expression et localisation cellulaire

LKB1, nommée aussi STK11, est codée par le gène *lkb1* identifié en 1996 (Mehenni et al., 1998). Ce gène est situé sur le bras long du chromosome 19 (locus 19q13.3). Il est de 23kb, composé de 10 exons dont 9 sont codants (Alessi et al., 2006); il code pour un ARNm de 2.4 kpb (Gan et Li, 2014; Zhao et Xu, 2014). La protéine résultante est constituée de 433aa chez l'homme (436 chez la souris) d'environ 50kDa. Elle possède un signal de localisation nucléaire (NLS), ainsi qu'un domaine kinase lui permettant de phosphoryler des kinases en aval telles les AMPK.

La présence du NLS explique la localisation nucléaire de la protéine, pourtant la localisation cytoplasmique est également rapportée (Korsse et al., 2013; Sanchez-Cespedes, 2007; Smith et al., 1999). En effet, l'activité catalytique de LKB1 nécessite que cette kinase soit cytoplasmique ; son exportation du noyau est assurée par son interaction avec deux partenaires, STRADα et MO25, ce qui induit une augmentation de l'activité de LKB1 envers ses substrats (Baas et al., 2003; Boudeau et al., 2003; Dorfman et Macara, 2008). LKB1 est totalement active lorsqu'elle est complexée à STRADα et MO25 (1:1:1).

LKB1 est une protéine ubiquitaire dans les tissus fœtaux et adultes. Au cours du processus de développement, plusieurs organes ont montré une expression prédominante de LKB1 comme le cœur, les poumons, le pancréas, les reins et le tractus gastro-intestinal. Cependant, chez les adultes, les niveaux d'expression protéique les plus élevés sont détectés principalement dans les tissus épithéliaux ainsi que dans les tubes séminifères des testicules (Herrmann et al., 2011; Rowan et al., 2000).

1.2. Partenaires

L'activité et la localisation de LKB1 dépendent de son interaction avec divers partenaires décrits ci-dessous :

- STRADα :

La protéine STRAD possède deux isoformes, STRADα et STRADβ, d'environ 50kDa. Les deux protéines sont qualifiées de «pseudokinases» étant donné qu'elles sont dépourvues de certains acides aminés essentiels pour leur activité catalytique intrinsèque, ce qui les rend incapables de phosphoryler des protéines (Baas et al., 2003; Boudeau et al., 2004; Hawley et al., 2003). Cependant, elles peuvent toujours induire un changement allostérique dans la structure de LKB1, activant ainsi sa capacité de phosphorylation (Zeqiraj et al., 2009).

- MO25 :

La protéine MO25 est exprimée aussi sous forme de deux isoformes: MO25α et MO25β (Hawley et al., 2003). Elle intervient comme un troisième partenaire dans le complexe LKB1/STRAD/MO25 pour le stabiliser. En effet, MO25 possède une poche hydrophobe à son extrémité C-terminale lui permettant de se lier à l'extrémité C-terminale de STRAD renfermant le motif conservé W-E-F (Trp-Glu-Phe) ; ceci améliore notablement la liaison de STRAD à LKB1 et stimule davantage l'activité kinase de LKB1 (Gan and Li, 2014; Zeqiraj et al., 2009).

- LKB1- interacting protein LIP1 :

La protéine LIP1 est de 1099aa et d'environ 121kDa. Son expression est ubiquitaire et sa séquence N-terminale renferme 6 motifs consensus LRR riches en leucine et impliqués dans les interactions protéine – protéine (Smith et al., 2001). Smith et al. ont montré que, parmi les sérine/thréonine kinases, LIP1 interagit spécifiquement avec LKB1 dans les cellules des mammifères indépendamment de son activité de kinase. L'interaction entre les deux protéines met en jeu essentiellement la région étalée entre le résidu 278 et l'extrémité C-terminale de LIP1 bien qu'elle soit aussi détectée, mais à plus faible affinité, avec les motifs LRR. L'expression ectopique de LIP1 augmente significativement la fraction cytoplasmique de LKB1. LIP1 intervient comme intermédiaire liant le complexe LKB1/STRAD/MO25 à la protéine SMAD4, impliquée dans la signalisation du TGFβ. Ainsi, LKB1 actif est capable de phosphoryler SMAD4 sur le résidu Thr77, ce qui l'empêche alors de se fixer à l'ADN et d'activer la transcription des gènes cibles de TGFβ, notamment ceux impliqués dans l'EMT (Morén et al., 2011).

- Hsp90/CDC37 :

Hsp90 est une protéine dimérique, ubiquitaire et bien conservée. Elle facilite la réparation et le repliement approprié des protéines ayant subi un stress cellulaire comme le changement de pH, les variations de température et l'hypoxie, ce qui pourrait modifier leur structure et donc leur fonction (Sauvage et al., 2017). Son mode d'action nécessite son association avec des protéines co-chaperonnes telles CDC37 qui contribue à prolonger l'association des dimères de Hsp90 avec les protéines à réparer augmentant ainsi l'efficacité de Hsp90. Nony et al. ont démontré que le complexe Hsp90/CDC37 interagit avec LKB1 et le stabilise dans le cytoplasme (Nony et al., 2003). En effet, les auteurs ont montré que l'altération de la formation du complexe Hsp90/CDC37/LKB1 oriente LKB1 vers l'ubiquitination et la dégradation protéasomale.

1.3. Rôles physiologiques

LKB1 est un régulateur de nombreuses voies de signalisation cellulaires par activation d'environ 14 kinases appartenant à la même famille qu'AMPK (AMP-activated protein kinase) et impliquées dans la régulation des réponses cellulaires essentiellement face au stress énergétique (Hezel et Bardeesy, 2008). AMPK, la plus étudiée, est constituée d'une sous-unité catalytique α et deux sous-unités régulatrices β et γ ; elle est activée suite à toute augmentation du rapport AMP/ATP intracellulaire témoignant d'un manque énergétique (Forcet et al., 2005). En effet, AMP se fixe au niveau de la sous-unité γ et induit un changement conformationnel dans la structure de l'AMPK permettant alors à LKB1 de la phosphoryler sur le résidu Thr172 localisé dans son domaine kinase au niveau de la sous-unité α. Une fois activée, AMPK inhibe les voies anaboliques, notamment celles de la synthèse protéique consommant de l'ATP, tout en stimulant en parallèle les voies cataboliques produisant de l'énergie afin de maintenir l'homéostasie énergétique (Hawley et al., 2003; Shaw et al., 2004). Ceci entraîne ainsi l'inactivation de mTORC1, une protéine cruciale impliquée dans l'initiation de la synthèse protéique, la prolifération cellulaire et les mécanismes de survie, mettant en évidence le rôle de LKB1 comme suppresseur de tumeur (Dong et al., 2013; Gan et Li, 2014; Shackelford et Shaw, 2009; Shaw et al., 2004). Cependant, la perte de LKB1 induit une augmentation de la voie de signalisation de mTORC1, se manifestant par une phosphorylation accrue du régulateur traductionnel S6K1 et du facteur d'initiation de la traduction 4E-BP1, deux effecteurs majeurs de mTORC1.

Dans des cellules épithéliales non polarisées, l'activation de LKB1 déclenche la repolarisation cellulaire, ce qui confirme son rôle crucial dans la régulation de la polarité cellulaire et le remodelage du cytosquelette (Alessi et al., 2006; Baas et al., 2004; Momcilovic et Shackelford, 2015; Shackelford and Shaw, 2009). LKB1 est également impliquée dans la régulation des mécanismes de réparation des lésions de l'ADN (Zhou et al., 2014). Ceci se traduit par une accumulation des dommages d'ADN dans les cellules dépourvues de LKB1 par rapport aux cellules normales. L'expression induite de LKB1 dans des cellules de mélanome G361 aboutit à une inhibition de la croissance cellulaire, reflétant son implication dans l'arrêt de la croissance cellulaire (Sapkota et al., 2001). LKB1 intervient dans d'autres voies de signalisation comme celle de TGFβ par interaction avec la protéine LIP1 (**cf.** section 1.2).

2. Régulations post-traductionnelles

La protéine LKB1 est soumise à plusieurs modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, l'acétylation et la prénylation, qui régulent son activité catalytique ainsi que sa localisation cellulaire (**Figure 11**, **Tableau 3**) (Lattouf et al., 2016).

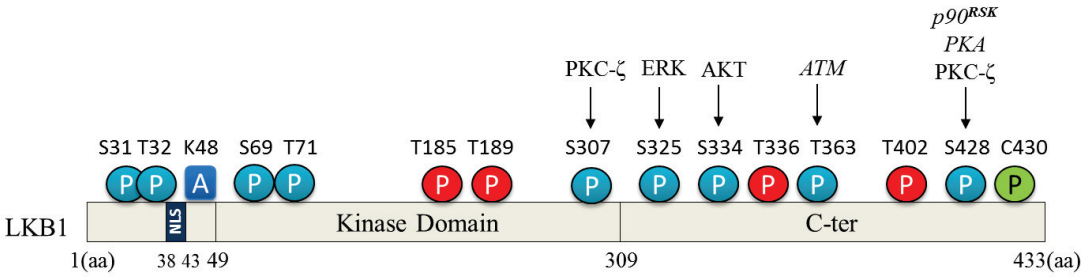


Figure 11: Modifications post-traductionnelles de LKB1 (Lattouf et al., 2016).
Les cercles en rouge représentent les sites d'autophosphorylation de LKB1. Les cercles en bleu correspondent aux sites de phosphorylation de LKB1 par d'autres kinases et le cercle en vert représente le site de prénylation. Quant au carré bleu, il désigne le site d'acétylation/déacétylation de LKB1.

Tableau 3. Modifications post-traductionnelles de LKB1 (Lattouf et al., 2016).
Les enzymes en italique sont rapportées comme modifiant les résidus de LKB1 murine.

PTM	Amino Acid	Enzyme	Effect
Phosphorylation	Ser31	Not Identified	No effect reported on LKB1 activity or cellular localization
	Thr32 Ser69 Thr71	Not Identified	No effect reported on LKB1 activity or cellular localization
	Thr185 Thr189	LKB1	No effect reported on LKB1 activity or cellular localization
	Ser307	PKC-ζ	Increase in LKB1 cytoplasmic localization AMPK activation Inhibition of Angiogenesis and Apoptosis
	Ser325	ERK	Inhibition of AMPK activation Increase in cell proliferation Increase in anchorage-independent growth
	Ser334	Akt	Increase in 14-3-3 binding to LKB1 Increase in LKB1 nuclear retention Inhibition of LKB1 tumor suppressor activity
	Thr336	LKB1	Increase in 14-3-3 binding to LKB1 Inhibition of LKB1 kinase activity
	Thr363	*ATM & DNA-PK* LKB1	Implication in cell growth suppression
	Thr402	LKB1	Increase in LKB1 kinase activity
	Ser428	*P90RSK & PKA*	Inhibition of Cell Growth Regulation of LKB1 asymmetric localization Initiation of myelination in Schwann Cells
		PKC-ζ	Increase in LKB1 activity
Acetylation	Lys48	Not Identified	Decrease in LKB1 interaction with STRADα Decrease in LKB1 activity
Deacetylation		SIRT1	Enhancement of LKB1 proteasome-mediated degradation
Acetylation	Lys64	Not Identified	Triggering LKB1 proteasome-mediated degradation
Prenylation	Cys430	*Prenyltransferase*	Targeting LKB1 to the plasmic membrane

2.1.Phosphorylation

LKB1 est capable de s'autophosphoryler sur des résidus Sérine (Ser) et Thréonine (Thr) mais elle est également phosphorylée par d'autres kinases, régulant à la fois sa localisation et /ou son activité enzymatique.

- Ser307 :

Le résidu Ser307 est phosphorylé par PKC-ζ, induisant ainsi le transport nucléo-cytoplasmique de LKB1, l'activation d'AMPK, la suppression de l'angiogenèse et la régulation de la progression du cycle cellulaire et de la prolifération des cellules (Xie et al., 2009).

- Ser325 :

Sapkota et al. ont montré que LKBl est phosphorylée sur le résidu Ser325, indépendamment de son activité catalytique (Sapkota et al., 2002a). Zheng et al. ont trouvé que ce résidu est phosphorylé par ERK dans les cellules transformées par des mutations de l'oncogène B-RAF et que cette modification empêche LKB1 de se lier à AMPK et de l'activer (Zheng et al., 2009).

- Ser334 :

La Ser334 est phosphorylée par la kinase Akt, induisant ainsi l'interaction de LKB1 avec la protéine 14-3-3 dans le noyau et sa rétention nucléaire. Cette phosphorylation empêche la formation du complexe LKB1/STRADα et abolit par la suite le rôle de LKB1 de suppresseur de tumeur *in vitro* et *in vivo* (Liu et al., 2012).

- Thr336 :

Lors de son activation par STRADα, LKB1 est autophosphorylée sur le résidu Thr336 (Sapkota et al., 2002a). Bai et al. ont démontré que la Thr336 phosphorylée est reconnue par la protéine 14-3-3 favorisant sa liaison à LKB1 (Bai et al., 2012).

- Thr363 :

Sapkota et al. ont rapporté que LKB1 murine est phosphorylée sur la Thr366 (équivalente à Thr363 de LKB1 humaine) (Sapkota et al., 2002a). L'exposition des cellules aux rayons ionisants active d'une part l'enzyme ATM responsable de la phosphorylation de la Thr363 *in vitro* et *in vivo* et d'autre part la protéine kinase DNA-PK intervenant *in vitro* (Sapkota et al., 2002b). Dans un autre contexte, Baas et al. ont démontré que Thr363 est également un site d'autophosphorylation (Baas et al., 2003).

- Ser428 :

LKB1 murine est phosphorylée sur le résidu Ser431 (correspondant à Ser428 de LKB1 humaine) par la « p90 ribosomal S6 kinase » ($P90^{RSK}$) et la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Sapkota et al., 2001). Cette modification médie la capacité de LKB1 d'inhiber la croissance cellulaire. Shen et al. ont démontré que la phosphorylation de la Ser428 par PKA régule la localisation asymétrique de LKB1 dans les cellules de Schwann et l'initiation de la myélinisation *in vitro* (Shen et al., 2014). De plus, Xie et al. ont montré que PKC-ζ est capable de phosphoryler LKB1 sur Ser428 permettant alors son exportation du noyau et une meilleure activation de sa cible AMPK (Xie et al., 2008; Zheng et al., 2009).

2.2. Acétylation/Déacétylation

L'acétylation de LKB1 est moins étudiée que sa phosphorylation. Par spectrométrie de masse, Lan et al. ont montré que LKB1 est acétylée sur au moins neuf résidus lysine repartis tout le long de sa structure ; cependant, la plupart des études se sont concentrées sur la Lys48 localisée dans la partie N-terminale de LKB1 interagissant avec SIRT1, une déacétylase NAD^+-dépendante (Lan et al., 2008). L'acétylase impliquée dans cette modification reste inconnue, bien que la déacétylation de la Lys48 soit bien connue d'être catalysée par SIRT1. Les auteurs ont rapporté que l'acétylation empêche STRADα d'interagir avec LKB1 et provoque par la suite une accumulation nucléaire accrue de LKB1, inhibant ainsi son activité kinase. En revanche, la déacétylation de LKB1 double son activité en augmentant sa capacité de se lier à STRADα et à se transloquer dans le cytoplasme.

Conformément à ces résultats, Zu et al. ont révélé que les niveaux de LKB1 et SIRT1 sont inversement corrélés au cours de la sénescence des cellules endothéliales, avec une augmentation du taux de LKB1 et une diminution de celui de SIRT1 (Zu et al., 2010). Ils ont aussi montré que la déacétylation de LKB1 réduit la sénescence cellulaire en diminuant l'activation de l'AMPK et favorise en parallèle l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de LKB1. Récemment, Bai et al. ont démontré que l'acétylation du résidu Lys64 de LKB1 déclenche la formation d'un complexe protéique avec SIRT1 orientant LKB1 à la dégradation protéasomale (Bai et al., 2016).

2.3. Prénylation

LKB1 renferme dans son domaine C-terminal un motif CAAX habituellement requis pour la prénylation des protéines. Cette modification cible plus précisément la cystéine en position 430. Deux études ont démontré que la substitution de Cys430 par un résidu sérine réduit le taux de LKB1 associée à la membrane plasmique, confirmant ainsi le rôle de la prénylation dans le ciblage protéique vers la membrane plasmique (Collins et al., 2000; Houde et al., 2014). Effectivement, et se basant sur des études *in vivo*, Houde et al. ont indiqué que le remplacement de Cys433 chez les souris (correspondant à Cys430 chez l'homme) par Ser433 induit une diminution du taux de LKB1 en association avec la membrane dans leurs cellules, ainsi qu'une réduction significative de l'activité AMPK, suggérant que la localisation LKB1 est une condition indispensable pour son activité kinase (Houde et al., 2014).

3. LKB1 et le cancer du sein

3.1. Etude dans les modèles murins

Les patients prédisposés au PJS, et présentant des mutations germinales de *lkb1*, montrent un risque plus élevé de développer un cancer à un jeune âge, tel que les cancers pulmonaires, gastro-intestinaux, gynécologiques et mammaires (Korsse et al., 2013; van Lier et al., 2010; Lim et al., 2003). Les patientes atteintes du cancer du sein possèdent une fréquente perte d'hétérozygotie (LOH) au niveau du locus où se situe *lkb1* (Ollila et Mäkelä, 2011).

Une étude menée par Zhuang et al. a révélé que LKB1 limite la migration et la capacité invasive des lignées cancéreuses mammaires (Zhuang et al., 2006). Ce mécanisme est médié par la diminution du niveau des métalloprotéinases sécrétées dans la matrice cellulaire et par la régulation négative de l'expression des facteurs angiogéniques tel que le VEGF *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs ont démontré aussi que LKB1 agit *in vivo* comme un régulateur négatif du cancer du sein: les cellules cancéreuses surexprimant LKB1 et injectées dans des souris nude prolifèrent plus lentement que les cellules cancéreuses témoins ; de plus, la surexpression de LKB1 dans des xénogreffes induit une régression significative des métastases pulmonaires.

Une autre étude effectuée en 2009 a montré que LKB1 est surexprimée dans des cellules cancéreuses mammaires, suite à leur exposition à l'adiponectine (Taliaferro-Smith et al., 2009). Ceci induit l'activation de la voie d'AMPK, empêche l'activation de mTORC1 et diminue par

conséquence le potentiel d'adhésion, de migration et d'envahissement que possèdent ces cellules ; l'effet anti-tumoral observé est inversé par le knockdown de LKB1.

La délétion conditionnelle de *lkb1* dans des cultures épithéliales mammaires primaires, provenant des souris, induit l'altération de l'architecture épithéliale et de la structure de la membrane basale (Partanen et al., 2012). *In vivo*, cette délétion perturbe l'intégrité épithéliale et provoque une discontinuité de la membrane basale autour des canaux épithéliaux mammaires déficients en *lkb1*. De plus, les auteurs ont trouvé que la perte de *lkb1* est significativement associée à l'activation de c-Myc, inducteur de la tumorigénèse mammaire (Partanen et al., 2012). En effet, la combinaison entre les deux évènements, perte de *lkb1* et activation de c-Myc, accélère la formation de tumeurs mammaires chez les souris nude par rapport au groupe témoin.

McCarthy et al. ont généré un modèle de souris transgéniques portant dans leur glande mammaire l'allèle *lkb1* ayant perdu des exons codant pour le domaine kinase (McCarthy et al., 2009). Les souris développent alors des tumeurs des glandes mammaires qui partagent certains aspects histologiques en commun avec les cancers du sein développés chez des patientes atteintes de PJS. Ce modèle constitue un outil précieux pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques et comprendre l'impact biologique de la perte de fonction de *lkb1* dans le développement et la progression du cancer des glandes mammaires.

Un autre modèle a été développé en 2013, combinant la perte de *lkb1* avec une mutation activatrice de l'oncogène HER2 (Andrade-Vieira et al., 2013). La perte de l'activité de LKB1 a permis d'accélérer la formation des tumeurs et de stimuler de manière significative leur croissance. Ceci était fortement corrélé à une activation accrue de la voie mTOR et à une altération du métabolisme cellulaire, ce qui aboutissait à des tumeurs d'activité métabolique élevée. Ce modèle reflète l'importance du gène *lkb1* comme un potentiel marqueur du profil d'activation de la voie mTOR dans les tumeurs HER2-positives pour viser une meilleure thérapie ciblant les acteurs de cette voie.

3.2. Etude dans les tumeurs mammaires

Les patients atteints de PJS développent des cancers du sein caractérisés par une perte ou une expression réduite de la protéine LKB1; les mutations sporadiques étant rarement détectées (Korsse et al., 2013; Sanchez-Cespedes, 2007). Une analyse des séquences du génome complet entamée sur 560 échantillons de cancer du sein a permis l'identification de 916 potentielles

mutations initiatrices du cancer mammaire y inclus celle du gène *lkb1* qui aboutit à l'expression d'une protéine mutée au niveau du résidu Cys151 (Nik-Zainal et al., 2016).

Shen et al. ont étudié l'expression de LKB1 dans une cohorte de 116 cancers du sein invasifs et ils ont trouvé que la faible expression protéique de LKB1 est associée à une plus courte survie globale et survie sans rechute des patientes, en plus de son association à des facteurs de mauvais pronostic tel qu'un grade histologique élevé, une plus grande taille tumorale et des métastases au niveau des ganglions lymphatiques (Shen et al., 2002). L'analyse effectuée dans cette étude tenait compte du niveau d'expression de LKB1 dans les tumeurs sans prendre en considération ni sa localisation subcellulaire ni l'hétérogénéité tumorale.

Récemment, Xiao et al. ont mené une méta-analyse de 14 études comprenant 1915 patients et 7 tumeurs solides différentes, comme le cancer du sein et le cancer du poumon (Xiao et al., 2016). Les auteurs ont démontré que la diminution de l'expression du transcrit de *lkb1* est associée à une faible survie globale des patientes ainsi qu'à une taille tumorale plus grande, un stade TNM plus élevé et des métastases ganglionnaires, suggérant alors que la faible expression de LKB1 pourrait servir comme marqueur prédictif de mauvais pronostic chez les patients atteints de tumeurs solides.

Dans une cohorte de 154 échantillons de cancer mammaire, Bouchekioua-Bouzaghou et al. ont décrit pour la première fois une double localisation de LKB1 dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules tumorales (Bouchekioua-Bouzaghou et al., 2014). En outre, les auteurs ont montré la présence de LKB1 cytoplasmique comme partenaire d'ERα méthylé dans le complexe de la voie non génomique des œstrogènes. En effet, LKB1 ne modifie ni l'intégrité ni la stabilité du complexe non génomique, mais elle intervient comme un partenaire auxiliaire. La double localisation de LKB1 a été confirmée non seulement dans les tumeurs mais aussi dans les lignées cancéreuses mammaires MCF7 (localisation cytoplasmique) et ZR75-1 (localisation nucléaire). L'étude de LKB1 dans cette cohorte a montré une corrélation inverse entre son expression nucléaire et son expression cytoplasmique. De plus, les auteurs ont démontré d'une part que l'expression élevée de LKB1 cytoplasmique est associée à des facteurs de mauvais pronostic, tel que le grade SBR élevé et le statut ERα négatif, alors que la forme nucléaire de LKB1 est associée à des facteurs de bon pronostic. D'autre part, ils ont trouvé que la forte expression cytoplasmique de LKB1 chez les patientes est significativement associée à une

pauvre survie globale et survie sans maladie, tandis que l'expression élevée de LKB1 nucléaire est significativement corrélée à une meilleure survie.

Azim et al. a entamé une étude sur 35 tumeurs égyptiennes mammaires luminales pour établir des corrélations entre LKB1 et les facteurs clinico-pathologiques (Azim et al., 2016). Cette étude a confirmé la double localisation de LKB1 et les auteurs ont démontré qu'une expression élevée de LKB1 dans le noyau est prédictive d'une meilleure survie des patientes. Ils ont également trouvé qu'elle est associée à des facteurs de bon pronostic tels qu'une taille de tumeur plus petite, une plus grande positivité d'ERα et de PR, une négativité d'HER2 prédominante et une diminution du risque de récidive ou de décès, confirmant ainsi les résultats obtenus plus tôt par Bouchekiou-Bouzaghou et al.

RESULTATS

Introduction à l'article

Objectif de l'étude

Notre présente étude vise à investir l'expression de PRMT5 dans le cancer du sein afin de pouvoir identifier un nouveau potentiel biomarqueur permettant de contourner le problème de la résistance chez les patientes. En effet, PRMT5 est impliquée dans divers processus oncogéniques et elle est surexprimée dans de nombreux cancers tels que le cancer de l'ovaire, des poumons, de la prostate, etc…Lorsque nous avons commencé ce travail, son profil d'expression dans le cancer du sein n'avait pas été étudié. Pour répondre à notre objectif, nous avons étudié le profil d'expression et la localisation de PRMT5 dans une cohorte de 440 tumeurs mammaires issues des patientes traitées au Centre Léon Bérard, Lyon. Nous avons pu établir des corrélations avec des facteurs pronostiques et évaluer son impact clinique sur la survie des patientes. Les résultats obtenus nous ont amenés à étudier le lien fonctionnel entre PRMT5 et LKB1, gène suppresseur de tumeur, dans des modèles cellulaires de cancer mammaire ainsi que ses conséquences sur les interactions et l'activité de l'arginine méthyltransférase.

Modèles d'étude

Le modèle cellulaire principal étudié est la lignée humaine MCF7 provenant d'un adénocarcinome mammaire de type ERα positif. Cette lignée a été transfectée d'une part par des siARN pour invalider LKB1 et PRMT5 et d'autre part par des vecteurs exprimant les différentes protéines de notre étude. D'autres modèles mammaires ont été également utilisés comme les lignées ZR-75 et Cama-1 qui sont ERα (+) et les lignées MDA-MB-453 et BT-20 qui sont ERα (-).

Pour réaliser mon projet de thèse, j'ai utilisé diverses approches in vitro nous permettant d'élucider le lien entre la kinase LKB1 et l'arginine méthyltransférase PRMT5, parmi lesquelles le GST-pulldown, l'immunoprécipitation et le PLA (proximity ligation assay) pour l'étude des interactions protéiques, la méthylation in vitro et la phosphorylation in vitro pour détecter des modifications post-traductionnelles ainsi que pour suivre toute variation de l'activité catalytique des enzymes étudiées.

LKB1 regulates PRMT5 activity in breast cancer

Hanine Lattouf[1,2,3,5], Loay Kassem[4] , Julien Jacquemetton[1,2,3] , Ali Choucair[1,2,3], Coralie Poulard[6], Olivier Trédan[7], Laura Corbo[1,2,3] , Mona Diab-Assaf[5], Nader Hussein[5], Isabelle Treilleux[8] and Muriel Le Romancer[1,2,3]

1 INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France
2 CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France
3 Universite Lyon 1, Lyon, France
4 Clinical Oncology Department, Faculty of Medicine, Cairo University, Cairo, Egypt
5 Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Doctoral School of Sciences and Technologies, Lebanese University, Beirut, Lebanon
6 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Comprehensive Cancer Center, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA
7 Centre Leon Bérard, Oncology Department, Lyon, France
8 Centre Leon Bérard, Pathology Department, Lyon, France

Address for all correspondence: Muriel Le Romancer, CRCL, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France. Tel: 00 33 4 78 78 28 22. E-mail: muriel.leromancer@lyon.unicancer.fr

Keywords: Arginine methylation, PRMT5, LKB1, Threonine phosphorylation, Breast cancer

Abbreviated title: PRMT5 is a substrate for LKB1

Abstract

Protein arginine methyltransferase 5 is a type II arginine methyltransferase that can symmetrically dimethylate arginine residues on target proteins in both the cytoplasm and the nucleus. PRMT5 was reported to be an oncoprotein implicated in tumor progression. So far, it has been involved in various cancers, but its expression pattern in breast cancer has not been deeply studied. In this work, we analyzed its expression in a cohort of breast tumor samples and found that its nuclear expression is a good prognosis factor, mainly expressed in ERα-positive tumors. Interestingly, PRMT5 expression is correlated with the kinase LKB1 suggesting a relationship between both proteins. Several approaches gave evidence that PRMT5 and LKB1 interact directly in the cytoplasm of mammary epithelial cells. Moreover, although PRMT5 is not able to methylate LKB1, we found that PRMT5 is a *bona fade* substrate for LKB1. We next identified Thr132, 139 and 144 residues as target sites for phosphorylation, located in the TIM-barrel domain of PRMT5. Interestingly, the Thr139/144 mutation to alanine decreased drastically its methyltransferase activity, probably due to the loss of PRMT5 interaction with regulatory proteins such as MEP50, pICLn and RiOK1. In addition, the modulation of LKB1 expression modifies PRMT5 enzymatic activity, highlighting a new mechanism for regulating its function.

