



HAL
open science

Exploration des fonctions de la lysine méthyltransférase SMYD2 dans la dissémination métastatique du cancer du sein

Alexandre Casanova

► **To cite this version:**

Alexandre Casanova. Exploration des fonctions de la lysine méthyltransférase SMYD2 dans la dissémination métastatique du cancer du sein. Cancer. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALV062 . tel-03787897

HAL Id: tel-03787897

<https://theses.hal.science/tel-03787897>

Submitted on 26 Sep 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Biologie du développement - Oncogénèse

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Alexandre CASANOVA

Thèse dirigée par **Pierre HAINAUT**
et codirigée par **Nicolas REYNOIRD**, chercheur, Université
Grenoble Alpes

préparée au sein du **Laboratoire IAB : Epigenetics,
Environment, Cell Plasticity, Cancer (UGA / Inserm U1209 /
CNRS UMR 5309)**
dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Exploration des fonctions de la lysine méthyltransférase SMYD2 dans la dissémination métastatique du cancer du sein

SMYD2 lysine methylation signaling in breast cancer metastasis

Thèse soutenue publiquement le **25 novembre 2021**,
devant le jury composé de :

Monsieur Pierre HAINAUT

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Grenoble Alpes, Co-
directeur de thèse

Madame Catherine GHEZZI

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Grenoble Alpes,
Présidente

Monsieur Jonathan WEITZMAN

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Paris 7 - Denis Diderot,
Rapporteur

Madame Céline VALLOT

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Paris Centre,
Rapporteuse

Monsieur Thierry DUBOIS

INGENIEUR DE RECHERCHE, Institut Curie, Examinateur

Monsieur Laurent BLANCHOIN

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes, Examinateur



Remerciements

Si l'origine du remerciement fait initialement référence au salaire où à la récompense, son champ sémantique ne prend sa signification actuelle qu'à partir de la moitié du XVIème siècle, dans Les Epigrammes de Clément Marot.

Dans toute sa contemporanéité, je souhaiterais remercier en tout premier lieu mes co-directeurs de thèse, Nicolas Reynoird et Pierre Hainaut, pour m'avoir accueilli au sein de cette grande équipe. Je tiens particulièrement à remercier Nico, qui m'a vu évoluer au cours de ces quatre dernières années. Merci d'avoir aiguisé mon esprit critique et m'avoir poussé à être sans cesse plus exigeant avec ce qu'on sort de la « bench ». Merci d'avoir su prêter l'oreille quand je commençais à ricocher dans tous les sens. Un petit Saint-Nectaire et sa remet les idées en place !

Je voudrais remercier les membres du jury qui m'honore de leur présence, et d'avoir su porter un œil critique sur ce travail de thèse.

Merci à tout le Hainaut lab. Sandrine, toujours là pour gérer le labo, qui serait devenu un paysage apocalyptique sans toi. Merci pour ta bonne humeur, toujours au rendez-vous. Emilie, merci de m'avoir de si nombreuses fois conseillé sur mon avenir en post-doc, et ce toujours avec le sourire. Sakina, je resterai JC, merci pour ta gentillesse incroyable, pour tous les petits gâteaux qui parsemait mon quotidien. Chantal, à fond dans le génotypage, merci pour ton écoute toujours bienveillante. Anthony, le philosophe à deux encablures de la machine à café. Bénédicte, et ses spectres RMN où on ne comprend rien. Andres, arrête de pisser dans le labo.

Le KMT' lab. Presque présent à sa naissance, j'aurais eu l'honneur et la joie de connaître tous ses membres. Gaël, mon premier comparse de bench, le bichon a bien grandi ! Valentina, « Tina », best bench-mate ever. All the weekend we passed in this lab... Always there for each other. Thank you sis'! See you in one year for the weddinggggg. Sabeen, the T-Rex is here, thank you for your smile, your half-half and see you for the next pastis. Tanveer, the strong guy, a comet in the lab! Jess, je ne parasiterais plus le bureau avec tout mon bordel, mais je sais que je vais te manquer. Big-up à la carotte. Je passe la main à Ludivine, tu vas tout déchirer pour ton PhD, tu vas t'éclater ici ! L'atmosphère du KMT' lab va me manquer.