Introduction

Arginine methylation is a frequent posttranslational modification that affects protein behavior. To date, nine protein arginine methyltransferases (PRMTs) have been identified in mammals (PRMT1-9). They are divided into three types according to their enzymatic activities. Type I PRMTs catalyze ϖ–N^Gmonomethylarginine (MMA) and ϖ–N^G, N^G asymmetric dimethylarginine (ADMA); type II PRMTs catalyzes MMA and ϖ–N^G, N^G symmetric dimethylarginine (SDMA); types III PRMTs can only generate MMA (1). PRMT5 is the major type II methyltransferase that is responsible for depositing the SDMA mark within proteins (2). PRMT5 was first identified as Jak-binding protein 1 (3), and shown to methylate many proteins including histones H2A and H4 on Arg3 and histone H3 on Arg8. It methylates histone marks associated with repressed gene expression, like H4R3me2s and H3R8m2s (4). However, in certain contexts, PRMT5 functions as a transcription activator by generating H3R2me2s methylation (5;6). Moreover, PRMT5 regulates transcription through methylation of transcription factors such as NF-kB (7), p53 (8) and E2F-1 (9). PRMT5 can also methylate cytoplasmic proteins such as Sm proteins involved in the splicing of mRNA (10).

The majority of PRMT5 complexes contain MEP50, a 7-bladed WD40 repeat (tryptophan, aspartic acid) β-propeller protein. MEP50 directly binds PRMT5 and enhances its enzymatic activity, increasing its affinity for protein substrates (11;12). PRMT5 interaction with various partners, including pICLn and the kinase RiOK1, is important to regulate its catalytic activity. These partners bind PRMT5 in a mutually exclusive manner to control substrate specificity (13). Menin, a protein found in MLL complexes, to target histone K4 trimethylation, binds also to PRMT5 and targets H4R3me2s at a specific promoter (14). Posttranslational modifications (PTMs) on PRMT5 or MEP50 can also modulate the methyltransferase activity. Jak2 phosphorylates PRMT5 on Tyr304 which impairs its ability to methylate histones H2A or H4 on Arg3 (15;16). Conversely, phosphorylation of MEP50 on Thr5 increases the methyltransferase activity of PRMT5-MEP50 toward histone H4 (17).

Accumulating evidence implicates PRMT5 and MEP50 expression and methyltransferase activity in cancer tumorigenesis. Increased expression and mutation of PRMT5 are found in a wide variety of cancers, including breast cancer (18). In epithelial ovarian cancer and non-small cell lung cancer, elevated PRMT5 is highly correlated with poorer survival (19;20). Moreover,

PRMT5 overexpression causes an increase of proliferation and anchorage-independent growth (4;21) and triggers the formation of tumors in nude mice (21). Conversely, PRMT5 knockdown reduces cellular proliferation in breast and lung cancer cells (4;21;22). In lung cancer, PRMT5 mediates a transcriptional increase of genes regulating cell adhesion, morphology and invasion, all essential for the TGFβ response and cancer metastasis (5). Moreover, the recent generation of a PRMT5 selective inhibitor offers promising therapeutic strategies in mantle cell lymphoma (23).

However, PRMT5 prognosis value was not clearly established in breast cancer. The aim of the present study was to evaluate PRMT5 expression in a big cohort of breast tumors. We identified a new PRMT5 interactor, the protein LKB1, a master kinase that acts as a key regulator of cell polarity, energy metabolism and mTOR signaling (24-26). Our results showed that LKB1 is able to phosphorylate PRMT5 modulating thereby its enzymatic activity. We also investigated the molecular mechanisms involved, highlighting a novel way of regulating PRMT5 activity in breast cancer.

Materials and Methods

Cell culture and Transfections

All the cell lines were maintained at 37°C in the appropriate medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 2% Penicillin/Streptomycin. For knockdown experiments, PRMT5, LKB1 and MEP50-specific siRNAs or the scramble siRNA (Eurogentec) (50 nM) were transfected into MCF-7 cells using lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's guidelines. The targeted sequences are given in the supplementary section. Seventy two hours after transfection, proteins were analyzed. For overexpression experiments, pcDNA3.1 V5-tagged vectors and pSG5 Flag-tagged vectors were transfected into the cells using XtremeGENE reagent (Roche) according to the manufacturer's guidelines. Forty eight hours after transfection, cells were analyzed.

Antibodies

Antibody	Company	Catalog Number	Species	WB	PLA	IF	IP	IHC
Flag	Euromedex	EL1-B11	Mouse	1:1000		1:500		
GAPDH	Meridian Life Science	H86504M	Mouse	1:25000				
Histone H3 (D1H2)	Cell Signaling Technology	4499	Rabbit	1:8000				
Histone H3 (symmetric dimethyl R2)	Abcam	Ab194684	Rabbit	1:1000				
LKB1	Santa Cruz Biotechnology	Sc-32245	Mouse	1:1000	1:100			
LKB1	Millipore	07-694	Rabbit				2µg	
LKB1	Abcam	Ab58786	Rabbit					1:50
MEP50	Cell Signaling Technology	2823S	Rabbit	1:1000	1:100			
Phospho-Threonine	Cell Signaling Technology	9381S	Rabbit	1:1000				
pICLn	Santa Cruz Biotechnology	Sc-393525	Mouse	1:1000				
PRMT5	Santa Cruz Biotechnology	Sc-376937	Mouse	1:1000	1:100			
PRMT5	Millipore	07-405	Rabbit	1:1000	1:100			1:400
PRMT5	Gift from J. Coté		Rabbit				1µg	
RiOK1	Bethyl Laboratories	A302-456A	Rabbit	1:5000				
Tubulin	Sigma Aldrich	T6074	Mouse	1:10000				
V5	Invitrogen	P/N 46-0705	Mouse	1:5000		1:200	2µg	
V5	Cell Signaling Technology	13202S	Rabbit	1:1000			2ug	

Glutathione transferase (GST) pull-down assay

GST pull-down assays were performed either with *in vitro* translated proteins or cellular extracts. For LKB1 direct interaction, LKB1 expression plasmid was transcribed and translated *in vitro* by using T7-coupled reticulocyte lysate in the presence of [^{35}S] methionine. 5 µg of purified recombinant GST-fusion proteins were incubated with labelled proteins or 500 µg of protein extracts in 200 µl of binding buffer (Tris 20 mM pH7.5, NaCl 0.1 M, EDTA 1 mM, Glycerol 10%, NP-40 0.25%) with 1 mM DTT and 1% milk for 2 hr at room temperature. After washing, bound proteins were separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and visualized by autoradiography.

Immunoprecipitation and Western blotting

Cells were lysed using RIPA buffer (50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 and 0.25% deoxycholate) supplemented with protease inhibitor tablets (Roche Molecular Biochemicals) and phosphatase inhibitors (1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 and 1 mM b-glycerophosphate). Protein extracts were incubated with primary antibodies overnight at 4°C by shaking. Protein G or A-Agarose beads were added and the mixture was incubated 2 hr at 4°C. The immunoprecipitated proteins were separated on SDS-PAGE and visualized by ECL (Roche Molecular Biochemicals).

Proximity Ligation Assay (PLA)

This technology was developed by Olink Bioscience (Sweden) to visualize protein/protein interactions *in situ*. Cells were seeded on coverslips into 12-well plates, fixed after 48 hr with cold methanol for 2 min and washed twice with PBS. After saturation, the different couples of primary antibodies (rabbit and mouse) were incubated for 1 hr at 37°C. The PLA probes "mouse minus" and "rabbit plus", consisting of secondary antibodies conjugated with complementary oligonucleotides, were incubated 1 hr at 37°C. After ligation of nucleotides, the amplification occurred for 100 min at 37°C. Afterwards, the samples were mounted with the Duolink mounting medium containing DAPI, and then analyzed on fluorescence microscope.

Immunofluorescence

MCF7 cells ($7x10^4$) were grown on coverslips in 12-well plates. After treatment, cells were fixed in methanol for 2 min and washed twice in PBS. None specific binding was blocked using 1% gelatin solution for 30 min at room temperature and cells were incubated with primary antibodies

for 1 hr at 37°C. After PBS washes, the cells were incubated for another 1 hr at 37°C with the secondary antibody Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) in Dako diluent, then washed in PBS and mounted on glass slides in mounting solution (Dako). The images were acquired using a fluorescent microscope.

Immunohistochemistry staining

Paraffin embedded tumor tissues fixed in formalin were used for analysis. The pathologist selected representative areas from breast invasive carcinomas. Triplicates from each tumor were inserted in TMA blocks which contained 40 tumors each. Eleven TMA (440 tumors) were analyzed. After deparaffinization and rehydration, tissue sections were boiled in 10 mM citrate buffer pH 8 at 95°C for 40 min. The slides were then incubated in 5% hydrogen peroxide in sterile water to block the activity of endogenous peroxidases. The slides were then incubated at 37°C for 1 hr with the anti-LKB1 or the anti-PRMT5 antibody. The slides were subsequently incubated with a biotinylated secondary antibody bound to a streptavidin peroxidase conjugate (Envision Flex kit Ref: K800021-2, Dako). Bound antibodies were revealed by adding the substrate 3, 3-diamino benzidine. Sections were counterstained with haematoxylin.

Image acquisition and Analysis

The hybridized fluorescent slides were viewed under a Nikon Eclipse Ni microscope. Images were acquired under identical conditions at X60 magnification. Image acquisition was performed by imaging DAPI staining at a fixed Z Position while a Z stack of +/- 5µm at 1 µm intervals was carried out. The final image was stacked to a single level before further quantification. On each sample, at least one hundred cells were counted. Analyses and quantifications of these samples were performed using Image J software (free access). PLA dots were quantified on 8-bit images using the 'Analyse Particles' command, while cell numbers were numerated using the cell counter plugin.

IHC images were also acquired using Nikon Eclipse Ni microscope at x40 magnification and PLA dots were quantified as described above.

***In vitro* methylation assay**

Immunoprecipitated V5-PRMT5 or endogenous PRMT5 were incubated with different GST-tagged LKB1 fragments or GST-SmD3 in the presence of S-adenosyl-L [methyl-^{3}H] methionine ([^{3}H] SAM 85 Ci/mmol from a 10.4 mM stock solution in dilute HCl/ethanol 9/1 [pH 2.0–2.5];

Perkin Elmer) for 90 min at 30°C. Methylation reactions were quenched by the addition of 10 µL of 2x Laemmli sample buffer, heated at 95°C for 5 min, and separated on SDS-PAGE. Following electrophoresis, gels were soaked in Amplify reagent (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions and visualized by autoradiography.

***In vitro* phosphorylation assay**

The assays were performed incubating the LKB1/STRADα/MO25α active complex (Merck) according to the manufacturer's instructions in the presence of adenosine 5'-triphosphate, [γ-^{32}PATP] (Perkin Elmer) for 30 min at 30°C. Phosphorylation reactions were quenched by the addition of 10 µL of 2x Laemmli sample buffer, heated at 95°C for 5 min, and separated on SDS-PAGE. Following electrophoresis, gels were dried for 45 min at 80°C and revealed by autoradiography.

Total cell lysis

Treated MCF7 cells were collected and washed twice with PBS. Pellets were resuspended in a lysis buffer (Tris HCl 20 mM pH8.8, $CaCl_2$ 2mM) followed by the addition of 9µl of a solution containing 3% SDS and 10% β-mercaptoethanol. The mixture is heated at 95°C for 2 min and cooled after on ice. To ensure the degradation of cellular DNA, 5µL of DNAse solution (1mg/ml) were added. The final extracts were vortexed for homogenization and histones were analyzed by western blotting.

Human breast cancer samples collection

The tumors from 440 CLB patients with invasive breast cancer, whose clinical and biological data were available from the regularly updated institutional database, were analyzed. Written informed consent was obtained from each patient. The study protocol was approved by the institutional ethics committee. Patient's characteristics are presented in Supporting Information Table S4.

Statistical analysis

Descriptive analysis. Clinical parameter's distributions (cancer subtype, clinical, histological and immunohistochemical data) were presented in the form of numbers and percentages. Correlations of PRMT5 expression with clinical and biomarkers parameters (including LKB1) were done using Fisher's exact test.

Survival analysis. Overall Survival (OS) defined as time from diagnosis to death or date of last follow-up and Disease Free Survival (DFS) defined as time from diagnosis to death or relapse or date of last follow-up (for censored patients) were studied. Survival distributions were estimated by Kaplan-Meier method and compared between expression's level groups using the Log-Rank test. Hazard ratios for relapse or death were estimated by cox regression model. Statistical analyses were done using SPSS v20.0 software (IBN, USA). A statistical significant interaction was considered if the alpha error was less than 5%.

Results

Expression of PRMT5 in breast tumors

We wanted to assess PRMT5 expression in a big cohort of 440 breast cancer samples. The analysis of IHC experiments revealed that PRMT5 is expressed in both cytoplasmic and nuclear compartments. All the tumors showed diffuse expression of PRMT5 in the cytoplasm, although its nuclear expression was restricted to a subset of tumors (63.8%) (Figure 1A, compare panels a and b for cytoplasmic staining and panels c and d for cytoplasmic and nuclear staining). As PRMT5 is expressed in the cytoplasm of all tumors, we could only perform statistical analyses on its nuclear expression. We next analyzed the association between PRMT5 nuclear expression and clinical parameters. We found that high PRMT5 expression was associated with older patients ($p=0.05$), small tumor size ($p=0.002$) and low SBR grade ($p<0.001$). High nuclear PRMT5 expression was also associated with positive ERα status ($p<0.001$) and PR status ($p<0.001$) (Figure 1B). Thus high levels of nuclear PRMT5 were associated with good prognostic factors. Next, we investigated PRMT5 nuclear expression with actors of the PI3K pathway. We found that PRMT5 expression was correlated with pAkt expression in both the nucleus and the cytoplasm. PRMT5 expression was also associated with nuclear LKB1 expression (Figure 1C).

Regarding patient outcome according to univariate analysis, high nuclear PRMT5 expression was significantly associated with longer OS ($p=0.034$) and DFS ($p=0.001$; Figure 1D). As high nuclear LKB1 expression has been shown to be associated with longer survival in a previous cohort (27), we evaluated its prognosis value in this cohort. Figure 1E (left panel) shows that high nuclear LKB1 expression was significantly associated with longer DFS ($p=0.006$), which confirms the results of our previous study. Interestingly, LKB1 prognosis value was restricted to PRMT5 expressing tumors in the nuclei ($p=0.005$, Figure 1E, right panel), as there is no correlation with patients expressing a low nuclear PRMT5 (Figure 1E, middle panel).

In conclusion, nuclear PRMT5 is a marker of good prognosis in breast cancer whose expression is correlated with nuclear LKB1 expression, suggesting a functional link between both proteins.

LKB1 is a new partner of PRMT5

We first studied whether the proteins could directly interact by a GST pull-down approach. We found that radioactive LKB1 interacts specifically with PRMT5 and its partner MEP50, but not with the GST (Figure 2A). We further identified the domain of PRMT5 involved in the interaction by subdividing the protein into 4 fragments (Figure 2B). Figure 2C indicates that the interaction occurs mainly *via* the D3 fragment containing the Middle-Rossman-fold domain, although it can bind faintly to the other domains. We next wanted to study these interactions in a cellular context. For this purpose, we investigated LKB1, PRMT5 and its coregulatory MEP50 in several tumoral breast cell lines. As shown in Figure 3A, the 3 proteins are expressed independently of the presence of ERα and their expression profile is quite similar, reinforcing the hypothesis of a functional link between the proteins. For the following experiments, we decided to use the MCF-7 cells that express a high level of the 3 proteins. We first assessed PRMT5 interaction with LKB1 by immunoprecipitation. Figure 3B shows that LKB1 interacts specifically with endogenous PRMT5. Moreover, we examined to what extent and in which compartment these interactions occurred in the cells. Using different antibody pairs, we studied the interaction of LKB1 with PRMT5 and MEP50 using the proximity ligation assay technique (PLA). Figure 3C shows that LKB1 interacts with PRMT5 (panel a) and MEP50 (panel d) in the cytoplasm of MCF-7 cells, as indicated by the presence of red dots. The interactions were quantified by counting the number of dots per cell (Figure 3D). The signals strongly decreased in MCF-7 cells in which expression of PRMT5 (Figure 3C, panel b), MEP50 (Figure 3C, panel e) and LKB1 (Figure 3C, panels c and f) was downregulated by siRNA transfection (Figure 3D and 3E). We next confirmed these cytoplasmic interactions in other breast tumoral cell lines, comforting the idea of a functional link between these proteins (Figure S1).

Phosphorylation of PRMT5 by LKB1 impairs its methyltransferase activity

We next wanted to attribute a role to PRMT5/LKB1 interaction. We hypothesized that LKB1 could be a substrate for PRMT5. To address this question, we performed an *in vitro* methylation experiment and found that LKB1 was not methylated by PRMT5 (Figure S2). We then investigated whether LKB1 could phosphorylate PRMT5. For *in vitro* phosphorylation experiments, purified GST-PRMT5 fragments D1 to D4 described in Figure 2B were incubated with the active LKB1 complex. We can see in Figure 4A that only the D1 fragment of PRMT5

was phosphorylated by LKB1. To identify the phosphorylated residues, we divided the D1 fragment into two parts (D1a and D1b) as shown in Figure 4B and performed an *in vitro* phosphorylation experiment as previously described. We found that only the D1b fragment was phosphorylated. As LKB1 is a Ser/Thr kinase, we first investigated which kind of residues was phosphorylated. Using antibodies, recognizing pan-phosphoSer or Thr, we found that LKB1 phosphorylates PRMT5 mainly on Thr residues (Figure 4C). Further, the substitution of T132, T139 and T144 to alanine strongly decreased phosphorylation although T144 mutation had a stronger effect (Figure 4D). When we looked at PRMT5 structure, we found that the three threonine residues are close at the dimer interface (Figure 4E), so we checked whether they are involved in PRMT5 dimerization. After transfection of V5 tagged-PRMT5 wild type or the mutants (T144A, T132A/144A or T139A/144A) in MCF-7 cells, we immunoprecipitated V5-PRMT5 and revealed the presence of endogenous PRMT5. Figure 4F shows that none of the mutants modified PRMT5 dimerization. Moreover, PRMT5 mutation of the three threonine had no effect on its cellular localization (Figure S3). We next assessed whether the mutation of the threonine could affect PRMT5 enzymatic activity. For this purpose, we immunoprecipitated V5-tagged-PRMT5 wild type or mutants (T132A, T139A, T144A, T132A/144A and T139A/144A) from HeLa cells, and incubated with [^{3}H] S-adenosylmethionine and recombinant GST-SmD3, a known PRMT5 substrate in an *in vitro* methylation assay. Although the single mutations had no effect on PRMT5 enzymatic activity, the T139A/144A lost completely its methyltransferase activity (Figure 5A). We next examined whether the lack of activity of the double mutant could be due to a decrease in PRMT5 interaction with its partners by co-immunoprecipitation experiments. Figure 5B shows that the double mutant T139A/144A impaired PRMT5 binding to its coactivator MEP50, which could explain why the mutant lost its enzymatic activity. In addition, the PRMT5 mutant lost its ability to bind to pICLn and RiOK1, two partners involved in PRMT5 recognition of substrates. Interestingly, the double PRMT5 mutant shows no binding to LKB1.

As we have shown that LKB1 phosphorylates T139 and T144 residues, we wanted to evaluate whether LKB1 could impact PRMT5 enzymatic activity. To address this issue, we overexpressed LKB1 wild-type or LKB1 K78A mutant in MCF-7 cells, we immunoprecipitated endogenous PRMT5 and evaluated its capacity to methylate SmD3 as described earlier. Figure 5C indicates that wild-type LKB1 significantly decreased PRMT5 methyltransferase activity whereas the

kinase dead mutant LKB1 K78A had no inhibitory effect. Interestingly, the knock down of LKB1 in MCF-7 cells had the opposite effect, as PRMT5 enzymatic activity was increased on its exogenous substrate SmD3 (Figure 5D). We next examined whether LKB1 knockdown affects global H3R2 symmetric dimethylation levels *in vivo* using MCF7 cells transfected with siRNA targeting LKB1. Figure 5E shows that LKB1 knockdown increased H3R2 methylation suggesting that LKB1 expression is necessary to regulate PRMT5 catalytic activity towards its endogenous substrates.

Discussion

Arginine methyltransferases expression is associated with various cancers, suggesting that they could constitute new targets for therapies. However, when we started this study, no correlation has been done with patient's survival in breast cancer. In this study, using a big cohort of tumors, we wanted to determine whether PRMT5 expression was associated with patient's outcome in breast cancer. These findings introduce the identification of a new partner of PRMT5, the Ser/Thr kinase LKB1 able to modulate its methyltransferase activity *via* phosphorylation.

The strength of our clinical analysis was to possess a large cohort of 440 breast tumor specimen with known expression of several biomarkers of interest, allowing performing robust statistical analysis. We confirmed the dual localization of PRMT5 in the cytoplasm as well as in the nucleus of tumoral cells (Figure 1A) as already found in testicular, breast and prostate cancers (28-30). Interestingly, cytoplasmic PRMT5 is essential for the growth of prostate cancer cells, whereas nuclear PRMT5 inhibits prostate cancer cell growth. Moreover, PRMT5 localizes in the nucleus of benign prostate epithelial cells and in the cytoplasm of cancerous prostate tissues. Unfortunately, in our study cytoplasmic PRMT5 is expressed in all tumors, impeding to perform any statistical analysis. However, high nuclear PRMT5 was associated with good patient's outcome. These results appear conflicting with recent studies showing that high PRMT5 expression was associated with shorter survival (30;31). The subcellular localization of PRMT5 might be responsible for these conflicting observations. Moreover Yang study was investigated on mRNA and not at the protein level and in the Fan Yang's paper, they have not taken in account the two localizations of PRMT5 for the statistical analyses. Concerning the correlation with other markers analyzed by the team, we found a positive correlation between PRMT5 and nuclear LKB1 expression but not with cytoplasmic LKB1 expression. Interestingly nuclear LKB1 expression is also associated with longer patient's survival confirming the results obtained by the team in a previous cohort of breast tumors (27). Of note, this correlation is only significant in patients with tumors expressing a high level of nuclear PRMT5, reinforcing the idea of a putative functional link between the two proteins. However, results from our patients' series should be interpreted with caution. The retrospective nature of our cohort, the use of TMA sections that bears only cores of the whole tumor in addition to the heterogeneity of the patient population makes drawing a solid conclusion from our series difficult. A prospective validation

study in a large prospective cohort using the same cutoffs is needed to confirm the clinical role of PRMT5 expression in breast cancer patients.

We decided to investigate the detected correlation between PRMT5 and LKB1 in a cellular context, but we were unable to find a mammary cell line where both proteins were expressed in the nucleus (data not shown). Moreover, when we studied their interaction, we found that it occurred only in the cytoplasm of mammary tumoral cells. We cannot exclude that they could interact in the nucleus, but the interaction could be transient and consequently too difficult to detect.

LKB1 interacts with PRMT5 in the D3 fragment containing the Middle-Rossman-fold domain, which binds the SAM (15), suggesting that its binding could modify PRMT5 enzymatic activity. In addition, the mutations of T139 and T144 residues to alanine completely abolished LKB1 interaction with PRMT5. One can hypothesize that the phosphorylation of these residues may stabilize LKB1 binding to PRMT5.

So far, we have identified 3 threonine phosphorylated by LKB1. However, we cannot exclude that other residues could be modified. Indeed, when we divided the D1 domain of PRMT5 into two fragments and performed the *in vitro* phosphorylation experiment, we noticed that the D1a fragment is also faintly phosphorylated by LKB1 (Figure 4B). Moreover, LKB1 binds also MEP50 and we cannot exclude that it could also be a substrate for LKB1. Phosphorylation appears to be largely involved in PRMT5/MEP50 activity, as several kinases have been described to modulate the complex activity. Mutant Jak2 phosphorylates PRMT5 at Y304 residue impairing the ability of PRMT5 to methylate histones. Conversely, phosphorylation of MEP50 on T5 residue increases the methyltransferase activity towards histone H4 (17) More recently, PRMT5 has been described to be phosphorylated in its C-terminus part by the Akt and glucocorticoid-inducible kinases on T634. This event triggers a 14-3-3/PDZ interaction switch important for the targeting of PRMT5 to the plasma membrane (32)

In our work, we identified two threonine residues crucial for PRMT5 enzymatic activity. We can hypothesize that these residues are important for the methylation of substrates as their mutation to alanine inhibits PRMT5 binding to MEP50, its major regulator (33) as well as to pICLn, targeting the enzyme to Sm proteins (34) and to RiOK1, targeting it to a broad range of substrates such as nucleolin and histones (13) (Figure 6A). Even, if we did not demonstrate clearly that T139 and T144 are phosphorylated *in vivo*, we can propose a model in which, in the

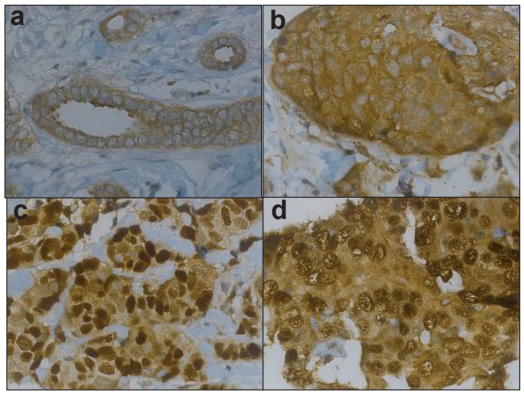
presence of LKB1, the two threonine are phosphorylated, triggering the dissociation of MEP50, pICLn and RioK1 and then decreasing PRMT5 enzymatic activity (Figure 6B). From our studies, we can speculate that the production of a specific antibody recognizing P-T139/P-T144 could be used as a marker of PRMT5 enzymatic activity.

In conclusion, we identified a new PRMT5 partner, regulating its enzymatic activity. We can hypothesize that in breast tumors, LKB1 could maintain PRMT5 to a low activity level, impeding its protumoral action.

Acknowledgements

We thank C. Languilaire, F. Nasri, A. Colombe and L. Odeyer for technical support. We thank E. Fabrizzio for pGEX-SmD3 vector, Jocelyn Coté for the anti-PRMT5 antibody and B. Mandship for the proofreading of the manuscript. We also thank the Lebanese University, Cedre Program, Fondation Arc Cancer, INCA and DGOS for financial support, Fondation Arc Cancer and NIH for CP, Fondation Arc Cancer and DGOS for JJ.

A



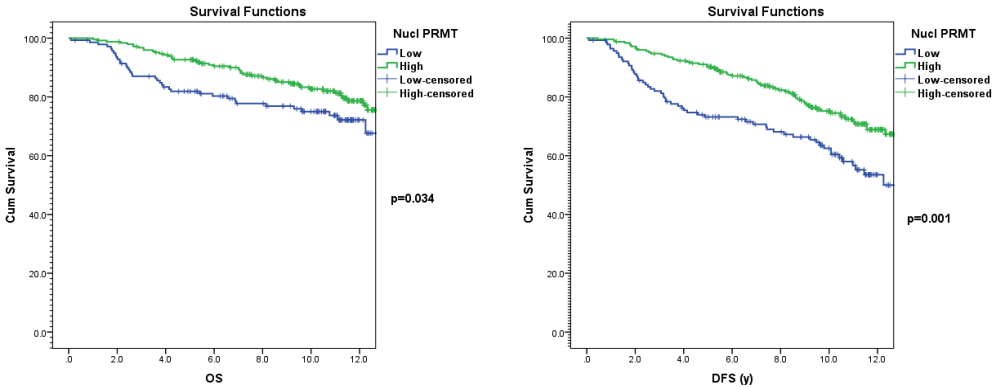
B

Variable		Nucl PRMT5 low No. (%) 141 (36.2)	Nucl PRMT5 high No. (%) 249 (63.8)	P*
Age (Yr)	*-Mean (± SD)*	57.1 (±13.6)	59.7 (±11.8)	**0.05†**
Age groups	*- ≤50y*	45 (31.9)	57 (22.9)	**0.05**
	- >50y	96 (68.1)	192 (77.1)	
BMI	*- ≤25*	81 (58.7)	153 (64.3)	0.281
	- >25	57 (41.3)	85 (35.7)	
T. size	*- ≤2cm*	65 (46.1)	155 (62.2)	**0.002**
	- >2cm	76 (53.9)	94 (37.8)	
LN invasion	*-No*	64 (45.4)	99 (39.8)	0.28
	-Yes	77 (54.6)	150 (60.2)	
SBR grade	*-Gr 1*	19 (13.5)	53 (21.3)	**<0.001**
	-Gr 2	46 (35.6)	136 (54.6)	
	-Gr 3	76 (53.9)	60 (24.1)	
ER status	*-Negative*	40 (28.4)	10 (4.0)	**<0.001**
	-Positive	101 (71.6)	239 (96.0)	
PR status	*-Negative*	53 (37.6)	46 (18.5)	**<0.001**
	-Positive	88 (62.4)	203 (81.5)	
Her 2 status	*-Negative*	71 (89.9)	132 (93.0)	0.42
	-Over-expressed	8 (10.1)	10 (7.0)	

C

Variable		Nucl PRMT5 low No. (%) 141 (36.2)	Nucl PRMT5 high No. (%) 249 (63.8)	P*
Nucl pAKT	*-Low (≤50)*	87 (64.9)	95 (39.7)	**<0.001**
	-High (>50)	47 (35.1)	144 (60.3)	
Cytopl pAKT	*--Low (≤100)*	120 (88.9)	189 (78.8)	**0.013**
	-High (>100)	15 (11.1)	51 (21.2)	
Nucl LKB1	*-Low (=0)*	77 (57.0)	110 (46.2)	**0.045**
	-High (>0)	58 (43.0)	128 (53.8)	
Cytopl LKB1	*-Low (≤140)*	79 (58.5)	150 (62.5)	0.448
	-High (>140)	56 (41.5)	90 (37.5)	
P4E-BP1	*-Low (≤50)*	66 (48.9)	130 (53.7)	0.368
	-High(>50)	69 (51.1)	112 (46.3)	
P85-pS6K	*-Low (≤90)*	94 (66.7)	174 (71.9)	0.281
	-High (>90)	47 (33.3)	68 (28.1)	
PS6-RP	*-Low (≤100)*	105 (77.2)	178 (73.6)	0.432
	-High (>100)	31 (22.8)	64 (26.4)	

D



E

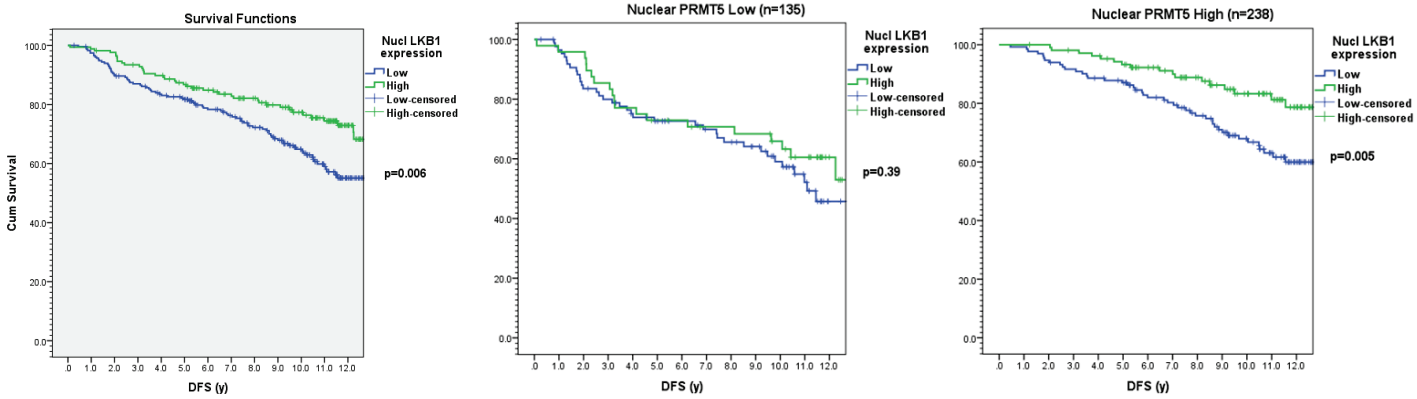


Figure 1

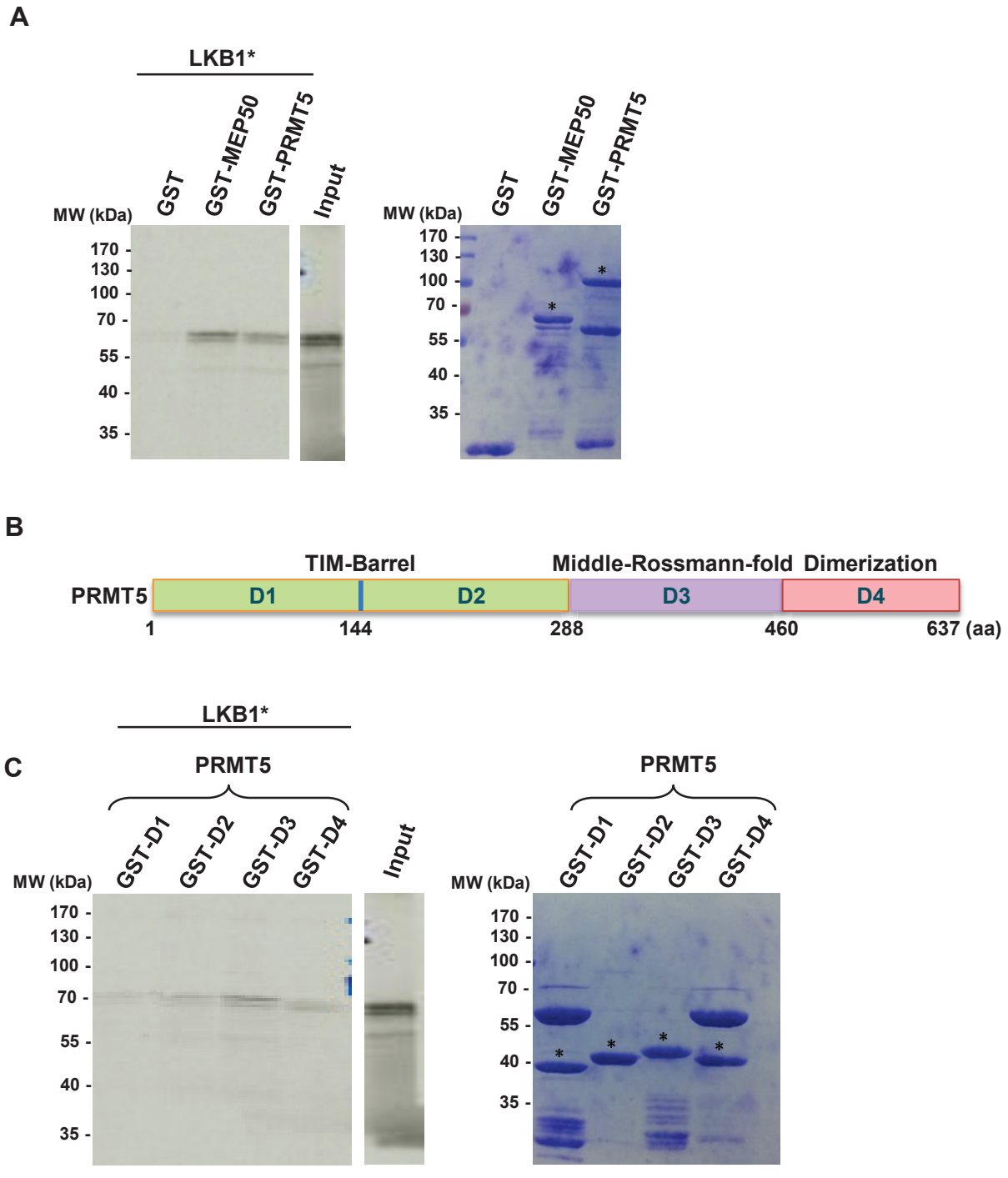

A
LKB1*
GST
GST-MEP50
GST-PRMT5
Input
MW (kDa)
170
130
100
70
55
40
35
B
TIM-Barrel
Middle-Rossmann-fold
Dimerization
PRMT5
D1
D2
D3
D4
1
144
288
460
637 (aa)
C
LKB1*
PRMT5
GST-D1
GST-D2
GST-D3
GST-D4
Input

Figure 2

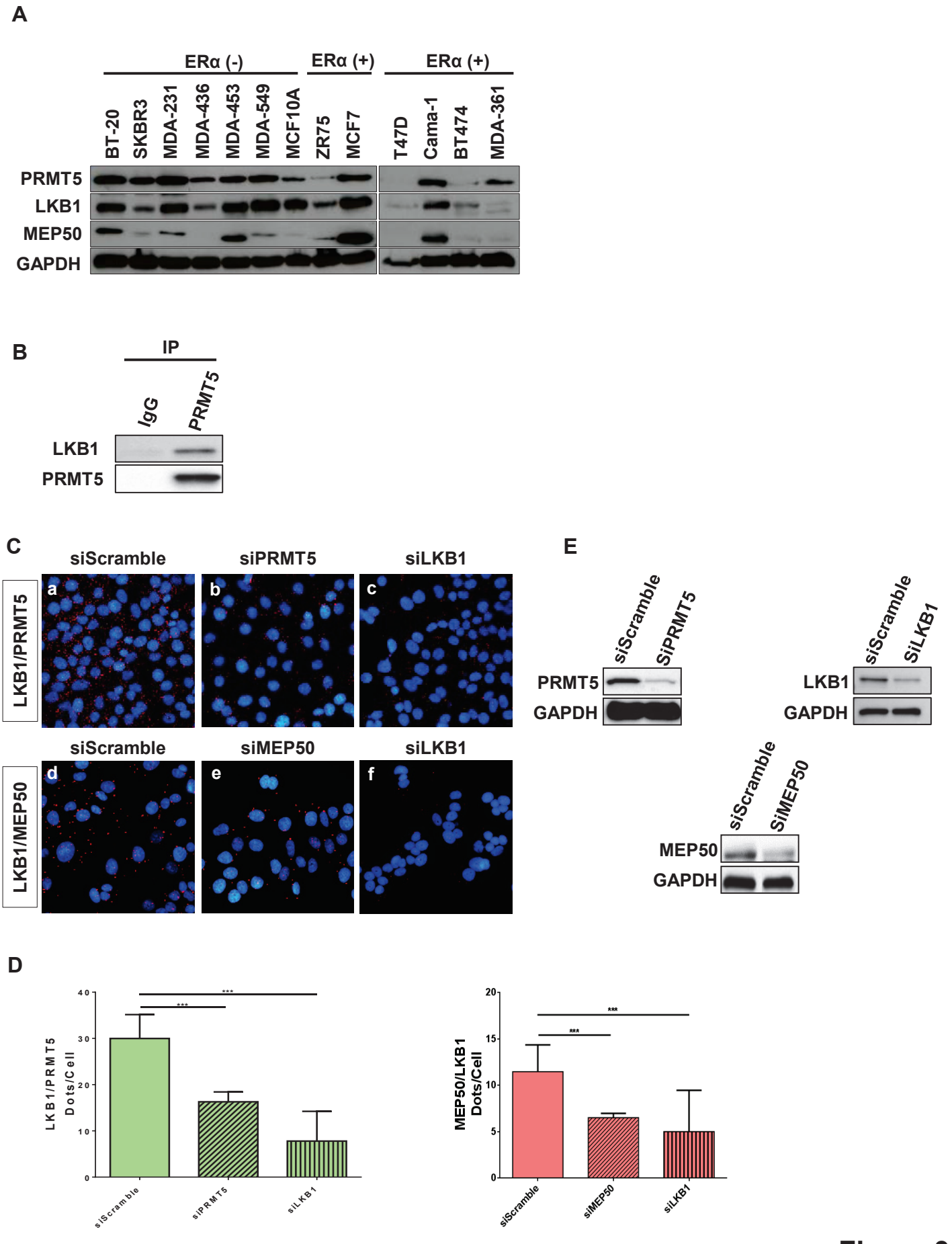

A
ERα (-)
ERα (+)
ERα (+)
BT-20
SKBR3
MDA-231
MDA-436
MDA-453
MDA-549
MCF10A
ZR75
MCF7
T47D
Cama-1
BT474
MDA-361
PRMT5
LKB1
MEP50
GAPDH
B
IP
IgG
PRMT5
LKB1
PRMT5
C
siScramble
siPRMT5
siLKB1
LKB1/PRMT5
a
b
c
siScramble
siMEP50
siLKB1
LKB1/MEP50
d
e
f
E
siScramble
SiPRMT5
PRMT5
GAPDH
siScramble
SiLKB1
LKB1
GAPDH
siScramble
SiMEP50
MEP50
GAPDH
D
LKB1/PRMT5 Dots/Cell
40
30
20
10
0
***
***
siScramble
siPRMT5
siLKB1
MEP50/LKB1 Dots/Cell
20
15
10
5
0
***
***
siScramble
siMEP50
siLKB1

Figure 3

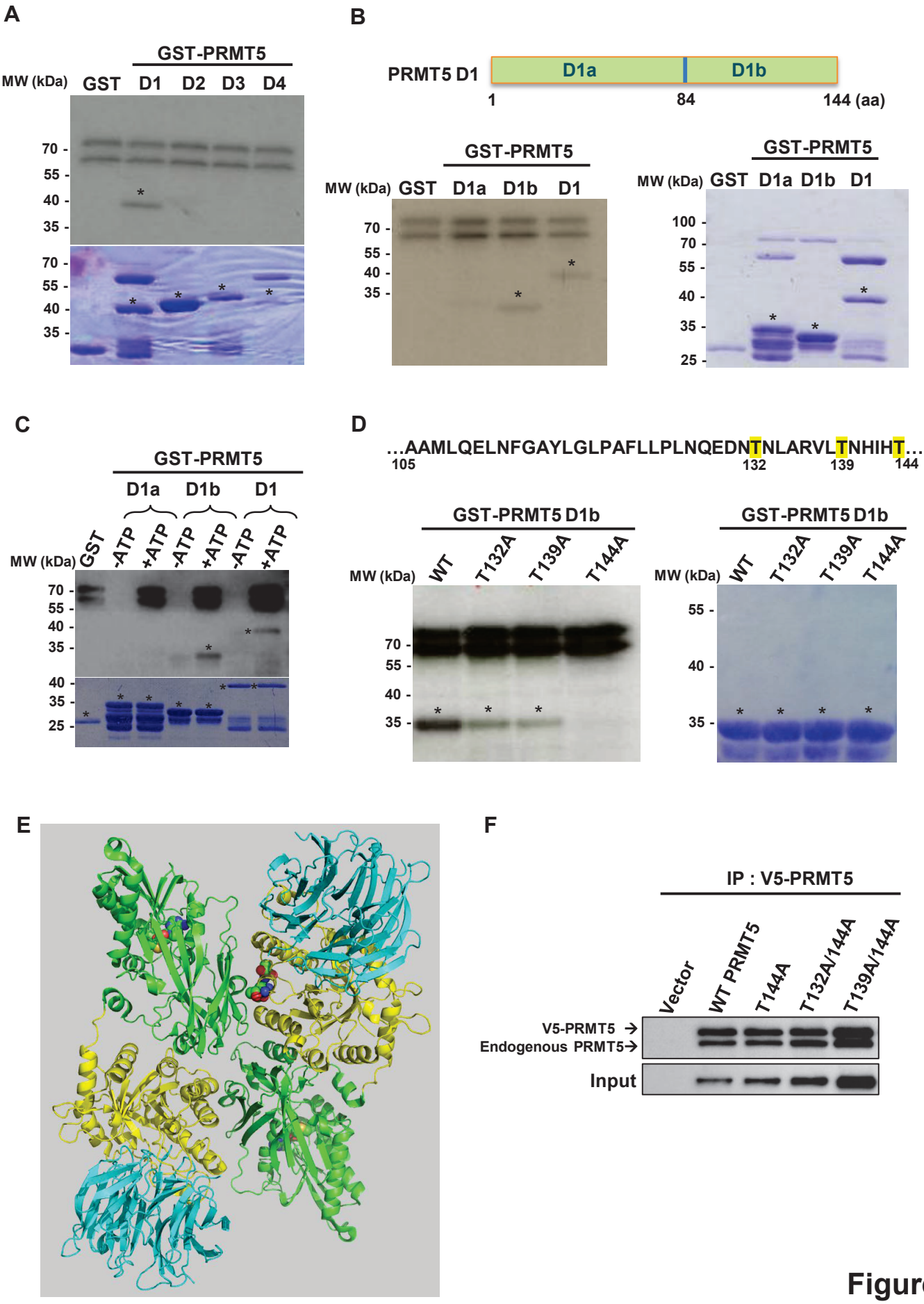

A
GST-PRMT5
MW (kDa)
GST
D1
D2
D3
D4
70 -
55 -
40 -
35 -
B
PRMT5 D1
D1a
D1b
1
84
144 (aa)
GST-PRMT5
MW (kDa)
GST
D1a
D1b
D1
100 -
25 -
C
GST-PRMT5
D1a
D1b
D1
-ATP
+ATP
D
…AAMLQELNFGAYLGLPAFLLPLNQEDNTNLARVLTNHIHT…
105
132
139
144
GST-PRMT5 D1b
WT
T132A
T139A
T144A
E
F
IP : V5-PRMT5
Vector
WT PRMT5
T144A
T132A/144A
T139A/144A
V5-PRMT5
Endogenous PRMT5
Input

Figure 4

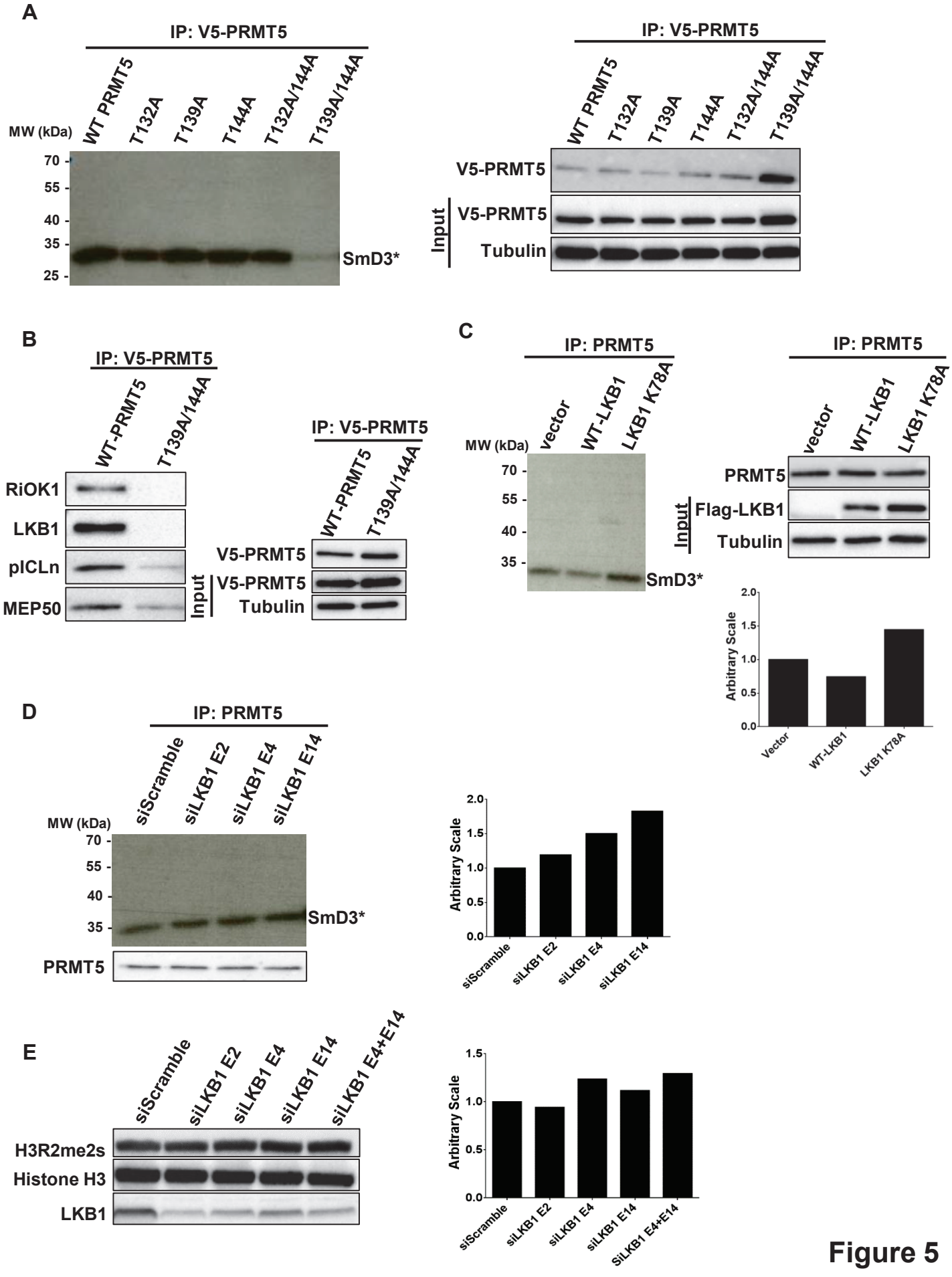

A
IP: V5-PRMT5
WT PRMT5
T132A
T139A
T144A
T132A/144A
T139A/144A
MW (kDa)
70
55
40
35
25
SmD3*
IP: V5-PRMT5
V5-PRMT5
Input
V5-PRMT5
Tubulin
B
IP: V5-PRMT5
WT-PRMT5
T139A/144A
RiOK1
LKB1
pICLn
MEP50
IP: V5-PRMT5
V5-PRMT5
Input
V5-PRMT5
Tubulin
C
IP: PRMT5
vector
WT-LKB1
LKB1 K78A
MW (kDa)
70
55
40
35
SmD3*
IP: PRMT5
PRMT5
Input
Flag-LKB1
Tubulin
Arbitrary Scale
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Vector
WT-LKB1
LKB1 K78A
D
IP: PRMT5
siScramble
siLKB1 E2
siLKB1 E4
siLKB1 E14
MW (kDa)
70
55
40
35
SmD3*
PRMT5
Arbitrary Scale
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
siScramble
siLKB1 E2
siLKB1 E4
siLKB1 E14
E
siScramble
siLKB1 E2
siLKB1 E4
siLKB1 E14
siLKB1 E4+E14
H3R2me2s
Histone H3
LKB1
Arbitrary Scale
1.5
1.0
0.5
0.0
siScramble
siLKB1 E2
siLKB1 E4
siLKB1 E14
SiLKB1 E4+E14

Figure 5

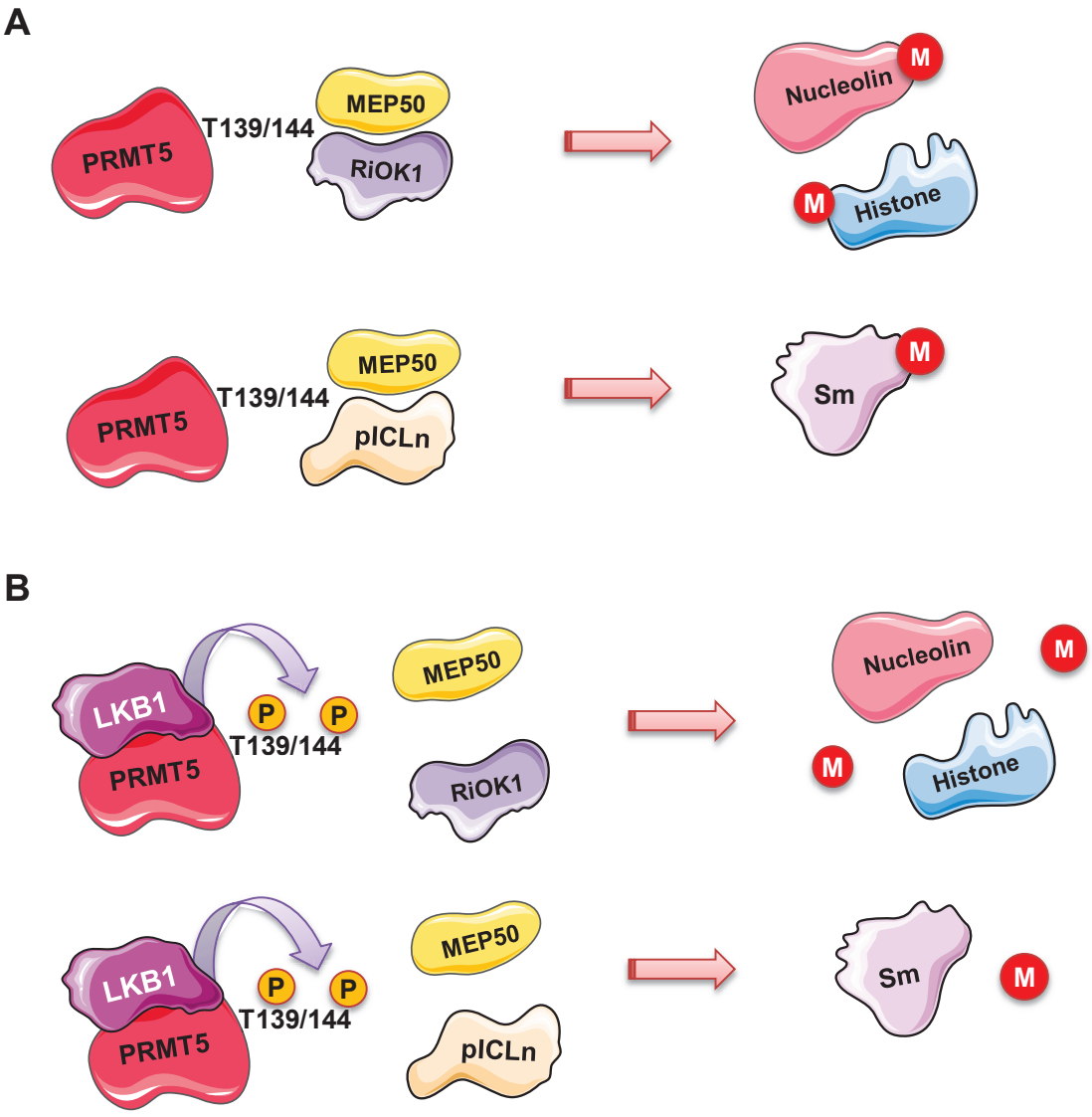

A
PRMT5
T139/144
MEP50
RiOK1
Nucleolin
M
M
Histone
PRMT5
T139/144
MEP50
pICLn
Sm
M
B
LKB1
PRMT5
P
P
T139/144
MEP50
RiOK1
Nucleolin
M
M
Histone
LKB1
PRMT5
P
P
T139/144
MEP50
pICLn
Sm
M

Figure 6

Legends of figures

Figure 1: Expression of PRMT5 in breast tumors.

(A) PRMT5 expression was analyzed by IHC on formalin-fixed human tumors. Representative images of different IHC staining profiles are shown (panels a and b: cytoplasmic staining, panels c and d: cytoplasmic and nuclear staining) (Obj: X40).

(**B)** Distribution of clinical parameters according to PRMT5 nuclear expression. Association analysis between clinical characteristics and PRMT5 nuclear expression levels were studied using Fisher's exact test. Significant correlations at 5% level are highlighted in bold characters.

(**C)** Correlation studies between nuclear PRMT5 and other markers expression were performed using Fisher's exact test.

(**D)** Kaplan Meier estimates of OS and DFS according to nuclear PRMT5 expressing groups.

(**E)** Kaplan Meier estimates of DFS to nuclear LKB1 expressing groups according to PRMT5 nuclear expression.