Evidemment on ne s'arrête pas là. Loin de là. Clovis, Paul, les mythes grenoblois, les runs de 50 bornes à la pause dej' c'est toujours une bonne idée. Et Paul, on va faire raquer

l'administration l'année prochaine pour faire LE congrès des doctorants ! Olivier, un cerveau à 100 à l'heure, des idées, trop d'idées, non jamais trop, on fonce. C'est beau, ça glisse, c'est mécanique. Merci pour ton inspiration. Christiane. In-clo-na-ble. Je me rattraperais pour les trois-cents kilos de chocolat. Ivan, the coding guy! Man, your script is working, you can hack the cell's nucleus now! Lydia, le sourire à l'angle de l'étage. Merci de ta gentillesse toujours là. Momo, habibi, merci pour ton énergie. Raph, un ovni qui dessine, joue de la guitare et purifie des méga-complexes dans du pain. On ira glisser une pinte avec Anton. Tristan, Titou. Incroyable. Merci d'avoir su me repêcher à chaque fois. On va aller taper du 7b à Poussebout pour fêter ça. Ari, you made politics always beautiful. Camilla, I protect you in your dreams! Fra', un peu stressé, mais bon t'es calabrais alors ça passe. Merci man. Au-delà de la science, t'es un gars en or. Dome. Dome. Shit guy. Every day. Start the morning in the lab and finish at Dr. D for the two beers. Problems starts after three, we know that. You were my inspiration on how science should behave. Thank man for all days, weekend, and night to talk and think about how humanity looks sciences and sciences speaks for human. Our roads will cross again. Loneliness is nothing and everything at the same time.

L'IAB c'est une grande famille. On se connaît presque tous, on s'envoie des cacahouètes à travers les étages de ce donuts géant. Des apéro clandestins, les « methylations » meeting (yeah you're red, you're methylated !), on se retrouve autour d'une table, ou sans, peu importe, et on parle science jusqu'au matin. On rêve, on invente, on délire. La science comme une « serious joke », c'est la confrontation entre les résultats et le besoin de découvrir quelque chose. Parfois on se perd entre les deux, mais dans ce dédale circulaire, toujours surgit une bonne âme pour partager un peu de vie... et un peu de bière aussi. Merci à l'IAB, merci pour cette aventure.

Hum. Il reste quand même une grande place. Thib, frérot dans l'âme, toujours dans les parages. Merci mon grand d'avoir toujours été là depuis 10 ans, et pendant cette thèse. Les bivouacs dans le Mont-Blanc, sur des îles, perdus parfois... Ma famille, mes parents, toto, les nains. Impossible d'imaginer cette aventure sans vous. Toujours là.

Oka. Cette thèse, elle est inscrite en nous. Pas que dans sa science, mais dans son temps. Elle nous aura vu naître, et maintenant, il est temps de la laisser derrière. Un petit caillou sur le chemin. Un si beau chemin. Merci d'avoir été là, pas seulement pour tailler ce petit caillou mais surtout pour rêver avec moi de ce chemin. Cambridge nous attend !

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des abréviations	9
Préface	15
I. La régulation par méthylation des lysines dans les cancers	17
1. La signalisation par méthylation des lysines	19
1.1. Les acteurs de la signalisation	19
1.2. Du « code histone » au méthylome, une épopée technique	25
2. Cibler la méthylation des lysines dans les cancers	32
2.1. Importance physiologique de la méthylation des lysines	32
2.2. La méthylation des lysines dans les cancers.....	33
2.3. L'inhibition de la signalisation.....	35
Résumé	37
II. La lysine méthyltransférase SMYD2	38
1. Famille et structure	39
1.1. La famille des SMYDs.....	39
1.2. SMYD2 : une structure expliquant la promiscuité	41
2. Diversité des substrats de SMYD2	42
2.1. Une histone méthyltransférase ?.....	42
2.2. Substrats non-histones gravitant autour de la chromatine.....	44
2.3. Une KMT cytoplasmique	47
2.4. Le méthylome de SMYD2	49
3. Rôles physio-pathologiques de SMYD2.....	50
3.1. Rôle de SMYD2 dans la physiopathologie cardiovasculaire.....	50
3.2. Rôle de SMYD2 dans les cancers.....	52
3.3. Développement des inhibiteurs de SMYD2.....	54
Résumé	56
III. La migration dans le cancer du sein métastatique.....	57
1. Pathologie et traitement du cancer du sein métastatique.....	58
1.1. Classer les cancers du sein	58
1.2. La dissémination métastatique mammaire	62
1.3. Traitement du cancer du sein métastatique	65
2. La plasticité de la migration des cellules cancéreuses.....	67
2.1. Les modes de migration.....	67
2.2. Plasticité de la migration au cours de la dissémination métastatique	75
Résumé	79