Figure 2: PRMT5 interacts with LKB1 *in vitro.*

(A) Radioactive GST pull-down assay was performed by incubating labelled *in vitro* ^{35}S-labeled LKB1 (LKB1*) with GST, GST-MEP50 and GST-PRMT5. The corresponding Coomassie-stained gel is shown in the right panel. * indicates the full length fusion proteins.

(**B)** PRMT5 was divided in 4 fragments (D1 to D4). The D1 and D2 fragments cover the TIM-Barrel domain. The D3 fragment corresponds to the Middle-Rossman-fold domain and the D4 fragment contains the dimerization domain.

(**C)** Radioactive LKB1 (LKB1*) was incubated with the different domains of PRMT5 fused to GST and the bound proteins were visualized by autoradiography. The corresponding Coomassie-stained gel is shown in the right panel. * indicates the full length fusion proteins.

Figure 3: PRMT5 interacts with LKB1 *in cellulo*.

(A) Expression of PRMT5, MEP50 and LKB1 was evaluated in a wide range of human breast tumor cell lines by western blot using the corresponding antibodies. GAPDH expression was assessed for loading control.

(**B)** PRMT5 interaction with LKB1 was assessed by co-immunoprecipitation in MCF-7 cell extracts using an anti-PRMT5 antibody. A rabbit irrelevant antibody was used as a negative control. The presence of PRMT5 and LKB1 was evaluated by western blotting.
(**C)** Detection of LKB1 interaction with PRMT5 and MEP50 was performed by PLA. MCF-7 cells were transfected with siScramble or siRNA targeting LKB1, PRMT5 or MEP50 for 48 hr. After fixation, PLA experiments were performed to evaluate the interactions between LKB1/PRMT5 and LKB1/MEP50 using LKB1, PRMT5 and MEP50 specific antibodies. The detected dimers are represented by red dots. The nuclei were counterstained with mounting medium containing DAPI (blue) (Obj: X60).
(**D)** Quantification of the number of dots per cell was performed by computer-assisted analysis as reported in the method section. The mean +:- s.e.m of three experiments is shown. The *P*-value was determined using the Student's t-test. *** indicates a $P<0{,}001$.
(**E)** The efficacy of protein inhibition was verified by western blotting using the corresponding antibodies.

Figure 4: LKB1 phosphorylates PRMT5 on 3 threonine residues.
(A) *In vitro* phosphorylation experiment was performed by incubating active LKB1 complex with [^{32}Pγ] ATP and D1 to D4 PRMT5 fragments fused to GST. The phosphorylated proteins were visualized by autoradiography (upper panel). The corresponding Coomassie-stained gel is shown in the lower panel. * indicates the full length fusion proteins.
(**B)** PRMT5 D1 domain was divided into two parts, D1a and D1b, which were used to perform an *in vitro* kinase assay as described in A (left panel). The corresponding Coomassie-stained gel is shown in the right panel. * indicates the full length fusion proteins.
(**C**) Cold i*n vitro* phosphorylation experiment was performed by incubating active LKB1 complex with D1a, D1b and D1 PRMT5 fragments fused to GST in the absence or the presence of ATP. The phosphorylated proteins were verified by western blotting using a pan-phosphoThreonine antibody (upper panel). The corresponding Coomassie-stained gel is shown in the lower panel. * indicates the full length fusion proteins.
(**D)** A part of PRMT5's D1b sequence is shown and the potential sites for LKB1 phosphorylation, T132, 139 and 144, are highlighted in yellow.

GST-D1b wild type or T/A mutants were used as substrates for LKB1 phosphorylation (left panel). The corresponding Coomassie-stained gel is shown in the right panel. * indicates the full length fusion proteins.

(**E)** Modelled structure of human PRMT5 heterodimers with MEP50. The N-terminal of each monomer, containing the TIM-Barrel domain, is represented in yellow and its C-terminal domain in green. The 3 mutated threonine are in the spacefill at the dimer interface. The protein represented in blue is MEP50.

(**F**) MCF-7 cells were transfected with pcDNA3.1 V5-PRMT5 WT and mutants for 48 hr. Cell lysates were immunoprecipitated using an anti-V5 antibody. The bound proteins were verified by western blotting using an anti-PRMT5 antibody to assess the dimerization with endogenous PRMT5. 1/20th of the IP was analyzed for V5-PRMT5 expression.

Figure 5: Phosphorylation of PRMT5 by LKB1 impairs its methyltransferase activity

(A) HeLa cells were transfected with the different V5-PRMT5 mutants for 48 hr. PRMT5 catalytic activity was assessed by immunoprecipitation using an anti-V5 antibody, followed by a radioactive *in vitro* methylation assay. SmD3 was incubated with the immunoprecipitated V5-PRMT5 proteins (WT and mutants) in the presence of [methyl-^{3}H] SAM. Reaction products were analyzed by SDS-PAGE followed by fluorography (left panel). 1/20th of the IP was analyzed for V5-PRMT5 expression and proteins expression was verified by western blotting (right panel).

(B) Interactions of both WT and T139/144A PRMT5 with known partners were assessed by immunoprecipitation in MCF-7 cell extracts overexpressing the tagged proteins, using an anti-V5 antibody. The bound proteins were verified by western blotting using the corresponding antibodies (left panel). The IP control was analyzed for V5-PRMT5 expression and proteins expression was verified by western blotting (right panel).

(C) HeLa cells were transfected with pSG5Flag-LKB1 and pSG5Flag-LKB1 K78A for 48 hr. Cell extracts were immunoprecipitated with an anti-PRMT5 antibody followed by *in vitro* methylation experiment as described previously (left panel). 1/20th of the IP were analyzed for PRMT5 expression and LKB1 expression control was checked by western blotting with an anti-Flag antibody on the right panel. Quantification of the immunoprecipitated PRMT5 activity was performed by computer-assisted analysis (lower panel).

(D) MCF-7 cells were transfected with siScramble or different siRNA targeting LKB1 for 48 hr. Cell extracts were immunoprecipitated with an anti-PRMT5 antibody followed by an *in vitro* methylation experiment as described in 5A. $1/20^{th}$ of the IP were analyzed for PRMT5 expression (lower panel). Quantification of the immunoprecipitated PRMT5 activity was performed by computer-assisted analysis (right panel).

(E) MCF-7 cells were transfected with siScramble or different siRNA targeting LKB1 for 48 hr. Cell pellets were collected and treated for total cell lysis as described in the methods section. Resulting extracts were analyzed by western blotting using anti-Histone H3 and anti-Histone H3 symmetric dimethyl R2 antibodies (left panel). Quantification of the Histone H3R2 symmetric diméthylation, reflecting PRMT5 endogenous activity, was performed by computer-assisted analysis (right panel).

Figure 6: Model for PRMT5's regulation by LKB1

(A) In normal conditions, PRMT5 interacts with MEP50, RiOK1 and pICLn to methylate nucleolin, histones and Sm proteins. T139 and T144 are important residues for these interactions, as when they are mutated to alanine residues, PRMT5 does not bind anymore to its partners and loses its capacity to methylate substrates.

(B) In the presence of LKB1, PRMT5 is phosphorylated on T139 and T144 residues, leading thereby to a decrease of its catalytic activity, due to a loss of its interaction with its partners.

Reference List

(1) Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. Mol Cell 2009 Jan 16;33(1):1-13.

(2) Branscombe TL, Frankel A, Lee JH, Cook JR, Yang Z, Pestka S, Clarke S. PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. J Biol Chem 2001 Aug 31;276(35):32971-6.

(3) Pollack BP, Kotenko SV, He W, Izotova LS, Barnoski BL, Pestka S. The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. J Biol Chem 1999 Oct 29;274(44):31531-42.

(4) Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sif S. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. Mol Cell Biol 2004 Nov;24(21):9630-45.

(5) Chen H, Lorton B, Gupta V, Shechter D. A TGFbeta-PRMT5-MEP50 axis regulates cancer cell invasion through histone H3 and H4 arginine methylation coupled transcriptional activation and repression. Oncogene 2017 Jan 19;36(3):373-86.

(6) Migliori V, Muller J, Phalke S, Low D, Bezzi M, Mok WC, Sahu SK, Gunaratne J, Capasso P, Bassi C, Cecatiello V, De MA, et al. Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance. Nat Struct Mol Biol 2012 Jan 8;19(2):136-44.

(7) Wei H, Wang B, Miyagi M, She Y, Gopalan B, Huang DB, Ghosh G, Stark GR, Lu T. PRMT5 dimethylates R30 of the p65 subunit to activate NF-kappaB. Proc Natl Acad Sci U S A 2013 Aug 13;110(33):13516-21.

(8) Jansson M, Durant ST, Cho EC, Sheahan S, Edelmann M, Kessler B, La Thangue NB. Arginine methylation regulates the p53 response. Nat Cell Biol 2008 Dec;10(12):1431-9.

(9) Zheng S, Moehlenbrink J, Lu YC, Zalmas LP, Sagum CA, Carr S, McGouran JF, Alexander L, Fedorov O, Munro S, Kessler B, Bedford MT, et al. Arginine methylation-dependent reader-writer interplay governs growth control by E2F-1. Mol Cell 2013 Oct 10;52(1):37-51.

(10) Meister G, Eggert C, Buhler D, Brahms H, Kambach C, Fischer U. Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. Curr Biol 2001 Dec 11;11(24):1990-4.

(11) Friesen WJ, Wyce A, Paushkin S, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. J Biol Chem 2002 Mar 8;277(10):8243-7.

(12) Ho MC, Wilczek C, Bonanno JB, Xing L, Seznec J, Matsui T, Carter LG, Onikubo T, Kumar PR, Chan MK, Brenowitz M, Cheng RH, et al. Structure of the arginine

methyltransferase PRMT5-MEP50 reveals a mechanism for substrate specificity. PLoS One 2013;8(2):e57008.

(13) Guderian G, Peter C, Wiesner J, Sickmann A, Schulze-Osthoff K, Fischer U, Grimmler M. RioK1, a new interactor of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5), competes with pICln for binding and modulates PRMT5 complex composition and substrate specificity. J Biol Chem 2011 Jan 21;286(3):1976-86.

(14) Gurung B, Hua X. Menin/PRMT5/hedgehog signaling: a potential target for the treatment of multiple endocrine neoplasia type 1 tumors. Epigenomics 2013;5(5):469-71.

(15) Antonysamy S, Bonday Z, Campbell RM, Doyle B, Druzina Z, Gheyi T, Han B, Jungheim LN, Qian Y, Rauch C, Russell M, Sauder JM, et al. Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex. Proc Natl Acad Sci U S A 2012 Oct 30;109(44):17960-5.

(16) Liu F, Zhao X, Perna F, Wang L, Koppikar P, Abdel-Wahab O, Harr MW, Levine RL, Xu H, Tefferi A, Deblasio A, Hatlen M, et al. JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. Cancer Cell 2011 Feb 15;19(2):283-94.

(17) Aggarwal P, Vaites LP, Kim JK, Mellert H, Gurung B, Nakagawa H, Herlyn M, Hua X, Rustgi AK, McMahon SB, Diehl JA. Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase. Cancer Cell 2010 Oct 19;18(4):329-40.

(18) Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal 2013 Apr 2;6(269):l1.

(19) Bao X, Zhao S, Liu T, Liu Y, Liu Y, Yang X. Overexpression of PRMT5 promotes tumor cell growth and is associated with poor disease prognosis in epithelial ovarian cancer. J Histochem Cytochem 2013 Mar;61(3):206-17.

(20) Gyorffy B, Surowiak P, Budczies J, Lanczky A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. PLoS One 2013;8(12):e82241.

(21) Wei TY, Juan CC, Hisa JY, Su LJ, Lee YC, Chou HY, Chen JM, Wu YC, Chiu SC, Hsu CP, Liu KL, Yu CT. Protein arginine methyltransferase 5 is a potential oncoprotein that upregulates G1 cyclins/cyclin-dependent kinases and the phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling cascade. Cancer Sci 2012 Sep;103(9):1640-50.

(22) Scoumanne A, Zhang J, Chen X. PRMT5 is required for cell-cycle progression and p53 tumor suppressor function. Nucleic Acids Res 2009 Aug;37(15):4965-76.

(23) Chan-Penebre E, Kuplast KG, Majer CR, Boriack-Sjodin PA, Wigle TJ, Johnston LD, Rioux N, Munchhof MJ, Jin L, Jacques SL, West KA, Lingaraj T, et al. A selective

inhibitor of PRMT5 with in vivo and in vitro potency in MCL models. Nat Chem Biol 2015 Jun;11(6):432-7.

(24) Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. LKB1-dependent signaling pathways. Annu Rev Biochem 2006;75:137-63.

(25) Forcet C, Billaud M. Dialogue between LKB1 and AMPK: a hot topic at the cellular pole. Sci STKE 2007 Sep 18;2007(404):e51.

(26) Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. Cancer Cell 2004 Jul;6(1):91-9.

(27) Bouchekioua-Bouzaghou K, Poulard C, Rambaud J, Lavergne E, Hussein N, Billaud M, Bachelot T, Chabaud S, Mader S, Dayan G, Treilleux I, Corbo L, et al. LKB1 when associated with methylatedERalpha is a marker of bad prognosis in breast cancer. Int J Cancer 2014 Sep 15;135(6):1307-18.

(28) Gu Z, Zhou L, Gao S, Wang Z. Nuclear transport signals control cellular localization and function of androgen receptor cofactor p44/WDR77. PLoS One 2011;6(7):e22395.

(29) Liang JJ, Wang Z, Chiriboga L, Greco MA, Shapiro E, Huang H, Yang XJ, Huang J, Peng Y, Melamed J, Garabedian MJ, Lee P. The expression and function of androgen receptor coactivator p44 and protein arginine methyltransferase 5 in the developing testis and testicular tumors. J Urol 2007 May;177(5):1918-22.

(30) Wu Y, Wang Z, Zhang J, Ling R. Elevated expression of protein arginine methyltransferase 5 predicts the poor prognosis of breast cancer. Tumour Biol 2017 Apr;39(4):1010428317695917.

(31) Yang F, Wang J, Ren HY, Jin J, Wang AL, Sun LL, Diao KX, Wang EH, Mi XY. Proliferative role of TRAF4 in breast cancer by upregulating PRMT5 nuclear expression. Tumour Biol 2015 Aug;36(8):5901-11.

(32) Espejo AB, Gao G, Black K, Gayatri S, Veland N, Kim J, Chen T, Sudol M, Walker C, Bedford MT. PRMT5 C-terminal Phosphorylation Modulates a 14-3-3/PDZ Interaction Switch. J Biol Chem 2017 Feb 10;292(6):2255-65.

(33) Stopa N, Krebs JE, Shechter D. The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond. Cell Mol Life Sci 2015 Jun;72(11):2041-59.

(34) Pesiridis GS, Diamond E, Van Duyne GD. Role of pICLn in methylation of Sm proteins by PRMT5. J Biol Chem 2009 Aug 7;284(32):21347-59.

Supplementary Data

Table S1. Sequences of primers used to clone different PRMT5 domains

Protein Domain	Primer's Type	Sequence (5'-3')
PRMT5 D1	Forward	GGATCCatggcggcgatggcggtcggggg
	Reversed	CTCGAGagtgtggatgtggttggtcaaaac
PRMT5 D2	Forward	GGATCCggccatcactcttccatgttctgg
	Reversed	CTCGAGgcttaagtattccaggtattggagg
PRMT5 D3	Forward	GGATCCcagaaccgtcctccacctaatgcc
	Reversed	CTCGAGatcatcttttaggaagtgctgggc
PRMT5 D4	Forward	GGATCCggtgtgagcatccccggggagtac
	Reversed	CTCGAGgaggccaatggtatatgagcggcc
PRMT5 D1a	Reversed	CTCGAGtcccacaattagcgtattccagtc
PRMT5 D1b	Forward	GGATCCaagctttctccatggattcgtcc

Table S2. Protein sequences of PRMT5 mutants

PRMT5 Mutants	Mutated Sequence
T132A	…QEDN**A**NLARVLTNHIHT…
T139A	…QEDNTNLARVL**A**NHIHT…
T144A	…QEDNTNLARVLTNHIH**A**…
T132/144A	…QEDN**A**NLARVLTNHIH**A**…
T139/144A	…QEDNTNLARVL**A**NHIH**A**…

Table S3. siRNA targeted sequences

siRNA	Sequence (5'-3')
siPRMT5-2 s	CACAGUACUACAUGGCUUU[dT][dT]
siPRMT5-2 as	AAAGCCAUGUAGUACUGUG[dT][dT]
siMEP50.1 s	CUCCUUACCAUUAAACUGA[dT][dT]
siMEP50.1 as	UCAGUUUAAUGGUAAGGAG[dT][dT]
siLKB1 E2	CGAAGAGAAGCAGAAAAUGU[dT][dT]
siLKB1 E4	AAGGACAUCAAGCCGGGGAAC[dT][dT]
siLKB1 E14	GAGGAGGUUACGGCACAAAAA[dT][dT]

Table S4. Sample description: Distribution of clinical parameters.

Clinical parameters were analyzed for the 440 patients included in the TMA study.

Characteristic		Number	Percent
Age group	*≤ 50 years*	113	26.1%
	>50 years	320	73.9%
Menopausal status	*Premenopausal*	121	28.5%
	Post-menopausal	303	71.5%
	Unknown	9	
BMI	*≤ 25 kg/m^2*	258	61.9%
	> 25 Kg/m^2	159	38.1%
		16	
Tumor size	*≤2cm*	252	58.2%
	>2cm	181	41.8%
Axillary LN metastasis	*No*	184	42.5%
	Yes	249	57.5%
SBR grade	*I*	82	18.9%
	II	207	47.8%
	III	144	33.3%
ER status	*Negative*	56	12.9%
	Positive	377	87.1%
PR status	*Negative*	109	25.2%
	Positive	324	74.8%
HER2 status	*Negative*	397	92.8%
	Positive	31	7.2%
	Missing	5	
Breast cancer subtype	*Luminal A*	243	56.1%
	Luminal B	134	30.9%
	HER2 enriched	11	4.6%
	TNBC	45	10.4%
Adjuvant hormonal regimen	*Tamoxifen*	173	46.6%
	Tam-AI	198	53.4%
	Missing	62	
Nuclear PRMT5 expression	*Low (H score ≤ 70)*	141	36.2%
	High (H score >70)	249	63.8%

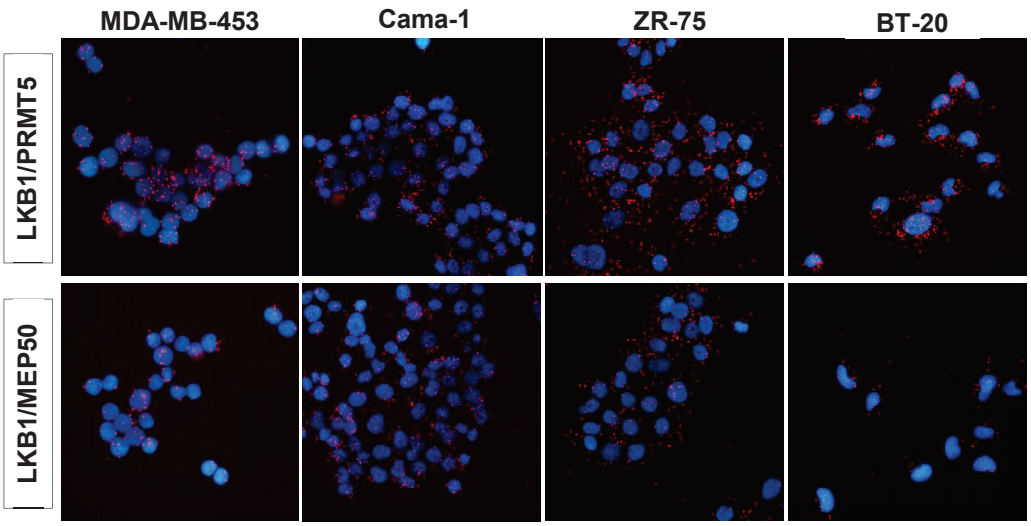


Figure S1: LKB1 interacts with PRMT5 and MEP50 in several mammary cell lines.

In situ PLA for LKB1/PRMT5 and LKB1/MEP50 dimers were performed in MDA-MB-453, Cama-1, ZR-75 and BT-20 cells using LKB1, PRMT5 and MEP50 antibodies. The represented dimers are visualized as red dots. The nuclei were counterstained with mounting medium containing DAPI (blue) (Obj: X60).

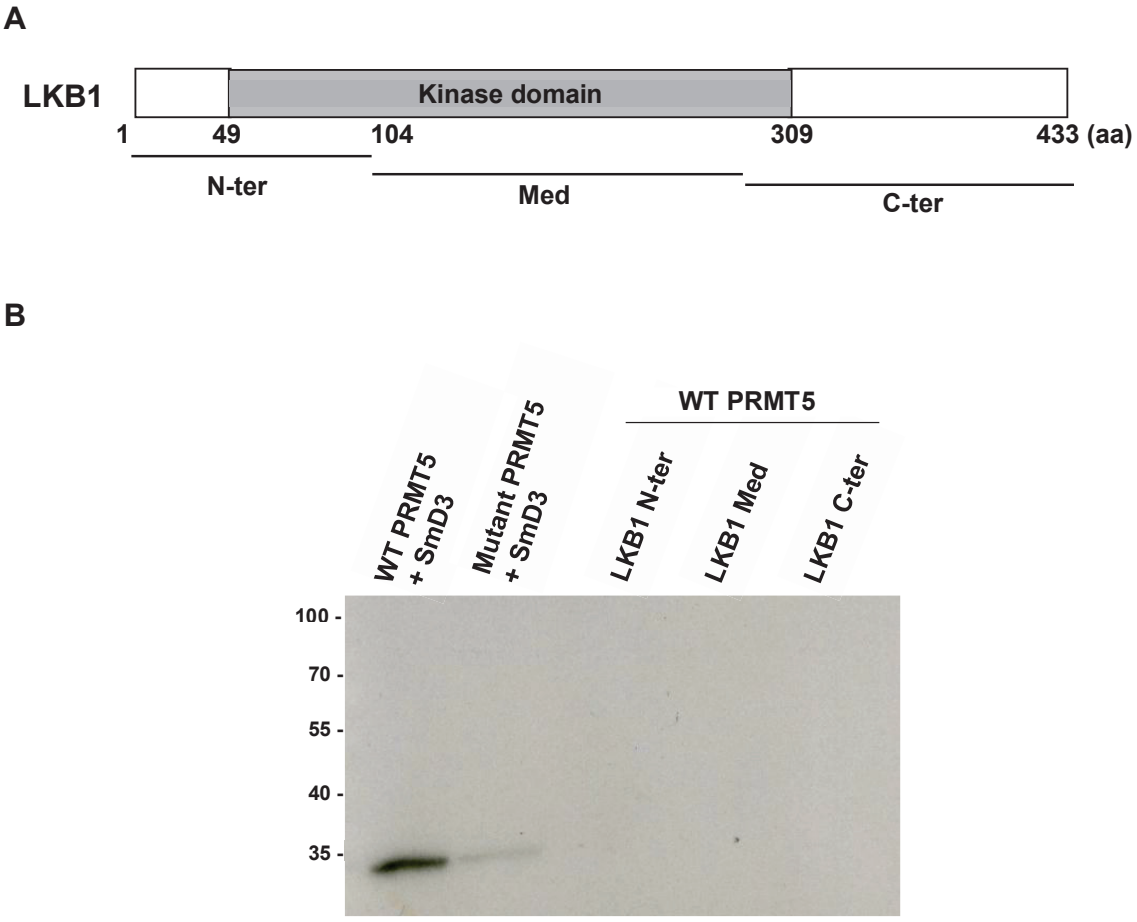


Figure S2: LKB1 is not methylated by PRMT5.

(A) The domains of LKB1 are presented.

(B) *In vitro* methylation of LKB1 was performed by incubating purified LKB1 fragments with immunoprecipitated V5-PRMT5 in the presence of [methyl-^{3}H] SAM. SmD3 was used as a positive control. Mutant PRMT5 was used as a negative control. Reaction products were analyzed by SDS-PAGE followed by fluorography.

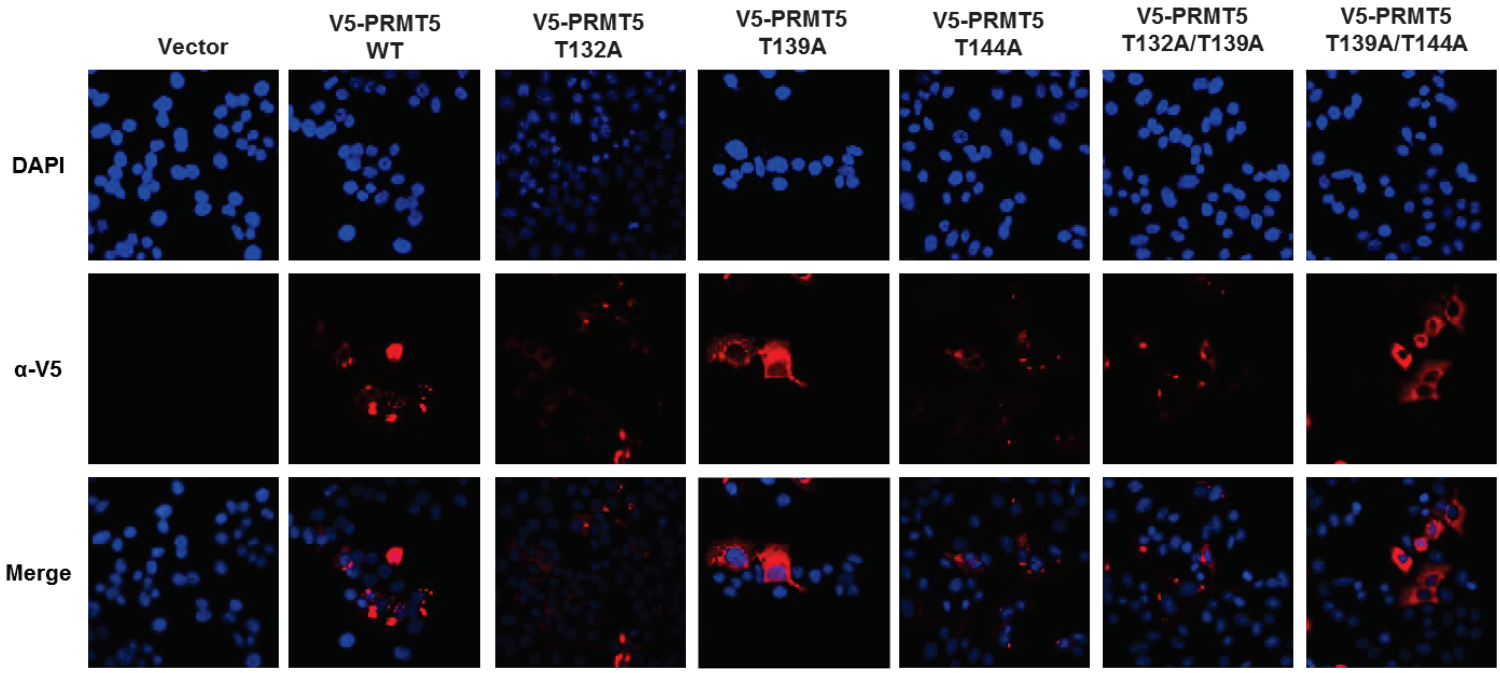


Figure S3: Study of the localization of PRMT5 mutants.

MCF-7 cells were transfected with pcDNA3.1 vector or with V5-tagged PRMT5 WT and mutants for 48 hr, then fixed and stained with an anti-V5 antibody (red; middle panel). The nuclei were counterstained with mounting medium containing DAPI (blue; upper panel) (Obj: X60).

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Dans le cadre de notre étude du profil des partenaires de PRMT5, Thierry Dubois de l'Institut Curie (Paris) a étudié les partenaires de MEP50 par spectrométrie de masse. Il n'a pas identifié LKB1, mais plutôt la protéine LIP1 (LKB1-interacting protein1). Cette dernière est connue par son interaction spécifique avec LKB1 dans les cellules des mammifères et elle intervient comme intermédiaire pour la lier à SMAD4. Il en résulte la phosphorylation de SMAD4 ce qui inhibe ainsi la transcription des gènes qu'elle régule, notamment ceux impliqués dans l'EMT (Morén et al., 2011).