IV.	BCAR3, un adaptateur moléculaire	80
1.	Le complexe BCAR3/BCAR1	81
1.1.	La famille des BCARs	81
1.2.	BCAR1, un échafaudage élastique	82
1.3.	BCAR3, un adaptateur	84
2.	BCAR3, au carrefour de signalisations multiples	86
2.1.	Contexte physio-pathologique.....	86
2.2.	BCAR3 : la résistance aux anti-œstrogènes	87
2.3.	BCAR3 dans la migration cellulaire	88
	Résumé	91
V.	Les formines FMNLs, des polymérasés d'actine au cours de la migration	92
1.	La polymérisation d'actine dans la migration	93
1.1.	De l'actine globulaire au filament	93
1.2.	Exemple : le lamellipode	95
2.	Les formines, des polymérasés d'actines	97
2.1.	La famille des formines	97
2.2.	Structure des formines et régulation	98
2.3.	Mécanismes de la polymérisation d'actine par les formines	99
3.	Les FMNLs, des acteurs de la plasticité migratoire.....	101
3.1.	Structure et activité polymérase des FMNLs	101
3.2.	Localisation et activation des FMNLs.....	103
3.3.	Les FMNLs dans le lamellipode et la migration	104
3.4.	Les FMNLs dans les cancers : des agents pro-métastatiques	105
	Résumé	107
VI.	Objectifs de thèse	109
VII.	Résultats.....	110
	<i>SMYD2 is critical for breast cancer metastatic spreading.</i>	119
	<i>SMYD2 methylates BCAR3 in breast cancer cells.</i>	120
	<i>SMYD2-BCAR3 signaling promotes cell migration and invasiveness.</i>	122
	<i>Lysine methylation of BCAR3 recruits FMNLs</i>	124
	<i>BCAR3 methylation recruits FMNLs to lamellipodia and regulate cytoskeleton protrusions.</i>	127
	<i>SMYD2-BCAR3 signaling drive breast cancer metastasis</i>	129
	<i>SMYD2 pharmacologic inhibition prevents breast cancer metastasis</i>	130
	FIGURE PANELS	169
VIII.	Discussion et perspective	183
	Conclusion	200
	Annexes.....	201

1. Analyse structurale du nouveau domaine lecteur de méthylation des FMNLs.....	203
2. Etude de la dynamique des marques de méthylation de p53 dans les cancers conservant un <i>TP53</i> sauvage	204
3. Etude du rôle de la méthylation de l'ubiquitine ligase RNF113A dans la résistance aux agents alkylants dans le cancer du poumon	206
Revue	207
References	208