Nous avons confirmé l'interaction entre l'arginine méthyltransférase PRMT5 et LIP1 *in cellulo*, dans la lignée MCF-7 (**Figure 12**). L'invalidation de l'expression de PRMT5 induit une diminution significative de l'interaction avec LIP1, témoignant ainsi de sa spécificité.

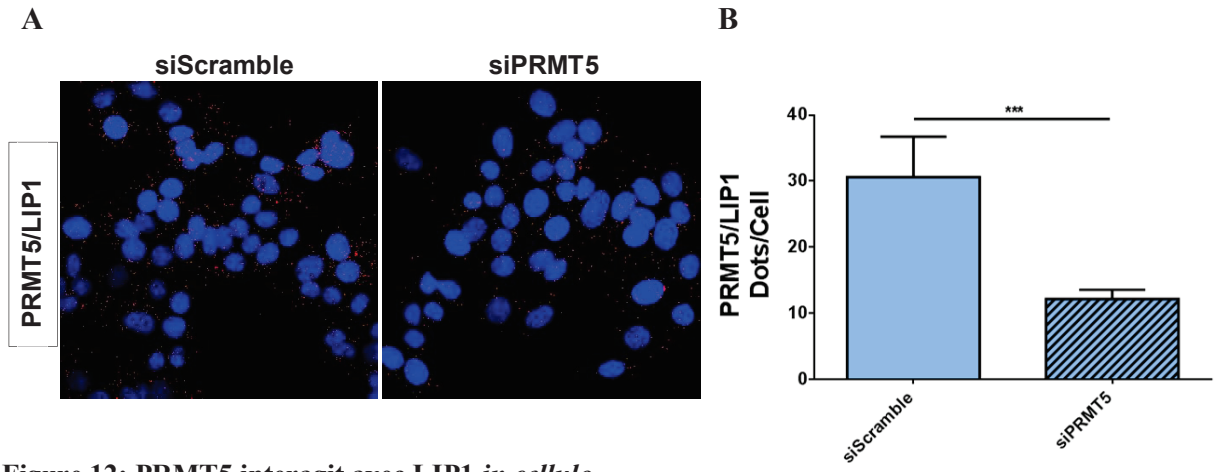


Figure 12: PRMT5 interagit avec LIP1 *in cellulo*.
(A) L'interaction de PRMT5 avec LIP1 est détectée par PLA. Les cellules MCF-7 sont transfectées par un siARN ciblant PRMT5 ou un siARN contrôle. Apres fixation, le PLA a permis d'évaluer l'interaction PRMT5/LIP1 en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre ces deux protéines. Les dimères détectés sont représentés par des points rouges. Quant aux noyaux, ils sont visualisés en bleu suite à une coloration par le DAPI (Obj : X60).
(B) La quantification du nombre de points par cellule est effectuée par une analyse informatique. Le graphe correspondant montre la moyenne de trois expériences. La significativité des résultats (*P*) est vérifiée par le t-test. *** indique une valeur de $P<0,001$.

Afin d'étudier si la régulation de PRMT5 par LKB1 affecte son interaction avec LIP1, nous avons transfecté les cellules MCF-7 avec un siLKB1, suivi d'une immunoprécipitation de PRMT5 après extraction protéique. Les résultats montrent que l'absence de LKB1 abolit l'interaction qui a lieu entre PRMT5 et LIP1 par rapport au contrôle (**Figure 13**). Ceci reflète le rôle clé de LKB1 dans le maintien de l'interaction entre ces deux protéines.

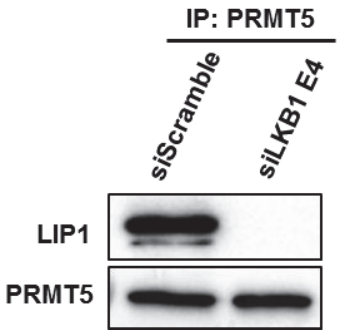


Figure 13: LKB1 est essentielle pour l'interaction entre PRMT5 et LIP1.
L'interaction entre PRMT5 et LIP1 est étudiée par immunoprécipitation de la protéine PRMT5 dans des extraits de cellules MCF-7 invalidées pour LKB1. Les protéines ainsi liées sont analysées par western blot avec un anticorps spécifique dirigé contre LIP1. Le contrôle de l'immunoprécipitation est vérifié par l'anticorps anti-PRMT5.

DISCUSSION

PRMT5 est la majeure arginine méthyltransférase de type II chez les mammifères. Elle est surexprimée dans de nombreux cancers tel que le cancer de l'ovaire, des poumons, du colon, des cellules germinales, etc. Nous avons étudié son profil d'expression dans une cohorte de 440 tumeurs de cancer du sein, suffisamment large pour nous permettre d'établir de robustes corrélations statistiques entre PRMT5 et des facteurs pronostiques connus du cancer du sein. Nous avons mis en évidence la double localisation de PRMT5 dans le noyau et le cytoplasme des cellules tumorales. Ces résultats montrent une concordance avec ceux rapportés dans des études précédentes comme celle effectuée par Bao et al. dans le cadre du cancer ovarien (Bao et al., 2013) et celle entamée par Yang et al. sur le cancer du sein (Yang et al., 2015). En effet, Bao et al. ont détecté PRMT5 dans le noyau et le cytoplasme des cellules de la cohorte qu'ils ont étudiée avec une prédominance nucléaire alors que Yang et al. ont repéré la double localisation de PRMT5 accompagnée d'une prédominance cytoplasmique par rapport à la fraction nucléaire. Cependant, les études antérieures prenaient en considération l'expression totale de PRMT5 et/ou l'expression de son messager pour établir les corrélations avec les paramètres cliniques sans discrimination compartimentale ; elles témoignaient du mauvais pronostic de PRMT5 surexprimée et de son association avec une faible survie globale des patientes (Kanda et al., 2016; Wu et al., 2017). Quant aux analyses statistiques de nos données cliniques, elles ont montré que la forte expression de PRMT5 dans le noyau est associée à une bonne valeur pronostique. De plus, la classification des tumeurs de cette cohorte en sous-groupes a permis d'associer l'expression nucléaire de PRMT5 avec l'expression nucléaire de LKB1 chez les patientes et avec une meilleure survie globale et survie sans rechute. Cela conforte les résultats de l'équipe montrant l'association de la fraction nucléaire de cette kinase avec une meilleure survie globale et survie sans rechute des patientes de cancer du sein (Bouchekioua-Bouzaghou et al., 2014).

Nos approches *in vitro* et *in cellulo* ont mis en évidence l'interaction de LKB1, non seulement avec PRMT5, mais aussi avec son cofacteur MEP50. La présence de ce dernier pourrait renforcer l'idée d'une interaction entre l'arginine méthyltransférase et la kinase LKB1. L'interaction détectée est bien spécifique étant donné que l'invalidation cellulaire de l'un des

partenaires aboutit à sa diminution significative. Malheureusement, le screening des différentes lignées à notre disposition a montré une interaction protéique plutôt cytoplasmique que nucléaire. Ceci pourrait soit refléter la nécessité des stimuli particuliers pour déclencher l'interaction entre PRMT5 et LKB1 dans le noyau soit témoigner du caractère transitoire de l'interaction nucléaire dans le contexte de nos conditions expérimentales, ce qui rend sa détection difficile. Nos observations ont limité alors notre recherche du modèle cellulaire désiré ainsi que notre étude sur les conséquences de l'interaction nucléaire au niveau cellulaire, en orientant en parallèle l'intérêt vers l'interaction cytoplasmique à notre disposition.

Des études antérieures ont montré que la phosphorylation de PRMT5 se limite à des résidus tyrosines en N-terminal par action des kinases JAK2V617F et JAK2K539L (Antonysamy et al., 2012; Liu et al., 2011) et à une thréonine en C-terminal suite à l'action d'Akt et des SGKs (Espejo et al., 2017). Il en résulte ainsi dans le premier cas une altération de l'interaction de PRMT5 avec MEP50 réduisant ainsi son activité catalytique. Quant au deuxième cas, une régulation de l'interaction de PRMT5 avec la protéine 14-3-3 est notée, favorisant la séquestration de l'arginine méthyltransférase dans le cytoplasme et l'empêchant de méthyler ses substrats nucléaires. Notre étude a démontré que PRMT5 est un substrat de LKB1 la phosphorylant au niveau de son extrémité N-terminale. Dans ce contexte, nous avons identifié 3 résidus Thr (Thr132, 139 et 144) cibles de cette modification post-traductionnelle. A notre connaissance, aucune phosphorylation sur ces résidus n'est rapportée dans la littérature. Nos découvertes permettent donc de mettre en avant de nouvelles modifications post-traductionnelles de PRMT5 ouvrant ainsi un large champ de régulation de cette protéine, ce qui peut altérer son interaction avec ses partenaires et/ou modifier son activité catalytique. En effet, nous avons démontré d'une part que l'interaction entre LKB1 et PRMT5 a lieu en majorité avec le domaine D3 qui lie le groupement méthyle (SAM), renforçant ainsi l'idée de la régulation de l'activité catalytique de PRMT5. D'autre part, les résidus thréonines comme cible de la phosphorylation sont localisés au niveau du domaine tonneau TIM de PRMT5. Ce domaine est connu par son implication dans la dimérisation de PRMT5 lors de la formation de l'hétéromère actif et dans son interaction avec ses partenaires. Ainsi, toute modification post-traductionnelle qui le touche pourrait perturber l'activité méthyltransférase de l'enzyme et changer par la suite les voies de signalisation en aval. Pourtant, étant donné que le domaine D1a de PRMT5 montre un très faible niveau de phosphorylation par rapport à D1b et comme LKB1 est une sérine thréonine kinase,

nos découvertes n'excluent pas la possibilité que d'autres sites sérines et thréonines soient phosphorylés. De plus, nous pouvons émettre l'hypothèse que LKB1 phosphoryle MEP50, cofacteur essentiel de PRMT5. Ceci offre ainsi une autre piste de régulation pour des études ultérieures du lien fonctionnel que nous avons mis en évidence.

LKB1 régule l'activité méthyltransférase de PRMT5 dans les cellules en la phosphorylant. En effet, la surexpression de LKB1 dans les cellules HeLa induit une diminution de l'activité catalytique de PRMT5 détectée par la méthylation de son substrat SmD3. Ce résultat est indépendant du substrat étudié étant donné que la même diminution est aussi obtenue avec l'histone H4 (résultat non présente). L'effet observé est bien lié à l'activité kinase de LKB1 vue que la surexpression de son mutant catalytiquement inactif (LKB1 K78A) rétablit le taux basal de méthylation par PRMT5. Ces résultats renforcent l'idée du rôle inhibiteur de la phosphorylation par LKB1 sur l'activité catalytique de PRMT5. Ceci est confirmé par l'invalidation de LKB1 dans les cellules MCF-7, ce qui induit une augmentation de l'activité catalytique de PRMT5 par rapport au contrôle. En outre, la surexpression des protéines PRMT5, dont les thréonines identifiées sont mutées, dans les lignées MCF-7 exprimant LKB1 démontre que la dimérisation protéique n'est pas affectée. Cependant, la mutation simultanée des Thr139 et Thr144, cibles de la phosphorylation, abolie complètement l'activité catalytique de PRMT5 accompagnée d'une perte de son interaction avec RiOK1 et une diminution de son interaction avec MEP50 et pICLn. Nous prouvons ainsi que ces deux thréonines interviennent directement dans la régulation de l'activité méthyltransférase de PRMT5 par LKB1 car elles sont indispensables pour son interaction avec des partenaires clés pour son activité et sa spécificité envers ses substrats. De plus, ce qui est intéressant dans le profil des interactants de PRMT5 T139A/144A est la perte totale de LKB1 par rapport à PRMT5 sauvage, ce qui pourrait refléter l'importance de ses deux thréonines dans la stabilisation de l'interaction entre LKB1 et PRMT5. Cette dernière observation nous fait penser à la possibilité que la phosphorylation de ces deux thréonines constitue un « docking site » pour LKB1 : elle stabilise ainsi son interaction avec le domaine D3 de PRMT5 et lui permet par la suite d'inhiber son activité méthyltransférase en modulant son interaction avec ses partenaires. Une fois les thréonines mutées, l'interaction de LKB1 avec PRMT5 n'est plus renforcée ou stabilisée par les phosphorylations, se traduisant alors par une perte de l'interaction entre les deux protéines.

Dans notre étude, nous avons démontré que PRMT5 interagit avec LKB1 et LIP1 et que sa phosphorylation par LKB1 inhibe son activité catalytique. Ces observations suggèrent que les évènements détectés pourraient jouer un rôle dans la voie du TGFβ. En effet, Morén et al. ont démontré l'intervention de LIP1 comme intermédiaire entre LKB1 et SMAD4 dans la signalisation du TGFβ (Morén et al., 2011). Il en résulte ainsi la phosphorylation du SMAD4 par LKB1 ce qui empêche l'activation transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'EMT. D'autre part, Chen et al. ont rapporté l'implication du complexe PRMT5/MEP50 dans la voie du TGFβ, lui permettant de médier l'EMT *via* la régulation de la transcription des gènes cibles (Chen et al., 2017). Ainsi, l'association des résultats rapportés avec les nôtres pourrait témoigner de la présence d'un nouveau mécanisme de régulation de l'EMT. Ceci nous permet de proposer un nouveau modèle d'inhibition de la signalisation du TGFβ, dans lequel LKB1 phosphoryle les deux protéines SMAD4 et PRMT5, inhibant ainsi l'activation de l'EMT par deux voies distinctes (**Figure 14**).

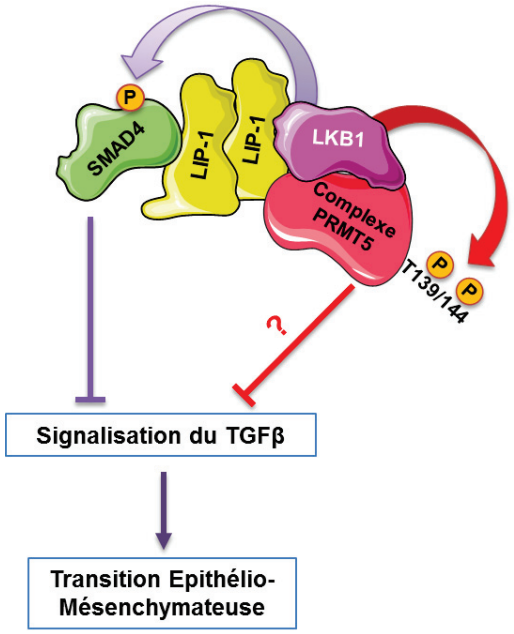


Figure 14: Modèle proposé pour la régulation de la voie TGFβ par LKB1.

L'impact des données de notre étude est limité par l'absence de validation sur des modèles cellulaires et sur le plan clinique. Ces obstacles sont principalement dus au manque d'outils expérimentaux adaptés permettant la confirmation du lien fonctionnel entre PRMT5 et LKB1 *in cellulo* ainsi qu'au niveau des tumeurs mammaires. D'une part, la présence de plusieurs sites cibles de la phosphorylation par LKB1 a rendu difficile le développement d'anticorps dirigés contre les thréonines modifiées. Ces anticorps pourraient nous permettre de valider la phosphorylation de PRMT5 et de la caractériser dans les cellules et les tumeurs. De plus, ils seraient bénéfiques pour établir des corrélations entre cette modification post-traductionnelle et les données de survie des patientes. D'autre part, l'absence de modèle cellulaire approprié a compliqué nos efforts pour rapporter, à l'échelle cellulaire, la corrélation entre l'expression nucléaire de PRMT5 et celle de LKB1 au niveau tumoral. Cette approche pourrait nous permettre d'investiguer les conséquences fonctionnelles de cette corrélation au niveau de la cellule tumorale ainsi que les voies de signalisation mises en jeu.

CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a étudié l'expression de PRMT5 dans le cancer du sein et a démontré la bonne valeur pronostique de son expression nucléaire dans une cohorte de 440 tumeurs mammaires, notamment au niveau des tumeurs ERα-positives. Il a permis aussi d'identifier sa corrélation avec la fraction nucléaire de la kinase LKB1. Nos résultats ont contribué à une meilleure compréhension de l'association de ces deux protéines et du lien qui les lie. En effet, nous avons mis en évidence leur interaction physique *in vitro* et *in cellulo* aboutissant à la phosphorylation de PRMT5 en N-terminal, au niveau de trois résidus thréonines. Parmi ces derniers, les Thr139 et 144 sont essentielles pour l'activité catalytique de PRMT5 et son interaction avec ses partenaires. Une fois phosphorylés par LKB1, ils stabilisent l'interaction de cette kinase avec PRMT5, ce qui lui permet d'inhiber son activité méthyltransférase en altérant son association avec des partenaires indispensables à la méthylation de ses substrats.

En conclusion, nous avons identifié un nouveau partenaire de PRMT5 régulant son activité enzymatique. Nous pouvons suggérer ainsi que, dans les tumeurs mammaires, LKB1 pourrait maintenir un faible niveau d'activité de PRMT5.

Afin d'élucider le mécanisme de régulation de PRMT5 par LKB1, plusieurs approches supplémentaires sont nécessaires.

Dans ce contexte, il serait intéressant de générer un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de PRMT5, ciblant à la fois les deux thréonines T139 et T144 en N-terminal. Cet anticorps serait un vrai outil puissant pour l'étude du lien fonctionnel entre la kinase et l'arginine méthyltransférase *in cellulo* et sur le plan clinique.

De plus, ce travail sera complété par une étude approfondie de l'interaction entre LKB1 et MEP50 dans le complexe identifié. Des approches de phosphorylation *in vitro* sont nécessaires pour vérifier si LKB1 phosphoryle MEP50. En cas d'affirmation, des réactions de mutagenèses dirigées permettront d'identifier les résidus phosphorylés afin d'élucider les conséquences qui en résultent sur l'activité du complexe actif PRMT5/MEP50 ainsi que les voies de signalisation en aval.

Dans le cadre de la régulation de l'EMT par LKB1, il est indispensable d'investiguer la validité du modèle que nous avons proposé (**Figure 14**) et qui met en jeu l'implication de

PRMT5 dans le même complexe régulateur renfermant LKB1 et LIP1. Ceci nécessite l'étude du profil de méthylation des histones, surtout celles des gènes spécifiques à l'EMT, en présence de la forme mutée de PRMT5 pour les sites T139/144, sous traitement par TGFβ. En parallèle, elle sera complétée par l'étude de l'expression des marqueurs caractéristiques du caractère épithélial et/ou mésenchymateux dans les mêmes conditions expérimentales ; parmi ces marqueurs, on cite l'E-cadhérine, la vimentine, l'EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), etc…De plus, il est intéressant d'étudier l'effet de l'invalidation de LIP1 dans le modèle de régulation proposé sur l'activité méthyltransférase de PRMT5 et les conséquences qui en résultent au niveau cellulaire.

La bonne valeur pronostique de l'expression nucléaire de PRMT5 est notamment relevée dans les tumeurs ERα-positives, reflétant ainsi une certaine association entre PRMT5 et ERα. Des expériences primaires, effectuées *in vitro* dans ce contexte-là, ont donné des résultats prometteurs montrant l'interaction physique entre l'arginine méthyltransférase et le récepteur aux œstrogènes ERα. Les données obtenues constituent alors le départ d'un nouveau projet de recherche en cours, visant à étudier le lien entre ces deux protéines et son impact sur le cancer du sein au niveau cellulaire et clinique.

ANNEXE

Scientific Research Publishing

Journal of Cancer Therapy, 2016, 7, 680-699
http://www.scirp.org/journal/jct
ISSN Online: 2151-1942
ISSN Print: 2151-1934

LKB1, A New Biomarker in Breast Cancer

Hanine Lattouf[1,2,3,4], Coralie Poulard[5], Isabelle Treilleux[6], Nader Hussein[4], Mona Diab-Assaf[4], Muriel Le Romancer[1,2,3*]

[1]Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France
[2]CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France
[3]Université Lyon 1, Lyon, France
[4]Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Doctoral School of Sciences and Technologies, Lebanese University, Beirut, Lebanon
[5]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Comprehensive Cancer Center, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA
[6]Centre Léon Bérard, Pathology Department, Lyon, France
Email: *muriel.leromancer@lyon.unicancer.fr

How to cite this paper: Lattouf, H., Poulard, C., Treilleux, I., Hussein, N., Diab-Assaf, M. and Le Romancer, M. (2016) LKB1, A New Biomarker in Breast Cancer. *Journal of Cancer Therapy*, **7**, 680-699.
http://dx.doi.org/10.4236/jct.2016.710071

Received: June 13, 2016
Accepted: September 25, 2016
Published: September 28, 2016

Copyright © 2016 by authors and Scientific Research Publishing Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Open Access

Abstract

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. Estrogen signaling pathways have been identified as efficient targets of breast cancer therapy, given their key role in promoting breast tumor growth. Agents blocking estrogen-mediated pathways are routinely used in clinical applications in patients displaying estrogen-sensitive breast cancer subtypes; however intrinsic or acquired resistance to treatment often occurs or develops, thus limiting their efficacy. This limitation has highlighted an imperative need to identify new predictive biomarkers. Recent findings have highlighted a role for the Liver Kinase B1 (LKB1) in breast cancer tumorigenesis. LKB1 is a serine/threonine kinase mutated in Peutz-Jeghers syndrome (PJS), implicated in many cellular processes including energy metabolism, cell polarization and cell cycle arrest and has also been shown to play an essential role as a tumor suppressor gene by negatively regulating the mTOR pathway. This review provides an overview of previous findings and ongoing research on LKB1, and substantiates the use of this kinase as a potential prognostic and predictive biomarker of breast cancer.

Keywords

LKB1, Biomarker, Breast Cancer, Estrogen Signaling

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most common cancer in women worldwide. In 2012, breast cancer was reported to cause the death of more than 522,000 women by the International Agency for Research on Cancer. Siegel *et al.* found that BC accounts for 29% of

all new cancers in women in 2015 [1]. Estrogens stimulate the proliferation and the differentiation of breast epithelial cells through the activation of downstream mitogenic signaling pathways, namely *via* the estrogen receptors ERα and ERβ. These receptors function as ligand-dependent transcription factors [2]-[4], acting either through the transcriptional regulation of genes (genomic pathway) or through membrane and cytoplasmic signaling cascades (non-genomic pathway). Current BC treatment options exclusively target the genomic signaling pathway. Even though ERα is expressed at low levels in normal mammary cells [5], 70% of BC express high levels of ERα and are either treated by agents that suppress the function of the receptor (anti-estrogen) or the estrogen synthesis (aromatase inhibitors) [6].

Despite the fact that ERα is a standard predictive marker used to prescribe endocrine therapy, about 40% of these patients initially display or eventually become resistant to treatment [7] [8]. This represents a burden on public healthcare and a serious issue to be considered when designing the treatment plan of the patients, highlighting an urgent need to identify new predictive markers of therapeutic response, to ensure a better survival rate for the patients. Therefore, the identification of new actors of estrogen signaling pathways should improve treatment specificity and thus overcome cancer drug resistance. For instance, it has been extensively shown that the PI3K/Akt/mTOR pathway is frequently activated in BC, leading to the use of the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors, such as everolimus, in clinical trials [9] [10]. Although the latter has become a standard treatment in hormone-resistant BC, its use is accompanied with many side effects (stomatitis, rash, diarrhea, arthralgia/myalgia and anemia) and only 50% of patients respond to the treatment. LKB1 is a known regulator of both mTOR [11] [12] and estrogen signaling pathways [13] [14], and given its role in BC tumorigenesis [15], it may emerge as an attractive novel cancer biomarker.

2. Breast Cancer Subtypes and Therapies

Breast cancers can be classified into several subtypes based on their epidemiological risk factors, molecular markers and response to systemic and local therapies. Norum *et al*. presented an overview of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer, as well as their prognostic and therapeutic implications [16] summarized in the **Table 1.** The most common breast cancer subtype is the luminal A, with the best prognosis, a low grade and an increased survival rate compared to other subtypes. Luminal A tumors are characterized by an estrogen receptor-positive (ERα+), a progesterone receptor-positive (PR+) and a human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2−) profile. The luminal B cancer subtype shares some similarities with the luminal A subtype. It is also ERα- and/or PR-positive, HER2-negative and has a high level of Ki67 expression, reflecting a high number of proliferating cancer cells. Endocrine therapy is usually the recommended treatment for these subtypes. It entails either targeting the estrogen signaling pathway, using ERα-blocking drugs in premonopausal women, primarily the selective estrogen receptor modulator tamoxifen, or inhibiting estrogen synthesis, using aromatase inhibitors in postmenopausal women, such as exemestane and anastrozole,

Table 1. Breast cancer subtypes: molecular marks, clinical features, general treatment and prognosis.

Breast Cancer Subtypes		Molecular Marks	Prevalence (approximate)	Clinical Features	General Treatment	Prognosis
Luminal	A	ER+/PR+ HER2−	60%	Luminal A has lower histological grade than Luminal B	Endocrine Therapy (Tamoxifen, aromatase inhibitors, fulvestrant…)	Good prognosis
	B	ER+/PR+ HER2+ or HER2− with High Ki67			Chemotherapy mainly anthracyclines and taxanes. Endocrine Therapy	High risk of relapse
HER2-enriched		ER−/PR−/ HER2+	20%	High Grade with Lymph Node Positive	Trastuzumab Chemotherapy based on Anthracyclines	Fairly poor prognosis Early and Frequent recurrence and metastasis
Basal-Like		ER−/PR−/ HER2−	20%	Common in African-American Women. BRCA1 dysfunction	Platinum based-chemotherapy. PARP inhibitors	Aggressive with poor prognosis

in order to reduce estrogen levels [17].

The third subtype is known as the HER2-enriched subtype. It is generally negative for ER*α*/PR and positive for the HER2, with the amplification of the *HER2* gene leading to the protein over expression and, thereby, to an uncontrolled mammary cell growth and division. It is associated with a poor prognosis and HER2-enriched BC patients frequently develop metastases. These tumors are targeted by monoclonal antibodies, such as trastuzumab [18], and tyrosine kinase activity inhibitors, like lapatinib [19]. However, a more recent therapeutic strategy has been adopted, in which the specificity of monoclonal antibodies is combined with the efficacy of cytotoxic agents, such as the microtubule polymerization inhibitor called emtansine (DM1) [20]. Another monoclonal antibody targeting HER2, namely pertuzumab, has entered clinical trials. When combined to trastuzumab, this latter molecule significantly increases progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) of HER2-positive metastatic/advanced breast cancer patients [21] [22].

The final subtype contains tumors with a negative profile for ER*α*, PR and HER-2, also known as triple negative tumors, and constitutes the most aggressive cancer subtype, with the worst patient prognosis. So far, no specific targeted therapy has been established to cure these patients, but many drugs have been tested and the results were

compared to define an optimal therapy [23]. The authors showed that some new drugs are emerging as potential treatments, such as anti-androgens in patients with androgen receptor positive cancers, Src family kinase inhibitors in patients having mesenchymal-like cancer subtypes, PARP inhibitors and platinum agents in patients who have BRCA mutations [23].

Tinoco *et al.* reported that over the past two decades, breast cancer mortality rates have declined by approximately 30%, with corresponding improvements in the 5-year OS rate of patients of up to 90% [24]. However, all breast cancer therapies are eventually associated with treatment resistance, coupled with the activation of estrogen- independent growth and of survival signaling pathways. In addition, metastatic breast cancer remains incurable with an estimated 5-year OS rate of only 23% [24] [25]. Altogether these data present the current significant challenges encountered by researchers/clinicians and emphasize the need to identify new predictive biomarkers of the response of patients to treatment.

3. Estrogen Signaling in Breast Cancer

Estrogen is a member of the steroid hormones, which play important roles in cell proliferation and differentiation in many target tissues [26]. Estrogen exerts its effects by binding to its receptors ERα and ERβ, which belong to the nuclear receptor superfamily, leading to their activation. This, in turn, sequentially results in their conformational change, dimerization and their binding to specific estrogen response elements (EREs), which are located in the targeted gene promoter regions [27]. There, ERs recruit co-regulator complexes to modulate the transcriptional activity. This process is known as the estrogen genomic signaling pathway.