Liste des abréviations

7 β S : 7-Beta strand

Akt (alias PKB) : RAC-alpha serine/threonine-protein kinase

AR : Androgen Receptor

ARGEF9b : Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor 9

ARP2/3 : Actin Related Protein 2/3

ASHL1 : ASH1-Like Histone Lysine Methyltransferase

ATP6V1G : A-type proton ATPase subunit G

BCAR1/2/3/4 : Breast Cancer Anti-estrogen Resistance protein 1/2/3/4

BMPR2 : Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2

CASS4 : CAS scaffolding protein family member 4

CAVIN1 : Caveolae Associated protein 1

CBX4 : Chromobox 4

CCAR2 : Cell Cycle And Apoptosis Regulator 2

CDC42 : Cell Division Control protein 42 homolog

CDC5L : Cell Division Cycle 5 Like

CDK4/6 : Cyclin-dependent kinase 4/6

COMPASS : Complex Proteins Associated with Set1

Crk : CRK Proto-Oncogene, Adaptor Protein

CRM1 alias (XPO1) : Chromosomal Maintenance 1, alias Exportin-1

CTC : Cellules Tumorales Circulantes

DBNL : Drebrin-Like

DCAF1 : DDB1 And CUL4 Associated Factor 1

DIAPH1/2/3 : Diaphanous 1/2/3

Domaine (3x)-MBT : (Triple) Malignant Brain Tumor

Domaine BAH : Domaine Bromo-Adjacent omology

Domaine DAD : Diaphanous Autoinhibitory Domain

Domaine GBD : GTPase Binding Domain

Domaine HEAT : Huntingtin, elongation factor 3 (EF3), protein phosphatase 2A (PP2A), and the yeast kinase TOR1

Domaine JmjC : Jumonji C

Domaine MYND : Myeloid-Nervy-DEAF1

Domaine PDZ : Postsynaptic density protein 95/Drosophila disc large tumor suppressor 1/Zonula occludens-1 protein

Domaine PH : Pleckstrin Homology

Domaine PHD : Plant Homeodomain

Domaine PWWP : Proline/Tryptophane/Tryptophane/Proline

Domaine SH2 : Src Homology 2

Domaine SH3 : Src Homology 3

Domaine TPR : Tetratricopeptide-repeats

Domaine FH1/2/3 : Formin Homology 1/2/3

DOT1L : DOT1 Like Histone Lysine Methyltransferase

E2F1 : E2F Transcription Factor 1

ECM : Matrice Extracellulaire

EED : Embryonic Ectoderm Development Polycomb Repressive Complex 2 Subunit

EEF2 : Eukaryotic Translation Elongation Factor 2

EFS : Embryonal Fyn-associated substrate

EGF : Epidermal Growth Factor

EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition

ER : Estrogen Receptor

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

EZH2 : Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit

FAK : Focal Adhesion Kinase

FDA : Food and Drugs Administration

FHOD1/2 : Formin Homology Domain containing 1/2

FMN1/2 : Formin 1/2

FMNL1/2/3 : Formin-Like proteins 1/2/3

FOXM1 : Forkhead Box M1

FRL : Formin-Related gene in Leukocytes

G9A (EHMT2) : Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2

GAPs : GTPases-Activating Proteins

GATA4 : GATA Binding Protein 4

GEFs : Guanine nucleotide Exchange Factors

GEMIN5 : Gem Nuclear Organelle Associated Protein 5

H3K4/9/27/36/79me1/2/3 : Histone 3 Lysine 4/9/27/36/79 mono-/di-/tri-méthyl

HeLa : Henrietta Lacks

HER2 (alias ERBB2) : Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2

HER3 : Human Epidermal growth factor Receptor 3

HGF : Hepatocyte growth factor

HIF1 : Hypoxia-Inducible Factor 1

HP1 : Heterochromatin Protein 1

HSP90 : Heat Shock Protein 90

IDR : Intrinsically Disordered Region

IHC : Immunohistochimie

INCA : Institut National de la recherche contre le Cancer

INF1/2 : Inverted Formin 1/2

KDM : Lysine Déméthylase

KDM2, KDM4 KDM5 et KDM7 : Lysine Déméthylases 2/4/5/7

KIF5B : Kinesin-1 heavy chain

KLC1 : Kinesin-1 Light Chain

KMT : Lysine Méthyltransférase

L3MBTL1 : Lethal-(3)-Malignant Brain Tumor-like protein 1

LSD1/2 : Lysine-Specific histone Demethylase 1A/1B

MAP3K2 : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 2

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MAPKAPK3 : MAPK Activated Protein Kinase 3

MAPT : Microtubule-Associated Protein Tau

MAT : Transition mésoenchymo-amiboïde

MCF-7 : Michigan Cancer Foundation-7

MDA-MB 157/231/453/468 : MD Anderson-Metastatic Breast 157/231/453/468

MET : Transition Mésoenchymo-Epithéliale

METTL3/13/14 : N6-Adenosine-Methyltransferase 3/13/14

MiR (alias miRNA) : micro-ARN

MLL1 : Mixed lineage leukemia protein-1

MMPs : Matrix metalloproteinases

MMTV-PyMT : Mouse Mammary Tumor Virus-Polyoma Middle Tumor-Antigen

MYPT1 : Myosin phosphatase target subunit 1
NCOA3 : Nuclear Receptor Coactivator 3
NEDD9: Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated 9
NRG1 : Neuregulin 1
NSD1/2 : Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1/2
NSP1/2/3 Novel SH2-containing Proteins
N-WASP : Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
OSBPL3 : Oxysterol-binding protein 3
p130Cas (alias BCAR1) : protein of 130 kDa - Crk-Associated Substrate
PDAC : Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PDB : Protein Data Bank
PDX : Patient-Derived-Xenograft
PER2 : Period Circadian Regulator 2
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinases
PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC : Protein kinase C
PNUTS : Phosphatase 1 NUclear Targeting Subunit
PR : Progesterone Receptor
PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2
PRMT11 : Protein Arginine N-Methyltransferase 11
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTM : Post-Translational Modification
PTP α : Protein Tyrosine Phosphatase alpha
Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Ral :
Rap1 : Ras-proximate-1
RAPGEF1 : Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 1
RAS : Rat sarcoma virus
RhoC : Ras Homolog Family Member C
Rho-GTPase : Ras homolog - Guanosine-5'-triphosphate hydrolase
RNF113A : Ring Finger Protein 113A
ROR α : Retinoic acid-related Orphan Receptor Alpha

SAM : S-Adénosyl L-Méthionine

SET: Suppressor of variegation, Enhancer of Zeste, Trithorax

SETD1/2/3/5/6/7/8 : SET Domain Containing 1/2/3/5/6/7/8

SETDB1/2 : SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1/2

SETMAR : SET Domain And Mariner Transposase Fusion Gene

SILAC : Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture

SMYD1/2/3/4/5 : SET and MYND domain-containing proteins 1/2/3/4/5

SNIP1 : Smad Nuclear Interacting Protein 1

SRC :

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

STUB1 : STIP1 Homology And U-Box Containing Protein 1

SUM159-M1a :

SUV39H1 : Suppressor of Variegation 3.9 Homolog 1

SUV40H1 : Suppressor of Variegation 4.0 Homolog 1

SUZ12: Suppressor of Zeste 12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit

TCGA : The Cancer Genome Atlas

TMA : Tissue Micro Array

TNF α : Tumour Necrosis Factor alpha

TP53 : Tumour Suppressor 53

TRERF1 (alias BCAR2) : Transcriptional Regulating Factor 1

TUBB : Tubulin Beta Class I

TUBB4B : Tubulin Beta 4B Class IVb

TUDOR :

UTP14A : U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A

WAVE : WASP-family verprolin homologous protein

XPO1 (alias CRM1) : Exportin 1

YAP1 : Yes1 Associated transcriptional regulator

Préface

« Et sinon, tu travailles sur quoi? »

« La méthylation dans les cancers, le cancer du sein plus particulièrement, et... »

« ...La méthylation de l'ADN ? »

« Non. »

« La méthylation des histones alors ? »

« Non, toujours pas. »

« Ah, bah non je ne vois pas. »

La méthylation des lysines des protéines non-histones... Bien que je n'aie jamais apprécié cette nomenclature, visant à opposer protéines histones et non-histones, je me consolais souvent en me rappelant de la raison de cette triste fracture, au moins elle était didactique. D'un côté les histones, de l'autre... le reste.