However, estrogen also exerts non-genomic activities in the cytoplasm, where it binds to cytoplasmic ERα, leading to its dimerization and subsequent interaction with phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and with the tyrosine kinase Src close to the plasma membrane (**Figure 1**). The formation of the complex results in the activation of downstream protein kinase cascades, particularly the Src/Ras/MAPK and the PI3K/Akt pathways [28] [29]. Le Romancer's group also showed that ERα is regulated by the protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1), through the methylation of Arg260 within the DNA binding domain [28]. Interestingly, they confirmed that this methylation is a prerequisite for the formation of the ERα non-genomic complex containing ERα/Src/PI3K (**Figure 1**). In a cohort of 175 patients with invasive breast tumors, it was shown that the interaction between ERα and PI3K/Src was correlated with ERα methylation and the downstream activation of Akt. Of note, the ERα/Src/PI3K complex is highly expressed in aggressive breast tumors, independently of ERα expression, and may, therefore, constitute an efficient target for the treatment of BC [30].

4. The Tumor Suppressor LKB1

4.1. History and Physiological Role

The *lkb1* gene, also called *STK11*, codes for a highly conserved serine/threonine kinase,

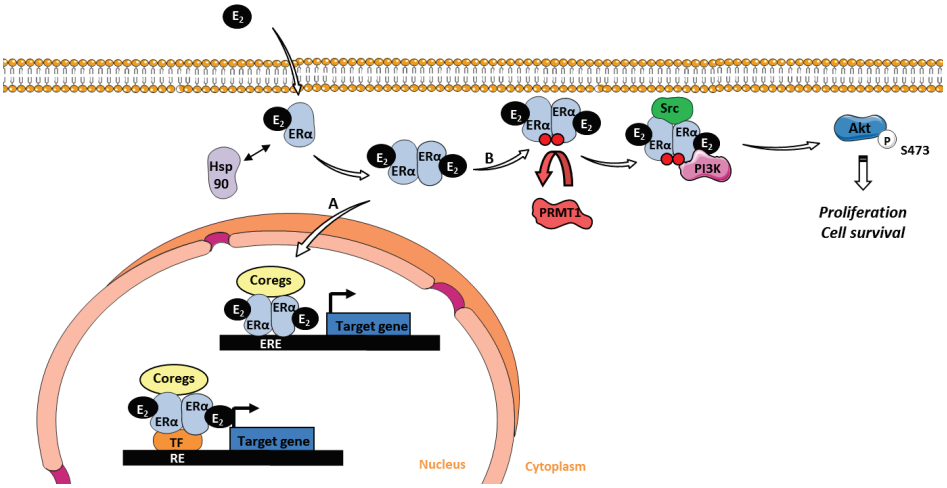


Figure 1. Estrogen signaling pathways. (A) Estrogen binds to its receptor ER*α* in the cytoplasm leading to its dimerization and its translocation into the nucleus to act through a genomic mechanism, where it binds directly on estrogen responsive elements (EREs) or indirectly *via* other transcription factors on responsive elements (RE), and initiate the transcription of target genes after recruitment of coregulator complexes. (B) Estrogen participates in the non-genomic pathway, in which the dimerized receptors stay in the cytoplasm where they are methylated by PRMT1 allowing it to form a complex with Src and PI3K, thus activating downstream Akt-dependent proliferation and cell survival pathways. E_2: 17 *β*-oestradiol; Hsp90: Heat shock protein 90; ER*α*: Estrogen receptor *α*; PRMT1: Protein arginine methyltransferase 1; Coregs: Coregulators; TF: Transcription factor; ERE: Estrogen response elements; RE: Response element; PI3K: Phosphatidylinositide 3-kinase.

which is mutated in patients suffering from Peutz-Jeghers syndrome (PJS), a dominant autosomal inherited syndrome. PJS is characterized by mucocutaneous pigmentations on the lips, finger tips and oral mucosa, in addition to the appearance of multiple gastro-intestinal hamartomatous polyps and an increased risk of developing various types of cancers, including BC (32% - 54%) [31] [32].

The human LKB1 consists of 433 amino acids, encompassing a nuclear localization signal (NLS) (38 - 43 aa) and a kinase domain (49 - 309 aa), which enables LKB1 to phosphorylate downstream kinases, such as the AMP-activated protein kinases AMPKs (**Figure 2**). LKB1 is ubiquitously expressed in fetal and adult tissues. During the developmental process, several organs display a predominant expression of LKB1 at the protein level, such as the heart, the lungs, the pancreas, the kidneys and gastrointestinal tract, while in adults, the highest levels of LKB1 protein expression are mostly found in epithelial tissues, as well as in the testes [33] [34]. Although a nuclear subcellular localization of LKB1 has principally been reported, LKB1 was also shown to have a cytoplasmic localization [31] [32] [35]. Since LKB1 lacks a nuclear export signal (NES), it interacts with two partners, the pseudokinase STE20-related adaptor (STRAD*α*), lacking several crucial residues for the intrinsic catalytic activity, and the mouse protein 25 (MO25). This allows LKB1 to translocate into the cytoplasm and phosphorylate its substrates [36] [37]. Indeed, the adaptor protein MO25 binds to STRAD*α*, thus forming a high-affinity ternary complex with LKB1 and driving the relocalization of nuclear LKB1

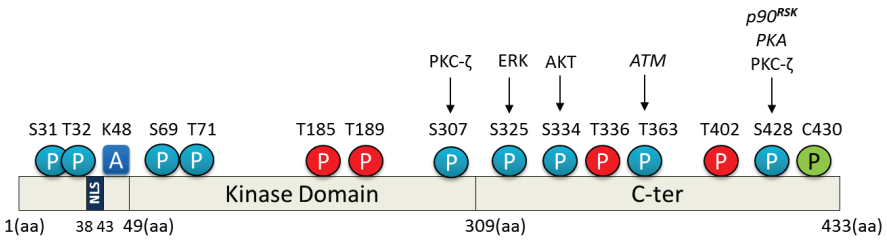


Figure 2. LKB1 post-translational modifications. Circles in red refer to autophosphorylation sites, blue circles reflect phosphorylation by other kinases and green circles symbolize prenylation sites. The dark blue square represents acetylation/deacetylation site.

into the cytoplasm. This event induces a 10-fold increase in the catalytic activity of this kinase toward its substrates [38].

Furthermore, the activation of LKB1 in unpolarized epithelial cells was demonstrated to trigger cell repolarization, confirming its crucial role in regulating cell polarity, and the concomitant remodeling of the act in cytoskeleton to gap junctions [39]-[42]. In addition, LKB1 is involved in metabolic pathways through the phosphorylation of AMPK, a key regulator of cellular metabolic/energy homeostasis. The latter process results in the inactivation of the mammalian target of rapamycin (mTOR), a crucial protein involved in the initiation of protein synthesis, cell proliferation and survival mechanisms, thus highlighting the role of LKB1 as a tumor suppressor [11] [12] [41] [43]. Loss of LKB1 leads to an increase in the mTOR signaling pathways, a mechanism modulated by an increased phosphorylation of its effectors, such as the translational regulator S6K1 and the eukaryote translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1).

LKB1 is also involved in DNA damage checkpoint regulation, in which cells lacking LKB1 accumulate more DNA-damage than control cells [44]. Induced expression of wild type LKB1 in G361 melanoma cells results in cell growth inhibition, reflecting its implication in cell growth arrest [45]. LKB1 is also involved in other signaling pathways, e.g. the TGF-β pathway, by interacting with the liver-enriched inhibitory protein (LIP-1), a novel leucine-rich repeat containing protein, in the cytoplasm [46]. Indeed, LKB1 forms a complex with LIP-1 and the transcription factor Smad-4, inhibiting the translocation of Smad-4 to the nucleus and thus regulating the TGF-β pathway.

4.2. Regulation by Post-Translational Modifications (PTMs)

LKB1 is the target of several PTMs, such as phosphorylation, acetylation and prenylation, which serve to regulate its kinase activity, as well as its localization (**Figure 2**, **Table 2**).

Phosphorylation:

LKB1 is autophosphorylated on Serine (Ser) and Threonine (Thr) residues, and is also phosphorylated by other kinases, regulating both its localization and/or enzymatic activity. Here, we will focus on the sites known to be associated with functional consequences.

Ser307:

In response to several stimuli, such as peroxynitrite ($ONOO^-$), metformin (an anti-

diabetic drug known as Glucophage) or AICAR (an analog of adenosine monophosphate), the Ser307 residue is phosphorylated by PKC-ζ, inducing the nucleocytoplasmic transport of LKB1 and the subsequent activation of AMPK, the suppression of angiogenesis and the regulation of cell cycle progression and proliferation [47]. This phosphorylation is also responsible for the activation of AMPK by LKB1 in the presence of berberine, a drug used to treat gut infections, diarrhea and diabetes [48].

Table 2. Post-translational modification sites of LKB1. This table shows sites of phosphorylation, acetylation and prenylation within LKB1 and the effects of their PTM. The enzymes with an italic font have been reported on mouse LKB1 residues.

PTM	Amino Acid	Enzyme	Effect	Reference
Phosphorylation	Ser31	Not Identified	No effect reported on LKB1 activity or cellular localization.	[49]
	Thr32 Ser69 Thr71	Not Identified	No effect reported on LKB1 activity or cellular localization.	[51]
	Thr185 Thr189	LKB1	No effect reported on LKB1 activity or cellular localization.	[36]
	Ser307	PKC-ζ	Increase in LKB1 cytoplasmic localization. AMPK activation. Inhibition of angiogenesis and apoptosis.	[47]
	Ser325	ERK	Inhibition of AMPK activation. Increase in cell proliferation. Increase in anchorage independent growth.	[50]
	Ser334	Akt	Increase in 14-3-3 binding to LKB1. Increase in LKB1 nuclear retention. Inhibition of LKB1 tumor suppressor activity.	[51]
	Thr336	LKB1	Increase in 14-3-3 binding to LKB1. Inhibition of LKB1 kinase activity.	[49] [52]
	Thr363	*ATM & DNA-PK*/LKB1	Implication in cell growth suppression.	[36] [53]
	Thr402	LKB1	Increase in LKB1 kinase activity.	[36]
	Ser428	*P90RSK & PKA*	Inhibition of cell growth. Regulation of LKB1 asymmetric localization. Initiation of myelination in Schwann Cells.	[45] [54]
		PKC-ζ	Increase in LKB1 activity.	[55]
Acetylation	Lys48	Not Identified	Decrease in LKB1 interaction with STRAD*α*. Decrease in LKB1 activity.	[56]
Deacetylation		SIRT1	Enhancement of LKB1 proteasome-mediated degradation.	[57]
Acetylation	Lys64	Not Identified	Triggering LKB1 proteasome-mediated degradation.	[58]
Prenylation	Cys430	*Prenyltransfrase*	Targeting LKB1 to the plasmic membrane.	[59] [60]

Ser325:

Sapkota *et al.* showed that LKB1 is phosphorylated on the Ser325 residue, independently of its catalytic activity [49]. Zheng *et al.* identified this residue as a direct phosphorylation target of ERK in cells transformed by oncogenic B-RAF mutations, and revealed that this modification suppresses the ability of LKB1 to bind and, thereby, to activate AMPK [50]. Furthermore, they showed that this modification is important for cell proliferation and anchorage-independent growth, leading to their transformation. Indeed, cells that expressed the phosphorylation-deficient amino acid mutant proliferate significantly less than cells expressing the wild type LKB1 and form fewer colonies on soft agar than the control group.

Ser334:

The serine 334 residue is phosphorylated by the survival kinase Akt. This phosphorylation enables LKB1 to interact with the 14-3-3 protein, resulting in its increased nuclear retention, preventing the formation of the LKB1/STRADα complex and abolishing its tumor suppressor activity *in vitro* in breast cancer cell cultures and *in vivo* in mammary carcinoma in nude mice [51].

Thr336:

Upon activation of LKB1 by STRADα, LKB1 is autophosphorylated on the Thr336 residue [49]. Bai *et al.* demonstrated that P-Thr336 is recognized by the 14-3-3 protein, fostering its binding to LKB1 and the inhibition of the LKB1 kinase activity without affecting the level of its autophosphorylation [52].

Thr363:

Sapkota and colleagues reported that the Thr366 residue is phosphorylated in mouse LKB1 (corresponding to Thr363 in human LKB1) [49]. This phosphorylation does not regulate the activity of LKB1 or its nuclear localization in HeLa cell lines. Rather, exposure of cells to ionizing radiation results in the phosphorylation of Thr363 *in vitro* and *in vivo* by the ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM) and *in vitro* by the DNA-dependent protein kinase DNA-PK [53]. As a result, this modification might be implicated in enabling LKB1-mediated cell growth suppression. In addition, Baas et al. demonstrated that Thr363 is also an autophosphorylation site [36].

Ser428:

Following stimulation with EGF/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) or with the adenylate cyclase activator, forskolin, LKB1 is phosphorylated on the Ser431 residue (corresponding to Ser428 in human LKB1) by p90 ribosomal S6 kinase ($P90^{RSK}$) and cAMP-dependent protein kinase (PKA), respectively [45]. This modification mediates the ability of LKB1 to suppress cell growth. Indeed, the transfection of G361 cells with a LKB1 protein containing a mutation on this site led to a 7-fold increase in the number of colonies formed in comparison with cells transfected with the wild-type LKB1. Shen *et al.* demonstrated that the phosphorylation of this residue by PKA regulates the asymmetric localization of LKB1 in Schwann cells and the initiation of myelination *in vitro* [54]. Moreover, upon activation by metformin, Xie *et al.* showed that PKC-ζ is also able to phosphorylate LKB1 on Ser428 and that this phosphorylation is required to enhance the activation of AMPK, through an increase in its phosphoryla-

tion on Thr172 [50] [55]. Indeed, this modification on Ser428 leads to the nuclear export of LKB1 and the subsequent phosphorylation of its target AMPK on Thr172 in endothelial cells [55].

Acetylation/Deacetylation:

LKB1 acetylation has been the subject of fewer studies than its phosphorylation. By mass spectrometry, Lan *et al*. showed that LKB1 is acetylated on at least nine lysine residues over its three domains, although most studies have focused on the Lys48 residue on the N-terminal part, which interacts with SIRT1, a NAD^+-dependent histone/protein deacetylase [56]. Even though Lys48 deacetylation is known to be catalyzed by SIRT1, the identity of the acetylase involved remains unknown. Acetylation prevents STRADα from interacting with LKB1 and leads to an increased nuclear localization of LKB1, thereby, inhibiting its kinase activity. In contrast, the deacetylation of this lysine by SIRT1 causes a 2-fold increase in the binding of LKB1 to STRADα, in its cytoplasmic localization and in its activity.

In line with these findings, Zu *et al*. revealed that the levels of LKB1 and SIRT1 were inversely correlated during the progression of senescence in endothelial cells with an increase in the level of LKB1 and a decrease in that of SIRT1 [57]. In addition, these authors showed that the deacetylation of LKB1 reduces cell senescence by decreasing the activation of AMPK, and mediates the downregulation of LKB1, through ubiquitination and proteasome-mediated degradation. Recently, Bai et al. showed that the acetylation of LKB1 on the Lys64 residue triggers the formation a protein complex with SIRT1 leading to subsequent LKB1 proteasomal degradation [58].

Prenylation:

LKB1 contains a CAAX motif in its C-terminal domain, usually required for protein prenylation. Indeed, this modification takes place on the cysteine residue Cys430 of LKB1. Two studies demonstrated that the substitution of Cys430 with a serine residue reduced the level of LKB1 associated with the plasma membrane, thus confirming the role of prenylation in targeting LKB1 to the membrane [59] [60]. Based on *in vivo* studies, Houde *et al*. reported that knock-in mice, in which Cys433 (corresponding to Cys430 in human) was replaced by Ser433, displayed a lower level of LKB1 associated with the membrane, as well as a significantly reduced AMPK activity, suggesting that LKB1 localization is a prerequisite for its kinase activity. Upon activation by AICAR, an AMPK activator, these mice showed muscle contraction along with a significant decrease in lipid synthesis in their liver [60].

Altogether, the identification of different PTMs of LKB1 shows that its localization appears to be closely linked to its kinase activity and this may affect its anti-tumoral properties.

4.3. Role of LKB1 in Cancer: Focus on Breast Cancer in Mouse Models

Patients with a predisposition to PJS, suffering from germline mutations of *lkb1*, presenta higher risk of developing cancer at a young age, such as lung, gastrointestinal, gynecological and breast cancers [32] [61] [62]. In addition, BC patients are reported to have frequent loss of heterozygosity in a chromosome locus, in which *lkb1* is located

[63]. These results are consistent with several reports showing that LKB1 possesses anti-tumoral properties.

Indeed, LKB1 was found to be overexpressed in breast cancer cells upon exposure to adiponectin [64]. As a result, LKB1 overexpression mediates the activation of the AMPK signaling pathway, thus inhibiting the activation of mTOR, leading to a decrease in the adhesion, invasion and migration abilities of cancerous cells. Finally, this anti-tumoral effect was reversed by the knockdown of LKB1.

Another study revealed that LKB1 limits the migration and the invasive capacity of breast cancer cell lines by decreasing levels of secreted matrix metalloproteinases and downregulating the expression of angiogenesis factors, such as VEGF, both *in vitro* and *in vivo* [65]. These authors demonstrated that LKB1 acts as a negative regulator of human BC, since LKB1-transfected breast cancer cells grew at a slower rate than control cells in nude mice, and in addition, LKB1-transfected xenografts displayed a significant regression of lung metastasis.

Conditional deletion of *lkb1* in primary mouse mammary epithelial 3D cultures leads to the disruption of both epithelial architecture and basement membrane structure [66]. *In vivo*, this deletion disrupts the epithelial integrity and causes the appearance of a discontinuous basement membrane around lkb1-deficient mammary epithelial ducts. Loss of *lkb1* is also significantly associated with the activation of c-Myc, which induces mammary tumorigenesis [66]. Indeed, the combination of Myc overexpression and loss of *lkb1* intensely accelerated the formation of mammary tumors and shortened the mean latency of tumor formation in comparison to the wild type group.

McCarthy *et al.* generated transgenic mice carrying the *lkb1* allele with provisional deletion of the exons coding for the LKB1 kinase domain, exclusively in the mammary gland [15]. Mammary gland tumors were developed, sharing some histological patterns with breast cancers developed in PJS patients. This mouse model offers a precious tool to test new therapeutic strategies and to understand the biological impact of the loss-of-function of *lkb1*in the development and the progression of mammary gland cancer.

Another breast cancer mouse model was developed in 2013, combining the loss of *lkb1* with an activating mutation of the Her2 oncogene [67]. Here, the loss of LKB1 activity reduced the latency of tumor formation and significantly stimulated tumor growth. In parallel, breast tumor formation was strongly correlated with the hyperactivation of the mTOR signaling pathway and the alteration of cell metabolism, leading to tumors with a high metabolic activity. This model exposes the loss of *lkb1* in HER2-positive tumors as a potential new marker for mTOR hyperactivation, thereby encouraging new therapeutic agents to target the LKB1-mTOR signaling pathway in BC.

However, several studies reported that LKB1 could also have oncogenic properties. In several breast cancer cell lines, Nath-Sain *et al.* showed that, in response to estrogen, LKB1 acts as a coactivator of ERα in the nucleus and thus interferes with the estrogen genomic signaling pathway [13] [33]. This results in an enhanced ERα-mediated transactivation of targeted genes, such as cathepsin D, c-myc and cyclin D1, thereby in-

creasing cell proliferation and highlighting a signaling pathway, in which LKB1 acts as a tumor enhancer. Furthermore, LKB1 was shown to drive the proliferation of UVB-induced murine basal cell carcinoma, by leading to a constitutive activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway [68]. In addition, LKB1 can play an important role in the phosphorylation of pro-apoptotic proteins by Akt, such as Bad, FoxO1 and others, which suppresses cell death in tumor cells with a constitutively active Akt [69].

4.4. LKB1, A Potentially Novel Biomarker of BC

PJS patients develop breast cancers that display either a loss or a reduced expression of LKB1 protein, the sporadic mutations being rarely detected [32] [35]. Indeed, in a cohort of 62 patients with primary BC and 17 established BC cell lines, Bignel *et al.* screened the full coding sequence and splice junctions of LKB1 for somatic mutations, to no avail [70]. A whole-genome sequence analysis was conducted on 560 BC samples to improve our understanding of the origins and the effects of somatic mutations in BC [71]. The authors identified 916 probable mutations as driver mutations in BC, including the mutation of the *lkb1* gene, thereby giving rise to a protein mutated on the Cys151 residue.

Shen *et al.* studied the expression of LKB1 in a cohort of 116 invasive breast cancers and assessed the correlation with established clinicopathological prognostic factors [72]. They found that a low level of the protein LKB1 is associated with poor prognostic factors, such as high histological grade, increased tumor size, the presence of lymph node metastasis, in addition to a shorter RFS and poorer OS. In this study, LKB1 expression was analyzed in tumors by Western blot, an approach which does not take into consideration the heterogeneity of the tumors or the subcellular localization of LKB1.

More recently, Xiao *et al.* conducted a meta-analysis of 14 studies that encompassed 1915 patients and included 7 different solid tumors, such as BC and lung cancer [73]. They demonstrated that the decreased expression of LKB1 messenger RNA was associated with a poor OS, as well as a larger tumor size, lymph node metastasis and higher TNM stage, and they suggested that the low level of LKB1 could be used as a potential predictive marker for poor prognosis in patients with solid tumors.

Bouchekioua-Bouzaghou *et al.* described, for the first time, a dual localization of LKB1 both in the nucleus and in the cytoplasm in breast tumors. Moreover, they identified cytoplasmic LKB1 as a partner of methylated ERα in the estrogen non-genomic complex [14]. This interaction takes place not only in breast cell lines but also in primary breast tumors specifically expressing the methylated form of ERα. The authors showed that LKB1 does not alter the integrity or the stability of the complex, but that it acts as an auxiliary partner. Interestingly, they also studied the expression of LKB1 at the protein level in 154 BC samples [14] and revealed that a nuclear LKB1 expression was inversely correlated with its cytoplasmic expression. Furthermore, it was shown that high levels of cytoplasmic LKB1 are an independent poor prognostic factor of OS and disease-free survival (DFS) and are associated with bad prognostic factors, such as high SBR grade and negative ERα status, while the nuclear form of LKB1 is associated

with good prognostic factors. The dual localization of LKB1 was confirmed in the MCF7 (cytoplasmic localization) and ZR75-1 (nuclear localization) BC cell lines. The expression of LKB1 in the cytoplasm was also associated with the expression of ER*α*/Src/PI3K, corroborating *in vitro* results showing that LKB1 is a partner of the non-genomic complex. Bouchekioua-Bouzaghou *et al.* speculated that LKB1 was trapped inside the nongenomic complex, thus inhibiting LKB1 from exerting its anti-proliferative role (**Figure 3**). Indeed, the level of phosphorylated 4E-BP1, a direct target of mTOR, was positively correlated with the expression of cytoplasmic LKB1 in the tested cohort. Accordingly, the presence of LKB1 within the estrogen non-genomic complex could impair the ability of LKB1 to phosphorylate its substrates, thus altering its anti-tumoral activity.

More recently, Azim *et al.* conducted a study on 35 Egyptian luminal breast tumors to establish correlations between the PI3K/AKT/m-TOR pathway effectors, mainly LKB1, and the known clinicopathological factors of the patients studied [74]. This study confirmed the dual localization of LKB1 and the authors demonstrated that the high level of nuclear LKB1 protein expression was predictive of a better DFS. They also found that it is associated with parameters of good prognosis, such as smaller tumor size, more ER*α* and PR positivity, a predominant HER2 negativity and a decreased risk of recurrence or death, thereby confirming the results obtained earlier by Bouchekioua-Bouzaghou *et al.* [14].

In 2012, Bachelot *et al.* conducted the first randomized phase II trial combining everolimus, an inhibitor of mTOR, with the endocrine therapy agent, tamoxifen, on 111

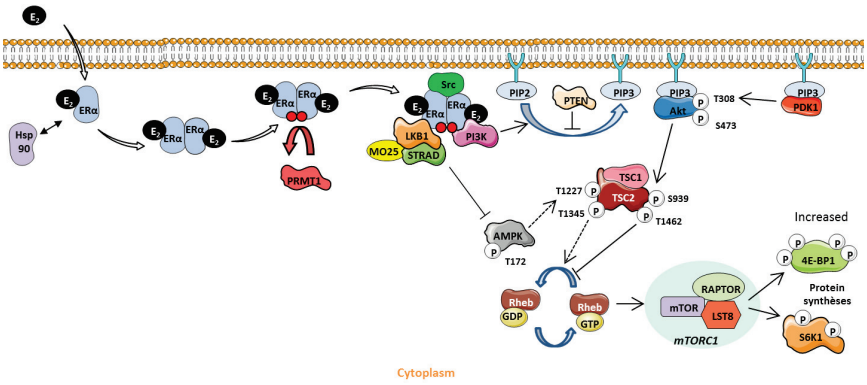


Figure 3. Model of the relationship between cytoplasmic LKB1 and the non-genomic ERα/Src/ PI3K complex. The association of LKB1 with the estrogen non-genomic complex prevents its ability to phosphorylate its substrates as AMPK, thus preventing the inhibition of the mTOR signaling pathway and leading to the increase of 4E-BP1 activation. E_2: 17 *β*-oestradiol; Hsp90: Heat shock protein90; ER*α*: Estrogen receptor *α*; PRMT1: Protein arginine methyltransferase 1; MO25: Mouse protein 25; STRAD: *STE*-related adaptor; PI3K: Phosphatidylinositide 3-kinase; PIP2: Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate; PIP3: Phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate; PTEN: Phosphatase and tensin homolog; AMPK: AMP-activated protein kinase; GDP: Guanosine diphosphate; GTP: Guanosine triphosphate; TSC1/2: Tuberous sclerosis 1/2; mTOR: Mammalian target of rapamycin; PDK1: S6K1: S6 kinase 1.

postmenopausal women, suffering from metastatic BC that became resistant to the aromatase inhibitors treatment [75]. The trial aimed to evaluate the efficacy of the combination treatment on enhancing the prognosis of endocrine therapy-resistant patients. After a follow up of 6 months, this study, entitled TAMRAD, reported that the clinical benefit rate, the time to progression of cancer and the OS of patients increased for patients receiving the combination therapy compared to the tamoxifen monotherapy group. These results were confirmed by Baselga *et al.* who conducted a phase III randomized trial on 724 patients with hormone receptor-positive advanced BC [76] and found that the combination of everolimus with the aromatase inhibitors also enhanced the PFS of patients. From the TAMRAD trial, Treilleux *et al.* conducted a retrospective evaluation on 55 primary tumor samples to identify potential predictive biomarkers of the response to everolimus [77]. Focusing exclusively on the mTOR pathway, they found that low levels of cytoplasmic LKB1 expression was associated with a high level of P-4EBP1, low cytoplasmic P-Akt and low PI3K levels. The patients showing these expression profiles appeared to benefit more from the treatment with tamoxifen and everolimus. This evaluation highlighted the fact that LKB1 could be a predictive marker of the efficacy of administering everolimus in advanced BC.

Of note, it is hard to associate the expression profile of LKB1 with a specific BC subtype, since the cohorts studied give rise to contradictory results. This could be due to the difference in the cohorts' size, the methods used to detect LKB1 (western blot, immunohistochemistry, RT-PCR…) and the fact that LKB1 localization is not always taken into account [14] [72] [78].

5. Conclusion

At present, ERα is the only factor routinely used to predict and prescribe endocrine therapy. Based on recent findings, it seems that combining targeted therapy to hormonotherapy could significantly increase the survival rate of patients with BC. However, the occurrence of side effects and the cost of targeted therapies disable the clinicians from targeting the right patients, giving thereby rise to an urgent need for novel and efficient predictive markers. LKB1, as a regulator of the mTORC1 pathway, could be a potential predictive marker of the efficacy of everolimus in advanced breast cancer. Based on recent results, it seems that the dual localization of LKB1 within tumor cells should be taken in account to determine its prognostic value, since it can act either as a tumor suppressor or as an oncogene, according to its localization. It would be of interest to determine which PTM regulates LKB1 shuttling in BC.

Acknowledgements

We thank the Lebanese University, Fondation de France, Fondation Arc Cancer and The National Institutes of Health for their support to this project.