Tout au long de ma thèse, j'ai pu apprécier à quel point la signalisation des lysines représentait en réalité un continuum. Aussi bien dans ses mécanismes que dans ses fonctionnalités, cette signalisation obéissait à des principes conservés à l'ensemble du protéome. Historiquement énoncés dans le cadre des histones, ces principes ont permis de comprendre comment les incroyables propriétés plastiques de la chromatine étaient régulées à l'échelle moléculaire. L'idée de s'abstraire de la chromatine et d'étudier ces mécanismes fut ainsi pour moi la source d'une grande inspiration. Lorsque mon directeur de thèse, Nicolas Reynoird, me proposa ce stage de Master, sur la méthylation des lysines de protéines non-histones ; j'eus ces yeux. Ronds. Puis, je m'y suis intéressé. Des premières « taches » sur les films d'autoradiographie dans l'étroit local du bâtiment Jean Roget, à l'analyse globale des « méthylomes » par spectrométrie de masse, en passant par l'analyse structurale de ces protéines qui « lisent » la méthylation, l'aventure commençait.

I. La régulation par méthylation des lysines dans les cancers

Juillet 1959. Une tache sur un papier chromatographique après une isolation de la flagelline, une protéine de *Salmonella*. Une tache inattendue, déviant sensiblement de ce que l'on attendrait des lysines de cette protéine (**Figure 1**). Une tache interprétée par Ambler et Rees comme étant un nouvel acide aminé, l'épsilon-N-méthyl-lysine (Ambler and Rees 1959). Cette tache signalait alors la naissance d'une nouvelle modification post-traductionnelle des protéines : la méthylation des lysines.

Malgré la découverte précoce de cette marque, l'intérêt pour la méthylation des lysines est en réalité relativement récent. Débutant dans les années 2000, avec l'avènement de l'épigénétique et de l'implication de la méthylation dans la régulation de la chromatine et du « code histone » (Jenuwein and Allis 2001) ; les techniques de protéomiques à grande échelle permettent désormais d'apprécier l'incroyable diversité des protéines modifiées par méthylation (Lanouette et al. 2014). Le rythme effréné de cette identification de masse a d'ailleurs largement outrepassé celui de la caractérisation fonctionnelle de ces modifications. Exemple éloquent, ce n'est que 71 ans plus tard que le rôle de la méthylation de la flagelline identifiée par Ambler and Rees est découvert. La méthylation massive de la flagelline au niveau de 16 différentes lysines de l'extrémité C-terminale permet à la bactérie d'adhérer et d'envahir son hôte épithélial bien plus facilement (Horstmann et al. 2020).

Dans ce chapitre, nous allons voir comment la méthylation des lysines est structurée, quels sont les acteurs orchestrant sa dynamique, quels sont les méthodes actuelles permettant de l'étudier et enfin comment elle a changé le paysage thérapeutique de certaines pathologies, tels que les cancers.