References

[1] Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2015) Cancer Statistics, 2015. *CA*: *A Cancer Journal*

for Clinicians, **65**, 5-29. http://dx.doi.org/10.3322/caac.21254

[2] Bocchinfuso, W.P. and Korach, K.S. (1997) Mammary Gland Development and Tumorigenesis in Estrogen Receptor Knockout Mice. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **2**, 323–334. http://dx.doi.org/10.1023/A:1026339111278

[3] Colditz, G.A. (1998) Relationship between Estrogen Levels, Use of Hormone Replacement Therapy, and Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **90**, 814-823. http://dx.doi.org/10.1093/jnci/90.11.814

[4] Renoir, J.M., Marsaud, V. and Lazennec, G. (2013) Estrogen Receptor Signaling as a Target for Novel Breast Cancer Therapeutics. *Biochemical Pharmacology*, **85**, 449–465. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.10.018

[5] Crandall, D.L., Busler, D.E., Novak, T.J., Weber, R.V. and Kral, J.G. (1998) Identification of Estrogen Receptor Beta RNA in Human Breast and Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **248**, 523-526. http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.8997

[6] Harvey, J.M., Clark, G.M., Osborne, C.K. and Allred, D.C. (1999) Estrogen Receptor Status by Immunohistochemistry Is Superior to the Ligand-Binding Assay for Predicting Response to Adjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **17**, 1474-1481.

[7] Ali, S. and Coombes, R.C. (2002) Endocrine-Responsive Breast Cancer and Strategies for Combating Resistance. *Nature Reviews Cancer*, **2**, 101-112. http://dx.doi.org/10.1038/nrc721

[8] Musgrove, E.A. and Sutherland, R.L. (2009) Biological Determinants of Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 631-643. http://dx.doi.org/10.1038/nrc2713

[9] Burstein, H.J. (2011) Novel Agents and Future Directions for Refractory Breast Cancer. *Seminars in Oncology*, **38**, 17-24. http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2011.04.002

[10] Yardley, D.A., Bosserman, L.D., O'Shaughnessy, J.A., Harwin, W.N., Morgan, S.K., Priego, V.M., Peacock, N.W., Bass, J.D., Burris Iii, H.A. and Hainsworth, J.D. (2015) Paclitaxel, Bevacizumab, and Everolimus/Placebo as First-Line Treatment for Patients with Metastatic HER2-Negative Breast Cancer: A Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial of the Sarah Cannon Research Institute. *Breast Cancer Research and Treatment*, **154**, 89-97. http://dx.doi.org/10.1007/s10549-015-3599-5

[11] Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A. and Cantley, L.C. (2004) The Tumor Suppressor LKB1 Kinase Directly Activates AMP-Activated Kinase and Regulates Apoptosis in Response to Energy Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **101**, 3329-3335.

[12] Dong, L., Sun, L., Zhang, X., Pan, L., Lian, L., Chen, Z. and Zhong, D. (2013) Negative Regulation of mTOR Activity by LKB1-AMPK Signaling in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, **34**, 314-318. http://dx.doi.org/10.1038/aps.2012.143

[13] Nath-Sain, S. and Marignani, P.A. (2009) LKB1 Catalytic Activity Contributes to Estrogen Receptor α Signaling. *Molecular Biology of the Cell*, **20**, 2785-2795. http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E08-11-1138

[14] Bouchekioua-Bouzaghou, K., Poulard, C., Rambaud, J., Lavergne, E., Hussein, N., Billaud, M., Bachelot, T., Chabaud, S., Mader, S., Dayan, G., Treilleux, I., Corbo, L. and Le Romancer, M. (2014) LKB1 When Associated with Methylated ERα Is a Marker of Bad Prognosis in Breast Cancer. *International Journal of Cancer*, **135**, 1307-1318.

[15] McCarthy, A., Lord, C.J., Savage, K., Grigoriadis, A., Smith, D.P., Weigelt, B., Reis-Filho,

J.S. and Ashworth, A. (2009) Conditional Deletion of the Lkb1 Gene in the Mouse Mammary Gland Induces Tumour Formation. *Journal of Pathology*, **219**, 306-316. http://dx.doi.org/10.1002/path.2599

[16] Norum, J.H. andersen, K. and Sørlie, T. (2014) Lessons Learned from the Intrinsic Subtypes of Breast Cancer in the Quest for Precision Therapy. *British Journal of Surgery*, **101**, 925-938. http://dx.doi.org/10.1002/bjs.9562

[17] Lumachi, F., Santeufemia, D.A. and Basso, S.M. (2015) Current Medical Treatment of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *World Journal of Biological Chemistry*, **6**, 231-239. http://dx.doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.231

[18] Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., Senn, H.J. and Panel Members (2011) Strategies for Subtypes—Dealing with the Diversity of Breast Cancer: Highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Annals of Oncology*, **22**, 1736-1747. http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdr304

[19] Geyer, C.E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C.G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., Skarlos, M., Campone, N., Davidson, M., Berger, C., Oliva, S.D., Rubin, S., Stein, D. and Cameron, D. (2006) Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, **355**, 2733-2743. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa064320

[20] Michel, L.L., Bermejo, J.L., Gondos, A., Marmé, F. and Schneeweiss, A. (2015) T-DM1 as a New Treatment Option for Patients with Metastatic HER2-positive Breast Cancer in Clinical Practice. *Anticancer Research*, **35**, 5085-5090.

[21] McCormack, P.L. (2015) Pertuzumab in HER2-Positive Breast Cancer: A Guide to Its Use. *Drugs & Therapy Perspectives*, **32**, 35-41. http://dx.doi.org/10.1007/s40267-015-0267-0

[22] Rocca, A., Andreis, D., Fedeli, A., Maltoni, R., Sarti, S., Cecconetto, L., Pietri, E., Schirone, A., Bravaccini, S., Serra, P., Farolfi, A. and Amadori, D. (2015) Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Clinical Efficacy of Pertuzumab in Breast Cancer Therapy. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **11**, 1647-1663. http://dx.doi.org/10.1517/17425255.2015.1078311

[23] Mirzania, M. (2016) Approach to the Triple Negative Breast Cancer in New Drugs Area. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, **10**, 115-119.

[24] Tinoco, G., Warsch, S., Glück, S., Avancha, K. and Montero, A.J. (2013) Treating Breast Cancer in the 21st Century: Emerging Biological Therapies. *Journal of Cancer*, **4**, 117-132. http://dx.doi.org/10.7150/jca.4925

[25] Mohamed, A., Krajewski, K., Cakar, B. and Ma, C.X. (2013) Targeted Therapy for Breast Cancer. *American Journal of Pathology*, **183**, 1096-1112. http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.07.005

[26] Björnström, L. and Sjöberg, M. (2005) Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology*, **19**, 833-842. http://dx.doi.org/10.1210/me.2004-0486

[27] Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. and Gustafsson, J.A. (2001) Mechanisms of Estrogen Action. *Physiological Reviews*, **81**, 1535-1565.

[28] Le Romancer, M., Treilleux, I., Leconte, N., Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Bouchekioua-Bouzaghou, K., Goddard, S., Gobert-Gosse, S. and Corbo, L. (2008) Regulation of Estrogen Rapid Signaling through Arginine Methylation by PRMT1. *Molecular Cell*, **31**, 212-221. http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.025

[29] Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.M. and Corbo, L. (2011) Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors. *Endocrine Reviews*, **32**, 597-622. http://dx.doi.org/10.1210/er.2010-0016

[30] Poulard, C., Treilleux, I., Lavergne, E., Bouchekioua-Bouzaghou, K., Goddard-Léon, S., Chabaud, S., Trédan, O., Corbo, L. and Le Romancer, M. (2012) Activation of Rapid Oestrogen Signalling in Aggressive Human Breast Cancers. *EMBO Molecular Medicine*, **4**, 1200-1213. http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201201615

[31] Smith, D.P., Spicer, J., Smith, A., Swift, S. and Ashworth, A. (1999) The Mouse Peutz-Jeghers Syndrome Gene *LKB*1 Encodes a Nuclear Protein Kinase. *Human Molecular Genetics*, **8**, 1479-1485. http://dx.doi.org/10.1093/hmg/8.8.1479

[32] Korsse, S.E., Peppelenbosch, M.P. and van Veelen, W. (2013) Targeting *LKB*1 Signaling in Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1835**, 194-210. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.12.006

[33] Herrmann, J.L., Byekova, Y., Elmets, C.A. and Athar, M. (2011) Liver Kinase B1 (*LKB*1) in the Pathogenesis of epithelial Cancers. *Cancer Letters*, **306**, 1-9. http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.01.014

[34] Rowan, A., Churchman, M., Jefferey, R., Hanby, A., Poulsom, R. and Tomlinson, I. (2000) *In Situ* Analysis of *LKB*1/*STK*11 mRNA Expression in Human Normal Tissues and Tumours. *Journal of Pathology*, **192**, 203-206. http://dx.doi.org/10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH686>3.0.CO;2-J

[35] Sanchez-Cespedes, M. (2007) A Role for *LKB*1 Gene in Human Cancer beyond the Peutz-Jeghers Syndrome. *Oncogene*, **26**, 7825-7832. http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210594

[36] Baas, A.F., Boudeau, J., Sapkota, G.P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R. and Clevers, H.C. (2003) Activation of the Tumour Suppressor Kinase *LKB*1 by the STE20-Like Pseudokinase STRAD. *EMBO Journal*, **22**, 3062-3072. http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg292

[37] Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Morrice, N.A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A. R., Clevers, H.C. and Alessi, D.R. (2003) Mo25α/β Interact with STRADα/β Enhancing Their Ability to Bind, Activate and Localize *LKB*1 in the Cytoplasm. *EMBO Journal*, **22**, 5102-5114. http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg490

[38] Dorfman, J. and Macara, I.G. (2008) STRADα Regulates *LKB*1 Localization by Blocking Access to Importin-α, and by Association with Crm1 and Exportin-7. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 1614-1626. http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E07-05-0454

[39] Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel, N.N., Batlle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J. and Clevers, H.C. (2004) Complete Polarization of Single Intestinal Epithelial Cells upon Activation of *LKB*1 by STRAD. *Cell*, **116**, 457-466. http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00114-X

[40] Alessi, D.R., Sakamoto, K. and Bayascas, J.R. (2006) *LKB*1-Dependent Signaling Pathways. *Annual Review of Biochemistry*, **75**, 137-163. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142702

[41] Shackelford, D.B. and Shaw, R.J. (2009) The *LKB*1-AMPK Pathway: Metabolism and Growth Control in Tumour Suppression. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 563-575. http://dx.doi.org/10.1038/nrc2676

[42] Momcilovic, M. and Shackelford, D.B. (2015) Targeting *LKB*1 in Cancer—Exposing and Exploiting Vulnerabilities. *British Journal of Cancer*, **113**, 574-584. http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.261

[43] Gan, R.Y. and Li, H.B. (2014) Recent Progress on Liver Kinase B1 (*LKB*1): Expression, Regulation, Downstream Signaling and Cancer Suppressive Function. *International Journal of*

Molecular Sciences, **15**, 16698-16718. http://dx.doi.org/10.3390/ijms150916698

[44] Zhou, W., Zhang, J. and Marcus, A.I. (2014) *LKB*1 Tumor Suppressor: Therapeutic Opportunities Knock when *LKB*1 Is Inactivated. *Genes & Diseases*, **1**, 64-74. http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2014.06.002

[45] Sapkota, G.P., Kieloch, A., Lizcano, J.M., Lain, S., Arthur, J.S., Williams, M.R., Morrice, N., Deak, M. and Alessi, D.R. (2001) Phosphorylation of the Protein Kinase Mutated in Peutz-Jeghers Cancer Syndrome, *LKB*1/*STK*11, at Ser^{431} by $p90^{RSK}$ and cAMP-Dependent Protein Kinase, but Not Its Farnesylation at Cys^{433}, Is Essential for *LKB*1 to Suppress Cell Growth. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 19469-19482. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M009953200

[46] Nony, P., Gaude, H., Rossel, M., Fournier, L., Rouault, J.P. and Billaud, M. (2003) Stability of the Peutz-Jeghers Syndrome Kinase *LKB*1 Requires Its Binding to the Molecular Chaperones Hsp90/Cdc37. *Oncogene*, **22**, 9165-9175. http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207179

[47] Xie, Z., Dong, Y., Zhang, J., Scholz, R., Neumann, D. and Zou, M.H. (2009) Identification of the Serine 307 of *LKB*1 as a Novel Phosphorylation Site Essential for Its Nucleocytoplasmic Transport and Endothelial Cell Angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, **29**, 3582-3596. http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01417-08

[48] Han, Y., Wang, Q., Song, P., Zhu, Y. and Zou, M.H. (2010) Redox Regulation of the AMP—Activated Protein Kinase. *PLoS ONE*, **5**, e15420. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015420

[49] Sapkota, G.P., Boudeau, J., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N. and Alessi, D.R. (2002) Identification and Characterization of Four Novel Phosphorylation Sites (Ser^{31}, Ser^{325}, Thr^{336} and Thr^{366}) on *LKB*1/*STK*11, the Protein Kinase Mutated in Peutz-Jeghers Cancer Syndrome. *Biochemical Journal*, **362**, 481-490.

[50] Zheng, B., Jeong, J.H., Asara, J.M., Yuan, Y.Y., Granter, S.R., Chin, L. and Cantley, L.C. (2009) Oncogenic B-RAF Negatively Regulates the Tumor Suppressor *LKB*1 to Promote Melanoma Cell Proliferation. *Molecular Cell*, **33**, 237-247. http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.026

[51] Liu, L., Siu, F.M., Che, C.M., Xu, A. and Wang, Y. (2012) Akt Blocks the Tumor Suppressor Activity of *LKB*1 by promoting Phosphorylation-Dependent Nuclear Retention through 14-3-3 Proteins. *American Journal of Translational Research*, **4**, 175-186.

[52] Bai, Y., Zhou, T., Fu, H., Sun, H. and Huang, B. (2012) 14-3-3 Interacts with *LKB*1 via Recognizing Phosphorylated Threonine 336 Residue and Suppresses *LKB*1 Kinase Function. *FEBS Letters*, **586**, 1111-1119. http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.018

[53] Sapkota, G.P., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., Goodarzi, A.A., Smythe, C., Shiloh, Y., Lees-Miller, S.P. and Alessi, D.R. (2002) Ionizing Radiation Induces Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase (ATM)-Mediated Phosphorylation of *LKB*1/*STK*11 at Thr-366. *Biochemical Journal*, **368**, 507-516. http://dx.doi.org/10.1042/bj20021284

[54] Shen, Y.A.A., Chen, Y., Dao, D.Q., Mayoral, S.R., Wu, L., Meijer, D., Ullian, E.M., Chan, J.R. and Lu, Q.R. (2014) Phosphorylation of *LKB*1/Par-4 Establishes Schwann Cell Polarity to Initiate and Control Myelin Extent. *Nature Communications*, **5**, Article Number: 4991. http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5991

[55] Xie, Z., Dong, Y., Scholz, R., Neumann, D. and Zou, M.H. (2008) Phosphorylation of *LKB*1 at Serine 428 by Protein Kinase C-Zeta Is Required for Metformin-Enhanced Activation of the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells. *Circulation*, **117**, 952-962. http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.744490

[56] Lan, F., Cacicedo, J.M., Ruderman, N. and Ido, Y. (2008) SIRT1 Modulation of the Acetyla-

tion Status, Cytosolic Localization, and Activity of *LKB*1. Possible Role in AMP-Activated Protein Kinase Activation. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 27628-27635. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M805711200

[57] Zu, Y., Liu, L., Lee, M.Y.K., Xu, C., Liang, Y., Man, R.Y., Vanhoutte, P.M. and Wang, Y. (2010) SIRT1 Promotes Proliferation and Prevents Senescence through Targeting *LKB*1 in Primary Porcine Aortic Endothelial Cells. *Circulation Research*, **106**, 1384-1393. http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.215483

[58] Bai, B.A., Man, W.C., Yang, K., Guo, Y., Xu, C., Tse, H.F., Han, W., Bloksgaard, M., Mey, J. G.R.D., Vanhoutte, P.M., Xu, A. and Wang, Y. (2016) Endothelial SIRT1 Prevents Adverse Arterial Remodeling by Facilitating HERC2-Mediated Degradation of Acetylated *LKB*1. *Oncotarget*, **7**, 39065-39081. http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.9687

[59] Collins, S.P., Reoma, J.L., Gamm, D.M. and Uhler, M.D. (2000) *LKB*1, A Novel Serine/ Threonine Protein Kinase and Potential Tumour Suppressor, Is Phosphorylated by cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) and Prenylated *in Vivo*. *Biochemical Journal*, **345**, 673-680. http://dx.doi.org/10.1042/bj3450673

[60] Houde, V.P., Ritorto, M.S., Gourlay, R., Varghese, J., Davies, P., Shpiro, N., Sakamoto, K. and Alessi, D.R. (2014) Investigation of *LKB*1 Ser^{431} Phosphorylation and Cys^{433} Farnesylation Using Mouse Knockin Analysis Reveals an Unexpected Role of Prenylation in Regulating AMPK Activity. *Biochemical Journal*, **458**, 41-56. http://dx.doi.org/10.1042/BJ20131324

[61] Lim, W., Hearle, N., Shah, B., Murday, V., Hodgson, S.V., Lucassen, A., Eccles, D., Talbot, I., Neale, K., Lim, A.G., O'Donohue, J., Donaldson, A., Macdonald, R.C., Young, I.D., Robinson, M.H., Lee, P.W.R., Stoodley, B.J., Tomlinson, I., Alderson, D., Holbrook, A.G., Vyas, S., Swarbrick, E.T., Lewis, A.M., Phillips, R.K.S. and Houlston, R.S. (2003) Further Observations on *LKB*1/*STK*11 Status and Cancer Risk in Peutz-Jeghers Syndrome. *British Journal of Cancer*, **89**, 308-313. http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6601030

[62] Van Lier, M.G.F., Wagner, A., Mathus-Vliegen, E.M.H., Kuipers, E.J., Steyerberg, E.W. and van Leerdam, M.E. (2010) High Cancer Risk in Peutz-Jeghers Syndrome: A Systematic Review and Surveillance Recommendations. *American Journal of Gastroenterology*, **105**, 1258-1264. http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2009.725

[63] Ollila, S. and Mäkelä, T.P. (2011) The Tumor Suppressor Kinase *LKB*1: Lessons from Mouse Models. *Journal of Molecular Cell Biology*, **3**, 330-340. http://dx.doi.org/10.1093/jmcb/mjr016

[64] Taliaferro-Smith, L., Nagalingam, A., Zhong, D., Zhou, W., Saxena, N.K. and Sharma, D. (2009) *LKB*1 Is Required for Adiponectin-Mediated Modulation of AMPK-S6K Axis and Inhibition of Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. *Oncogene*, **28**, 2621-2633. http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.129

[65] Zhuang, Z.G., Di, G.H., Shen, Z.Z., Ding, J. and Shao, Z.M. (2006) Enhanced Expression of *LKB*1 in Breast Cancer Cells Attenuates Angiogenesis, Invasion, and Metastatic Potential. *Molecular Cancer Research*, **4**, 843-849. http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0118

[66] Partanen, J.I., Tervonen, T.A., Myllynen, M., Lind, E., Imai, M., Katajisto, P., Dijkgraaf, G. J.P., Kovanen, P.E., Mäkelä, T.P., Werb, Z. and Klefström, J. (2012) Tumor Suppressor Function of Liver Kinase B1 (*LKB*1) Is Linked to Regulation of Epithelial Integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 388-397. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1120421109

[67] Andrade-Vieira, R., Xu, Z., Colp, P. and Marignani, P.A. (2013) Loss of *LKB*1 Expression Reduces the Latency of ErbB2-Mediated Mammary Gland Tumorigenesis, Promoting Changes in Metabolic Pathways. *PLoS ONE*, **8**, e56567.

http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056567

[68] Byekova, Y.A., Herrmann, J.L., Xu, J., Elmets, C.A. and Athar, M. (2011) Liver Kinase B1 (*LKB*1) in the Pathogenesis of UVB-Induced Murine Basal Cell Carcinoma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **508**, 204-211. http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2011.01.006

[69] Zhong, D., Liu, X., Khuri, F.R., Sun, S.Y., Vertino, P.M. and Zhou, W. (2008) *LKB*1 Is Necessary for Akt-Mediated Phosphorylation of Pro-Apoptotic Proteins. *Cancer Research*, **68**, 7270-7277. http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1484

[70] Bignell, G.R., Barfoot, R., Seal, S., Collins, N., Warren, W. and Stratton, M.R. (1998) Low Frequency of Somatic Mutations in the *LKB*1/Peutz-Jeghers Syndrome Gene in Sporadic Breast Cancer. *Cancer Research*, **58**, 1384-1386.

[71] Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L.B., Martin, S., Wedge, D.C., Van Loo, P., Ju, Y.S., Smid, M., Brinkman, A.B., Morganella, S., Aure, M.R., Lingjærde, O.C., Langerød, A., Ringnér, M., Ahn, S.M., Boyault, S., Brock, J.E., Broeks, A., Butler, A., Desmedt, C., Dirix, L., Dronov, S., Fatima, A., Foekens, J.A., Gerstung, M., Hooijer, G K.J., Jang, S.J., Jones, D.R., Kim, H.Y., King, T.A., Krishnamurthy, S., Lee, H.J., Lee, J.Y., Li, Y., McLaren, S., Menzies, A., Mustonen, V., O'Meara, S., Pauporté, I., Pivot, X., Purdie, C.A., Raine, K., Ramakrishnan, K., Rodríguez-González, F.G., Romieu, G., Sieuwerts, A.M., Simpson, P.T., Shepherd, R., Stebbings, L., Stefansson, O.A., Teague, J., Tommasi, S., Treilleux, I., Van den Eynden, G.G., Vermeulen, P., Vincent-Salomon, A., Yates, L., Caldas, C., van't Veer, L., Tutt, A., Knappskog, S., Tan, B.K.T., Jonkers, J., Borg, Å., Ueno, N.T., Sotiriou, C., Viari, A., Futreal, P.A., Campbell, P.J., Span, P.N., Van Laere, S., Lakhani, S.R., Eyfjord, J.E., Thompson, A. M., Birney, E., Stunnenberg, H.G., van de Vijver, M.J., Martens, J.W.M., Børresen-Dale, A.L., Richardson, A.L., Kong, G., Thomas, G. and Stratton, M.R. (2016) Landscape of Somatic Mutations in 560 Breast Cancer Whole-Genome Sequences. *Nature*, **534**, 47-54. http://dx.doi.org/10.1038/nature17676

[72] Shen, Z., Wen, X.-F., Lan, F., Shen, Z.Z. and Shao, Z.M. (2002) The Tumor Suppressor Gene *LKB*1 Is Associated with Prognosis in Human Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **8**, 2085-2090.

[73] Xiao, J., Zou, Y., Chen, X., Gao, Y., Xie, M., Lu, X., Li, W., He, B., He, S., You, S. and Chen, Q. (2016) The Prognostic Value of Decreased *LKB*1 in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, **11**, e0152674. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0152674

[74] Azim, H.A., Kassem, L., Treilleux, I., Wang, Q., El Enein, M.A., Anis, S.E. and Bachelot, T. (2016) Analysis of PI3K/mTOR Pathway Biomarkers and Their Prognostic Value in Women with Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Early Breast Cancer. *Translational Oncology*, **9**, 114-123. http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2016.01.001

[75] Bachelot, T., Bourgier, C., Cropet, C., Ray-Coquard, I., Ferrero, J.M., Freyer, G., Abadie-Lacourtoisie, S., Eymard, J.C., Debled, M., Spaëth, D., Legouffe, E., Allouache, D., El Kouri, C. and Pujade-Lauraine, E. (2012) Randomized Phase II Trial of Everolimus in Combination with Tamoxifen in Patients with Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer with Prior Exposure to Aromatase Inhibitors: A GINECO Study. *Journal of Clinical Oncology*, **30**, 2718-2724. http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2011.39.0708

[76] Baselga, J., Campone, M., Piccart, M., Burris, H.A., Rugo, H.S., Sahmoud, T., Noguchi, S., Gnant, M., Pritchard, K.I., Lebrun, F., Beck, J.T., Ito, Y., Yardley, D., Deleu, I., Perez, A., Bachelot, T., Vittori, L., Xu, Z., Mukhopadhyay, P., Lebwohl, D. and Hortobagyi, G.N. (2012) Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, **366**, 520-529. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1109653

[77] Treilleux, I., Arnedos, M., Cropet, C., Wang, Q., Ferrero, J.M., Abadie-Lacourtoisie, S., Levy, C., Legouffe, E., Lortholary, A., Pujade-Lauraine, E., Bourcier, A.V., Eymard, J.C., Spaeth, D. and Bachelot, T. (2015) Translational Studies within the TAMRAD Randomized GINECO Trial: Evidence for mTORC1 Activation Marker as a Predictive Factor for Everolimus Efficacy in Advanced Breast Cancer. *Annals of Oncology*, **26**, 120-125. http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdu497

[78] Chen, C., Chang, Y.C., Lu, Y.S., Chung, K.P., Huang, C.S., Lu, T.P., Kuo, W.H., Wang, M.Y., Kuo, K.T., Wu, P.F., Hsueh, T.H., Shen, C.Y., Lin, C.H. and Cheng, A.L. (2016) Clinical Relevance of Liver KinaseB1 (*LKB*1) Protein and Gene Expression in Breast Cancer. *Scientific Reports*, **6**, Article Number: 21374.

Scientific Research Publishing

Submit or recommend next manuscript to SCIRP and we will provide best service for you:

Accepting pre-submission inquiries through Email, Facebook, LinkedIn, Twitter, etc.
A wide selection of journals (inclusive of 9 subjects, more than 200 journals)
Providing 24-hour high-quality service
User-friendly online submission system
Fair and swift peer-review system
Efficient typesetting and proofreading procedure
Display of the result of downloads and visits, as well as the number of cited articles
Maximum dissemination of your research work

Submit your manuscript at: http://papersubmission.scirp.org/
Or contact jct@scirp.org

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alessi, D.R., Sakamoto, K., and Bayascas, J.R. (2006). LKB1-dependent signaling pathways. Annu. Rev. Biochem. *75*, 137–163.

Andrade-Vieira, R., Xu, Z., Colp, P., and Marignani, P.A. (2013). Loss of LKB1 expression reduces the latency of ErbB2-mediated mammary gland tumorigenesis, promoting changes in metabolic pathways. PloS One *8*, e56567.

Antonysamy, S., Bonday, Z., Campbell, R.M., Doyle, B., Druzina, Z., Gheyi, T., Han, B., Jungheim, L.N., Qian, Y., Rauch, C., et al. (2012). Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 17960–17965.

Azim, H.A., Kassem, L., Treilleux, I., Wang, Q., El Enein, M.A., Anis, S.E., and Bachelot, T. (2016). Analysis of PI3K/mTOR Pathway Biomarkers and Their Prognostic Value in Women with Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Early Breast Cancer. Transl. Oncol. *9*, 114–123.

Baas, A.F., Boudeau, J., Sapkota, G.P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R., and Clevers, H.C. (2003). Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. EMBO J. *22*, 3062–3072.

Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel, N.N., Batlle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J., and Clevers, H.C. (2004). Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. Cell *116*, 457–466.

Bai, B., Man, A.W.C., Yang, K., Guo, Y., Xu, C., Tse, H.-F., Han, W., Bloksgaard, M., Mey, J.G.R.D., Vanhoutte, P.M., et al. (2016). Endothelial SIRT1 prevents adverse arterial remodeling by facilitating HERC2-mediated degradation of acetylated LKB1. Oncotarget *5*.

Bai, Y., Zhou, T., Fu, H., Sun, H., and Huang, B. (2012). 14-3-3 interacts with LKB1 via recognizing phosphorylated threonine 336 residue and suppresses LKB1 kinase function. FEBS Lett. *586*, 1111–1119.

Baldwin, R.M., Haghandish, N., Daneshmand, M., Amin, S., Paris, G., Falls, T.J., Bell, J.C., Islam, S., and Côté, J. (2014). Protein arginine methyltransferase 7 promotes breast cancer cell invasion through the induction of MMP9 expression. Oncotarget *6*, 3013–3032.