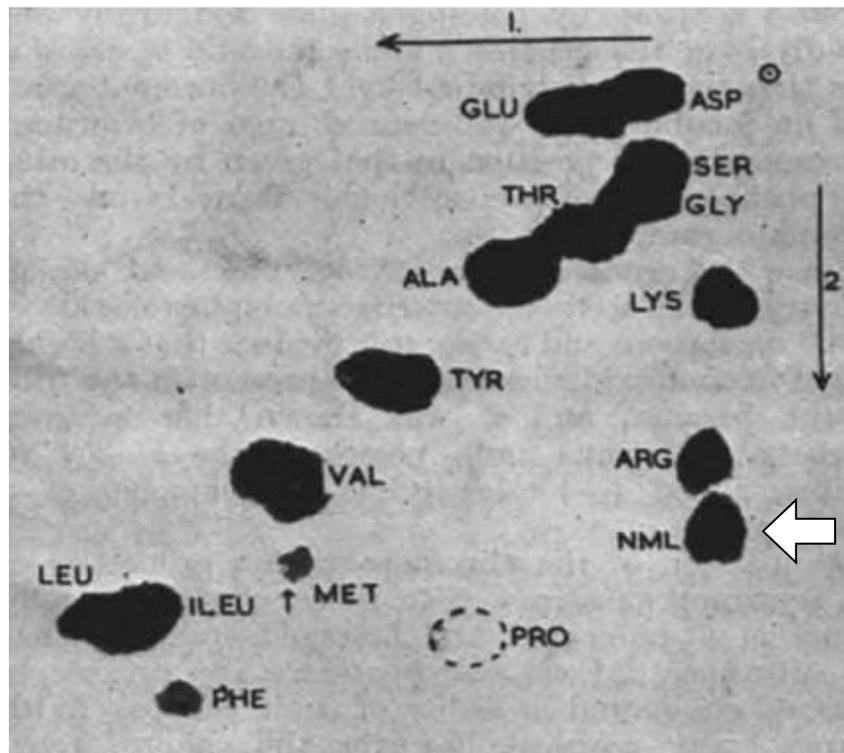


Figure 1. Identification originelle de la méthylation des lysines (NML, eg. N-Méthyl-Lysine). Résultat original issu des travaux de Ambler et Rees (Nature, 1959). Il s'agit d'une chromatographie sur papier, ou les auteurs ont fait migrer un hydrolysate de flagelline issue de Salmonella. La « tache », inscrite NML (indiquée par la flèche), correspond à une migration inattendue de la lysine, et assimilée à une lysine méthylée.

1. La signalisation par méthylation des lysines

1.1. Les acteurs de la signalisation

1.1.1. La lysine dans tous ses états : mono-, di- et tri-méthylation

Les lysines sont des acides aminés polaires, chargés positivement à pH physiologique. La réactivité de leur amine-ε, couplée au fait qu'elles soient généralement positionnées dans des régions exposées des protéines, font des lysines des espèces hautement susceptibles aux diverses modifications post-traductionnelles (PTMs). Parmi les modifications identifiées sur les lysines, on retrouve la méthylation, l'acétylation, différents stades d'acylation ou encore l'adjonction de chaînes polypeptidiques variables telles que l'ubiquitinylation ou la SUMOylation. Mais ce qui fait de la méthylation une modification particulière, c'est que d'une part l'addition des groupes méthyle ne changent pas la charge positive portée par l'amine-ε, et d'autre part, la petite taille de la modification ne génère qu'une contrainte stérique minimale (Luo 2018).