Bao, X., Zhao, S., Liu, T., Liu, Y., Liu, Y., and Yang, X. (2013). Overexpression of PRMT5 Promotes Tumor Cell Growth and Is Associated with Poor Disease Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. J. Histochem. Cytochem. *61*, 206–217.

Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. Mol. Cell *33*, 1–13.

Björnström, L., and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *19*, 833–842.

Blanc, R.S., and Richard, S. (2017). Arginine Methylation: The Coming of Age. Mol. Cell *65*, 8–24.

Bouchekioua-Bouzaghou, K., Poulard, C., Rambaud, J., Lavergne, E., Hussein, N., Billaud, M., Bachelot, T., Chabaud, S., Mader, S., Dayan, G., et al. (2014). LKB1 when associated with methylatedERα is a marker of bad prognosis in breast cancer. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *135*, 1307–1318.

Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Morrice, N.A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A.R., Clevers, H.C., and Alessi, D.R. (2003). MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. EMBO J. *22*, 5102–5114.

Boudeau, J., Scott, J.W., Resta, N., Deak, M., Kieloch, A., Komander, D., Hardie, D.G., Prescott, A.R., van Aalten, D.M.F., and Alessi, D.R. (2004). Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. J. Cell Sci. *117*, 6365–6375.

Chan-Penebre, E., Kuplast, K.G., Majer, C.R., Boriack-Sjodin, P.A., Wigle, T.J., Johnston, L.D., Rioux, N., Munchhof, M.J., Jin, L., Jacques, S.L., et al. (2015). A selective inhibitor of PRMT5 with in vivo and in vitro potency in MCL models. Nat. Chem. Biol. *11*, 432–437.

Chen, H., Lorton, B., Gupta, V., and Shechter, D. (2017). A TGFβ-PRMT5-MEP50 Axis Regulates Cancer Cell Invasion through Histone H3 and H4 Arginine Methylation Coupled Transcriptional Activation and Repression. Oncogene *36*, 373.

Colditz, G.A. (1998). Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. *90*, 814–823.

Colleoni, M., Rotmensz, N., Robertson, C., Orlando, L., Viale, G., Renne, G., Luini, A., Veronesi, P., Intra, M., Orecchia, R., et al. (2002). Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *13*, 273–279.

Collins, S.P., Reoma, J.L., Gamm, D.M., and Uhler, M.D. (2000). LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. Biochem. J. *345 Pt 3*, 673–680.

Dai, X., Xiang, L., Li, T., and Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. J. Cancer *7*, 1281.

Deng, X., Shao, G., Zhang, H.-T., Li, C., Zhang, D., Cheng, L., Elzey, B.D., Pili, R., Ratliff, T.L., Huang, J., et al. (2016). Protein arginine methyltransferase 5 functions as an epigenetic activator of the androgen receptor to promote prostate cancer cell growth. Oncogene.

Dong, L., Sun, L., Zhang, X., Pan, L., Lian, L., Chen, Z., and Zhong, D. (2013). Negative regulation of mTOR activity by LKB1-AMPK signaling in non-small cell lung cancer cells. Acta Pharmacol. Sin. *34*, 314–318.

Dorfman, J., and Macara, I.G. (2008). STRADα Regulates LKB1 Localization by Blocking Access to Importin-α, and by Association with Crm1 and Exportin-7. Mol. Biol. Cell *19*, 1614–1626.

Duncan, K.W., Rioux, N., Boriack-Sjodin, P.A., Munchhof, M.J., Reiter, L.A., Majer, C.R., Jin, L., Johnston, L.D., Chan-Penebre, E., Kuplast, K.G., et al. (2015). Structure and Property Guided Design in the Identification of PRMT5 Tool Compound EPZ015666. ACS Med. Chem. Lett. *7*, 162–166.

Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J., and Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. Cancer Treat. Rev. *38*, 698–707.

Espejo, A.B., Gao, G., Black, K., Gayatri, S., Veland, N., Kim, J., Chen, T., Sudol, M., Walker, C., and Bedford, M.T. (2017). PRMT5 C-terminal Phosphorylation Modulates a 14-3-3/PDZ Interaction Switch. J. Biol. Chem. *292*, 2255–2265.

Forcet, C., Etienne-Manneville, S., Gaude, H., Fournier, L., Debilly, S., Salmi, M., Baas, A., Olschwang, S., Clevers, H., and Billaud, M. (2005). Functional analysis of Peutz–Jeghers mutations reveals that the LKB1 C-terminal region exerts a crucial role in regulating both the AMPK pathway and the cell polarity. Hum. Mol. Genet. *14*, 1283–1292.

Friesen, W.J., Paushkin, S., Wyce, A., Massenet, S., Pesiridis, G.S., Van Duyne, G., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2001). The Methylosome, a 20S Complex Containing JBP1 and pICln, Produces Dimethylarginine-Modified Sm Proteins. Mol. Cell. Biol. *21*, 8289–8300.

Friesen, W.J., Wyce, A., Paushkin, S., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). A Novel WD Repeat Protein Component of the Methylosome Binds Sm Proteins. J. Biol. Chem. *277*, 8243–8247.

Gan, R.-Y., and Li, H.-B. (2014). Recent Progress on Liver Kinase B1 (LKB1): Expression, Regulation, Downstream Signaling and Cancer Suppressive Function. Int. J. Mol. Sci. *15*, 16698–16718.

Gao, G., Dhar, S., and Bedford, M.T. (2017). PRMT5 regulates IRES-dependent translation via methylation of hnRNP A1. Nucleic Acids Res. *45*, 4359.

Gao, G., Dhar, S., and Bedford, M.T. PRMT5 regulates IRES-dependent translation via methylation of hnRNP A1. Nucleic Acids Res.

Gkountela, S., Li, Z., Chin, C.J., Lee, S.A., and Clark, A.T. (2014). PRMT5 is required for human embryonic stem cell proliferation but not pluripotency. Stem Cell Rev. *10*, 230–239.

Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J.C. (2002). Production and Actions of Estrogens. N. Engl. J. Med. *346*, 340–352.

Gu, Z., Li, Y., Lee, P., Liu, T., Wan, C., and Wang, Z. (2012). Protein Arginine Methyltransferase 5 Functions in Opposite Ways in the Cytoplasm and Nucleus of Prostate Cancer Cells. PLoS ONE *7*.

Guderian, G., Peter, C., Wiesner, J., Sickmann, A., Schulze-Osthoff, K., Fischer, U., and Grimmler, M. (2011). RioK1, a New Interactor of Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5), Competes with pICln for Binding and Modulates PRMT5 Complex Composition and Substrate Specificity. J. Biol. Chem. *286*, 1976–1986.

Gurung, B., and Hua, X. (2013). Menin/PRMT5/Hedgehog signaling: A Potential Target for the Treatment of MEN1 Tumors. Epigenomics *5*, 469–471.

Hamilton, N., Márquez-Garbán, D., Mah, V., Fernando, G., Elshimali, Y., Garbán, H., Elashoff, D., Vadgama, J., Goodglick, L., and Pietras, R. (2015). Biologic Roles of Estrogen Receptor-β and Insulin-Like Growth Factor-2 in Triple-Negative Breast Cancer. BioMed Res. Int. *2015*.

Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADα/β and MO25α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. J. Biol. *2*, 28.

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., et al. (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. Physiol. Rev. *87*, 905–931.

Herrmann, J.L., Byekova, Y., Elmets, C.A., and Athar, M. (2011). Liver kinase B1 (LKB1) in the pathogenesis of epithelial cancers. Cancer Lett. *306*, 1–9.

Hezel, A.F., and Bardeesy, N. (2008). LKB1; linking cell structure and tumor suppression. Oncogene *27*, 6908–6919.

Hou, Z., Peng, H., Ayyanathan, K., Yan, K.-P., Langer, E.M., Longmore, G.D., and Rauscher, F.J. (2008). The LIM Protein AJUBA Recruits Protein Arginine Methyltransferase 5 To Mediate SNAIL-Dependent Transcriptional Repression. Mol. Cell. Biol. *28*, 3198–3207.

Houde, V.P., Ritorto, M.S., Gourlay, R., Varghese, J., Davies, P., Shpiro, N., Sakamoto, K., and Alessi, D.R. (2014). Investigation of LKB1 Ser431 phosphorylation and Cys433 farnesylation using mouse knockin analysis reveals an unexpected role of prenylation in regulating AMPK activity. Biochem. J. *458*, 41–56.

Hu, H., Qian, K., Ho, M.-C., and Zheng, Y.G. (2016). Small Molecule Inhibitors of Protein Arginine Methyltransferases. Expert Opin. Investig. Drugs *25*, 335–358.

Institut National Du Cancer (2016). Les cancers en Francce.

Jansson, M., Durant, S.T., Cho, E.-C., Sheahan, S., Edelmann, M., Kessler, B., and La Thangue, N.B. (2008). Arginine methylation regulates the p53 response. Nat. Cell Biol. *10*, 1431–1439.

Javidiparsijani, S., Rosen, L.E., and Gattuso, P. (2016). Male Breast Carcinoma: A Clinical and Pathological Review. Int. J. Surg. Pathol. 1066896916675953.

Julian-Reynier, C. (2011). Prédisposition génétique aux cancers du sein et de l'ovaire - Importance des résultats des tests. médecine/sciences *27*, 657–661.

Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., and Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. Przegląd Menopauzalny Menopause Rev. *14*, 196–202.

Kanda, M., Shimizu, D., Fujii, T., Tanaka, H., Shibata, M., Iwata, N., Hayashi, M., Kobayashi, D., Tanaka, C., Yamada, S., et al. (2016). Protein arginine methyltransferase 5 is associated with malignant phenotype and peritoneal metastasis in gastric cancer. Int. J. Oncol. *49*, 1195–1202.

Kaniskan, H.Ü., and Jin, J. (2017). Recent progress in developing selective inhibitors of protein methyltransferases. Curr. Opin. Chem. Biol. *39*, 100–108.

Korsse, S.E., Peppelenbosch, M.P., and van Veelen, W. (2013). Targeting LKB1 signaling in cancer. Biochim. Biophys. Acta *1835*, 194–210.

Kowalska, K., and Piastowska-Ciesielska, A.W. (2016). Oestrogens and oestrogen receptors in prostate cancer. SpringerPlus *5*.

Kumar, P., and Aggarwal, R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. Arch. Gynecol. Obstet. *293*, 247–269.

Lacroix, M., Messaoudi, S.E., Rodier, G., Le Cam, A., Sardet, C., and Fabbrizio, E. (2008). The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5. EMBO Rep. *9*, 452–458.

Lan, F., Cacicedo, J.M., Ruderman, N., and Ido, Y. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. J. Biol. Chem. *283*, 27628–27635.

Lattouf, H., Poulard, C., Treilleux, I., Hussein, N., Diab-Assaf, M., and Romancer, M.L. (2016). LKB1, A New Biomarker in Breast Cancer. J. Cancer Ther. *07*, 690.

Le réseau NACRe (2015). Estimations de l'incidence et de la mortalité par cancer en France, en Europe et dans le monde.

Le Romancer, M., Treilleux, I., Leconte, N., Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Bouchekioua-Bouzaghou, K., Goddard, S., Gobert-Gosse, S., and Corbo, L. (2008). Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. Mol. Cell *31*, 212–221.

Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.-M., and Corbo, L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. Endocr. Rev. *32*, 597–622.

Levin, E.R., and Pietras, R.J. (2008). Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. *108*, 351–361.

Li, Z., Yu, J., Hosohama, L., Nee, K., Gkountela, S., Chaudhari, S., Cass, A.A., Xiao, X., and Clark, A.T. (2015). The Sm protein methyltransferase PRMT5 is not required for primordial germ cell specification in mice. EMBO J. *34*, 748–758.

van Lier, M.G.F., Wagner, A., Mathus-Vliegen, E.M.H., Kuipers, E.J., Steyerberg, E.W., and van Leerdam, M.E. (2010). High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. Am. J. Gastroenterol. *105*, 1258–1264; author reply 1265.

Lim, W., Hearle, N., Shah, B., Murday, V., Hodgson, S.V., Lucassen, A., Eccles, D., Talbot, I., Neale, K., Lim, A.G., et al. (2003). Further observations on LKB1/STK11 status and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. Br. J. Cancer *89*, 308–313.

Liu, F., Zhao, X., Perna, F., Wang, L., Koppikar, P., Abdel-Wahab, O., Harr, M.W., Levine, R.L., Xu, H., Tefferi, A., et al. (2011). JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 down-regulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. Cancer Cell *19*, 283–294.

Liu, F., Cheng, G., Hamard, P.-J., Greenblatt, S., Wang, L., Man, N., Perna, F., Xu, H., Tadi, M., Luciani, L., et al. (2015). Arginine methyltransferase PRMT5 is essential for sustaining normal adult hematopoiesis. J. Clin. Invest. *125*, 3532–3544.

Liu, L., Siu, F.-M., Che, C.-M., Xu, A., and Wang, Y. (2012). Akt blocks the tumor suppressor activity of LKB1 by promoting phosphorylation-dependent nuclear retention through 14-3-3 proteins. Am. J. Transl. Res. *4*, 175–186.

Lorenzo, A.D., and Bedford, M.T. (2011). Histone Arginine Methylation. FEBS Lett. *585*, 2024.

Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., and Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 11162–11166.

Lumachi, F., Santeufemia, D.A., and Basso, S.M. (2015). Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. World J. Biol. Chem. *6*, 231–239.

Maloney, A., Clarke, P.A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., Koopman, J.-O., Akpan, A., Yang, A., Zvelebil, M., Cramer, R., Stimson, L., et al. (2007). Gene and Protein Expression Profiling of Human Ovarian Cancer Cells Treated with the Heat Shock Protein 90 Inhibitor 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin. Cancer Res. *67*, 3239–3253.

McCarthy, A., Lord, C.J., Savage, K., Grigoriadis, A., Smith, D.P., Weigelt, B., Reis-Filho, J.S., and Ashworth, A. (2009). Conditional deletion of the Lkb1 gene in the mouse mammary gland induces tumour formation. J. Pathol. *219*, 306–316.

McCormack, P.L. (2015). Pertuzumab in HER2-positive breast cancer: a guide to its use. Drugs Ther. Perspect. 1–7.

Mehenni, H., Gehrig, C., Nezu, J., Oku, A., Shimane, M., Rossier, C., Guex, N., Blouin, J.L., Scott, H.S., and Antonarakis, S.E. (1998). Loss of LKB1 kinase activity in Peutz-Jeghers syndrome, and evidence for allelic and locus heterogeneity. Am. J. Hum. Genet. *63*, 1641–1650.

Meister, G., Eggert, C., Bühler, D., Brahms, H., Kambach, C., and Fischer, U. (2001). Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. Curr. Biol. *11*, 1990–1994.

Michel, L.L., Bermejo, J.L., Gondos, A., Marmé, F., and Schneeweiss, A. (2015). T-DM1 as a New Treatment Option for Patients with Metastatic HER2-positive Breast Cancer in Clinical Practice. Anticancer Res. *35*, 5085–5090.

Migliori, V., Müller, J., Phalke, S., Low, D., Bezzi, M., Mok, W.C., Sahu, S.K., Gunaratne, J., Capasso, P., Bassi, C., et al. (2012). Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 136–144.

Mirzania, M. (2016). Approach to the Triple Negative Breast Cancer in New Drugs Area. Int. J. Hematol.-Oncol. Stem Cell Res. *10*, 115–119.

Momcilovic, M., and Shackelford, D.B. (2015). Targeting LKB1 in cancer – exposing and exploiting vulnerabilities. Br. J. Cancer *113*, 574–584.

Morén, A., Raja, E., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2011). Negative Regulation of TGFβ Signaling by the Kinase LKB1 and the Scaffolding Protein LIP1. J. Biol. Chem. *286*, 341–353.

Muhammad, A.B., Xing, B., Liu, C., Naji, A., Ma, X., Simmons, R.A., and Hua, X. (2017). Menin and PRMT5 suppress GLP1 receptor transcript and PKA-mediated phosphorylation of FOXO1 and CREB. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. ajpendo.00241.2016.

Murray, K. (1964). THE OCCURRENCE OF EPSILON-N-METHYL LYSINE IN HISTONES. Biochemistry (Mosc.) *3*, 10–15.

Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L.B., Martin, S., Wedge, D.C., et al. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. Nature *advance online publication*.

Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2001). Mechanisms of estrogen action. Physiol. Rev. *81*, 1535–1565.

Nony, P., Gaude, H., Rossel, M., Fournier, L., Rouault, J.-P., and Billaud, M. (2003). Stability of the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1 requires its binding to the molecular chaperones Hsp90/Cdc37. Oncogene *22*, 9165–9175.

Norum, J.H., Andersen, K., and Sørlie, T. (2014). Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy. Br. J. Surg. *101*, 925–938.

Ollila, S., and Mäkelä, T.P. (2011). The tumor suppressor kinase LKB1: lessons from mouse models. J. Mol. Cell Biol. *3*, 330–340.

O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., and Hansen, U. (2004). Genomic Targets of Nuclear Estrogen Receptors. Mol. Endocrinol. *18*, 1859–1875.

Pal, S., Yun, R., Datta, A., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Kumar, J., Tempst, P., and Sif, S. (2003). mSin3A/Histone Deacetylase 2- and PRMT5-Containing Brg1 Complex Is Involved in Transcriptional Repression of the Myc Target Gene cad. Mol. Cell. Biol. *23*, 7475–7487.

Partanen, J.I., Tervonen, T.A., Myllynen, M., Lind, E., Imai, M., Katajisto, P., Dijkgraaf, G.J.P., Kovanen, P.E., Mäkelä, T.P., Werb, Z., et al. (2012). Tumor suppressor function of Liver kinase B1 (Lkb1) is linked to regulation of epithelial integrity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, E388-397.

Paul, C., Sardet, C., and Fabbrizio, E. (2012). The histone- and PRMT5-associated protein COPR5 is required for myogenic differentiation. Cell Death Differ. *19*, 900–908.

Pesiridis, G.S., Diamond, E., and Van Duyne, G.D. (2009). Role of pICLn in Methylation of Sm Proteins by PRMT5. J. Biol. Chem. *284*, 21347–21359.

Pollack, B.P., Kotenko, S.V., He, W., Izotova, L.S., Barnoski, B.L., and Pestka, S. (1999). The Human Homologue of the Yeast Proteins Skb1 and Hsl7p Interacts with Jak Kinases and Contains Protein Methyltransferase Activity. J. Biol. Chem. *274*, 31531–31542.

Poulard, C., Treilleux, I., Lavergne, E., Bouchekioua-Bouzaghou, K., Goddard-Léon, S., Chabaud, S., Trédan, O., Corbo, L., and Le Romancer, M. (2012). Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers. EMBO Mol. Med. *4*, 1200–1213.

Poulard, C., Corbo, L., Romancer, M.L., Poulard, C., Corbo, L., and Le Romancer, M. (2016). Protein arginine methylation/demethylation and cancer. Oncotarget *7*, 67532–67550.

Pourteimoor, V., Mohammadi-Yeganeh, S., and Paryan, M. (2016). Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. Tumor Biol. *37*, 14479–14499.

Powers, M.A., Fay, M.M., Factor, R.E., Welm, A.L., and Ullman, K.S. (2011). Protein Arginine Methyltransferase 5 accelerates tumor growth by arginine methylation of the tumor suppressor Programmed Cell Death 4. Cancer Res. *71*, 5579.

Prodromou, C. (2016). Mechanisms of Hsp90 regulation. Biochem. J. *473*, 2439–2452.

Ren, J., Wang, Y., Liang, Y., Zhang, Y., Bao, S., and Xu, Z. (2010). Methylation of Ribosomal Protein S10 by Protein-arginine Methyltransferase 5 Regulates Ribosome Biogenesis. J. Biol. Chem. *285*, 12695–12705.

Renoir, J.-M., Marsaud, V., and Lazennec, G. (2013). Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. Biochem. Pharmacol. *85*, 449–465.

Rocca, A., Andreis, D., Fedeli, A., Maltoni, R., Sarti, S., Cecconetto, L., Pietri, E., Schirone, A., Bravaccini, S., Serra, P., et al. (2015). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical efficacy of pertuzumab in breast cancer therapy. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. *11*, 1647–1663.

Rowan, A., Churchman, M., Jefferey, R., Hanby, A., Poulsom, R., and Tomlinson, I. (2000). In situ analysis of LKB1/STK11 mRNA expression in human normal tissues and tumours. J. Pathol. *192*, 203–206.

Sanchez-Cespedes, M. (2007). A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome. Oncogene *26*, 7825–7832.

Sanchez-Olea, R., Emma, F., Coghlan, M., and Strange, K. (1998). Characterization of pICln phosphorylation state and a pICln-associated protein kinase. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. *1381*, 49–60.

Sapkota, G.P., Kieloch, A., Lizcano, J.M., Lain, S., Arthur, J.S., Williams, M.R., Morrice, N., Deak, M., and Alessi, D.R. (2001). Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90(RSK) and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys(433), is essential for LKB1 to suppress cell vrowth. J. Biol. Chem. *276*, 19469–19482.

Sapkota, G.P., Boudeau, J., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., and Alessi, D.R. (2002a). Identification and characterization of four novel phosphorylation sites (Ser31, Ser325, Thr336 and Thr366) on LKB1/STK11, the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome. Biochem. J. *362*, 481–490.

Sapkota, G.P., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., Goodarzi, A.A., Smythe, C., Shiloh, Y., Lees-Miller, S.P., and Alessi, D.R. (2002b). Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. Biochem. J. *368*, 507–516.

Sauvage, F., Messaoudi, S., Fattal, E., Barratt, G., and Vergnaud-Gauduchon, J. (2017). Heat shock proteins and cancer: How can nanomedicine be harnessed? J. Controlled Release *248*, 133–143.

Scoumanne, A., Zhang, J., and Chen, X. (2009). PRMT5 is required for cell-cycle progression and p53 tumor suppressor function. Nucleic Acids Res. *37*, 4965–4976.

de la Serna, I.L., Ohkawa, Y., and Imbalzano, A.N. (2006). Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodellers. Nat. Rev. Genet. *7*, 461–473.

Shackelford, D.B., and Shaw, R.J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. Nat. Rev. Cancer *9*, 563–575.

Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated

kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 3329–3335.

Shen, Y.-A.A., Chen, Y., Dao, D.Q., Mayoral, S.R., Wu, L., Meijer, D., Ullian, E.M., Chan, J.R., and Lu, Q.R. (2014). Phosphorylation of LKB1/Par-4 establishes Schwann cell polarity to initiate and control myelin extent. Nat. Commun. *5*, 4991.

Shen, Z., Wen, X.-F., Lan, F., Shen, Z.-Z., and Shao, Z.-M. (2002). The tumor suppressor gene LKB1 is associated with prognosis in human breast carcinoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *8*, 2085–2090.

Smith, D.P., Spicer, J., Smith, A., Swift, S., and Ashworth, A. (1999). The mouse Peutz-Jeghers syndrome gene Lkb1 encodes a nuclear protein kinase. Hum. Mol. Genet. *8*, 1479–1485.

Smith, D.P., Rayter, S.I., Niederlander, C., Spicer, J., Jones, C.M., and Ashworth, A. (2001). LIP1, a cytoplasmic protein functionally linked to the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. Hum. Mol. Genet. *10*, 2869–2877.

Stopa, N., Krebs, J.E., and Shechter, D. (2015). The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *72*, 2041–2059.

Sun, L., Wang, M., Lv, Z., Yang, N., Liu, Y., Bao, S., Gong, W., and Xu, R.-M. (2011). Structural insights into protein arginine symmetric dimethylation by PRMT5. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 20538–20543.

Tae, S., Karkhanis, V., Velasco, K., Yaneva, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sif, S. (2011). Bromodomain protein 7 interacts with PRMT5 and PRC2, and is involved in transcriptional repression of their target genes. Nucleic Acids Res. *39*, 5424–5438.

Taliaferro-Smith, L., Nagalingam, A., Zhong, D., Zhou, W., Saxena, N.K., and Sharma, D. (2009). LKB1 is required for adiponectin-mediated modulation of AMPK-S6K axis and inhibition of migration and invasion of breast cancer cells. Oncogene *28*, 2621–2633.

Tee, W.-W., Pardo, M., Theunissen, T.W., Yu, L., Choudhary, J.S., Hajkova, P., and Surani, M.A. (2010). Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency. Genes Dev. *24*, 2772–2777.

Tinoco, G., Warsch, S., Glück, S., Avancha, K., and Montero, A.J. (2013). Treating Breast Cancer in the 21st Century: Emerging Biological Therapies. J. Cancer *4*, 117–132.

Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Annu. Rev. Biochem. *63*, 451–486.

Wang, Y., Li, Q., Liu, C., Han, F., Chen, M., Zhang, L., Cui, X., Qin, Y., Bao, S., and Gao, F. (2015). Protein Arginine Methyltransferase 5 (Prmt5) Is Required for Germ Cell Survival During Mouse Embryonic Development. Biol. Reprod. *92*, 104.

Weinberg, F., Reischmann, N., Fauth, L., Taromi, S., Mastroianni, J., Köhler, M., Halbach, S., Becker, A.C., Deng, N., Schmitz, T., et al. (2017). The Atypical Kinase RIOK1 Promotes Tumor Growth and Invasive Behavior. EBioMedicine *20*, 79–97.

Wu, Y., Wang, Z., Zhang, J., and Ling, R. (2017). Elevated expression of protein arginine methyltransferase 5 predicts the poor prognosis of breast cancer. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med. *39*, 1010428317695917.

Xiao, J., Zou, Y., Chen, X., Gao, Y., Xie, M., Lu, X., Li, W., He, B., He, S., You, S., et al. (2016). The Prognostic Value of Decreased LKB1 in Solid Tumors: A Meta-Analysis. PLoS ONE *11*.

Xie, Z., Dong, Y., Scholz, R., Neumann, D., and Zou, M.-H. (2008). Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. Circulation *117*, 952–962.

Xie, Z., Dong, Y., Zhang, J., Scholz, R., Neumann, D., and Zou, M.-H. (2009). Identification of the serine 307 of LKB1 as a novel phosphorylation site essential for its nucleocytoplasmic transport and endothelial cell angiogenesis. Mol. Cell. Biol. *29*, 3582–3596.

Yang, Y., and Bedford, M.T. (2013). Protein arginine methyltransferases and cancer. Nat. Rev. Cancer *13*, 37–50.

Yang, F., Wang, J., Ren, H., Jin, J., Wang, A., Sun, L., Diao, K., Wang, E., and Mi, X. (2015). Proliferative role of TRAF4 in breast cancer by upregulating PRMT5 nuclear expression. Tumor Biol. *36*, 5901–5911.

Zeqiraj, E., Filippi, B.M., Deak, M., Alessi, D.R., and van Aalten, D.M.F. (2009). Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. Science *326*, 1707–1711.

Zhang, H.-T., Zeng, L.-F., He, Q.-Y., Tao, W.A., Zha, Z.-G., and Hu, C.-D. (2016). The E3 ubiquitin ligase CHIP mediates ubiquitination and proteasomal degradation of PRMT5. Biochim. Biophys. Acta *1863*, 335.

Zhao, R.-X., and Xu, Z.-X. (2014). Targeting the LKB1 Tumor Suppressor. Curr. Drug Targets *15*, 32–52.

Zheng, B., Jeong, J.H., Asara, J.M., Yuan, Y.-Y., Granter, S.R., Chin, L., and Cantley, L.C. (2009). Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. Mol. Cell *33*, 237–247.

Zhou, W., Zhang, J., and Marcus, A.I. (2014). LKB1 Tumor Suppressor: Therapeutic Opportunities Knock when LKB1 Is Inactivated. Genes Dis. *1*, 64–74.

Zhuang, Z.-G., Di, G.-H., Shen, Z.-Z., Ding, J., and Shao, Z.-M. (2006). Enhanced expression of LKB1 in breast cancer cells attenuates angiogenesis, invasion, and metastatic potential. Mol. Cancer Res. MCR *4*, 843–849.

Zu, Y., Liu, L., Lee, M.Y.K., Xu, C., Liang, Y., Man, R.Y., Vanhoutte, P.M., and Wang, Y. (2010). SIRT1 promotes proliferation and prevents senescence through targeting LKB1 in primary porcine aortic endothelial cells. Circ. Res. *106*, 1384–1393.