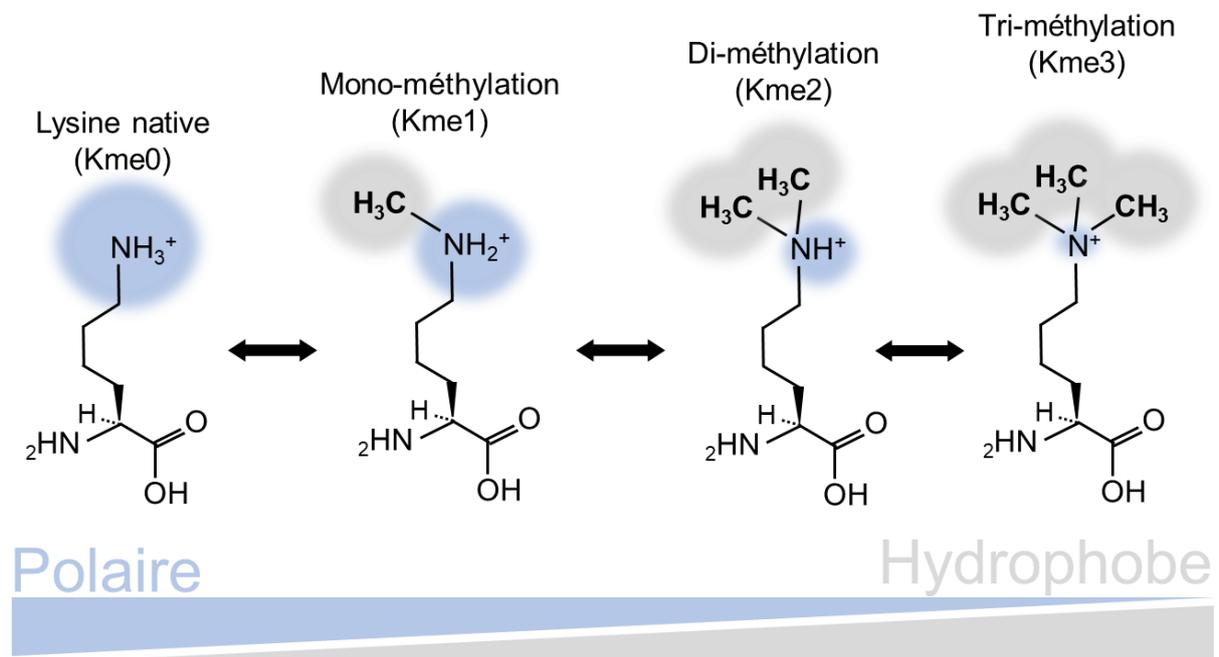


Figure 2. Valence et caractéristiques biochimiques des lysines méthylées. Dans ce schéma, la lysine est représentée dans ses différents états de méthylation, de la mono-méthylation (Kme1) à la tri-méthylation (Kme3). Le caractère hydrophobe de l'amine primaire augmente avec le degré de méthylation, tandis que son caractère polaire, à l'inverse diminue.

Un point central de cette signalisation est que l'amine- ϵ de la lysine peut être méthylée jusqu'à trois fois, on parle alors respectivement de mono-, di- et tri-méthylation. Cette augmentation de valence va avoir une répercussion sur la réactivité de la lysine, et notamment, comme nous le verrons par la suite, sur la façon dont la lysine peut s'engager dans une interaction (Andrews, Strahl, and Kutateladze 2016). Par exemple, tandis que la lysine native peut engager jusqu'à 3 liaisons hydrogène, les lysines méthylées ne pourront en engager que deux, une, voire aucune, en cas de tri-méthylation. De plus la valence de la méthylation augmente de façon graduelle l'hydrophobicité de la lysine, tandis qu'elle diminue la capacité de la lysine à engager son cation dans une interaction électrostatique (Luo 2018) (**Figure 2**). Ceci-étant dit, la méthylation des lysines ne se déroule pas spontanément dans des conditions physiologiques...

1.1.2. Les Lysine Méthyltransférases, les « writers »

Si l'alkylation des amines- ϵ des lysines se déroule théoriquement spontanément à pH basique, le pH physiologique rend en revanche quasiment impossible une telle réaction. Ainsi, afin de contourner les contraintes liées à la déprotonation, puis la substitution du proton par le groupe méthyl, la méthylation des lysines à l'état physiologique implique la présence de catalyseurs protéiques que l'on appelle les lysines méthyltransférases (KMTs).

Les KMTs sont des enzymes de la classe des transférases, catalysant le transfert d'un groupe méthyl d'un co-facteur donneur, le SAM (S-adenosyl-L-Méthionine), vers la lysine cible d'une protéine, également appelé substrat. Pour cela, la poche catalytique de la KMT contient une cavité hydrophobe constituée d'acides aminés aromatiques chargés de lier la chaîne latérale de la lysine du substrat. Une tyrosine, cruciale, va quant à elle recruter le SAM et le maintenir à proximité de l'amine- ϵ dans la configuration linéaire requise à la réaction de substitution nucléophile de méthylation (Temimi et al. 2017).

Bien que l'existence de lysines méthyltransférases était déjà pressentie dans des extraits nucléaires ou ribosomiaux (Comb, Sarkar, and Pinzino 1966), ce n'est qu'au tournant du millénaire que la première KMT est mise en évidence. Une première étude, qui passe sous les radars de la communauté scientifique, identifie la protéine méthyltransférase Rubisco comme la première KMT (P. Wang, Royer, and Houtz 1995). Puis, les laboratoires de T. Jenuwein et C. D. Allis découvrent les propriétés catalytiques du domaine SET (Suppressor of variegation, Enhancer of Zeste, Trithorax) de la protéine SUV39H1, et son importance fonctionnelle dans la perte du mosaïsme par effet de position (« position effect variegation »), via la méthylation de H3K9 (Rea et al. 2000). Deux ans plus tard, une

protéine sans domaine SET, la protéine DOT1L est identifié comme KMT pouvant catalyser la méthylation de H3K79 (Feng et al. 2002; van Leeuwen, Gafken, and Gottschling 2002). Le domaine catalytique impliqué dans cette réaction sera plus tard assimilé à un domaine à 7 feuillets- β (7β S) (Min et al. 2003). Ainsi, dans le protéome, deux domaines ont été spécifiquement annotés avec une activité lysine méthyltransférase : le domaine SET et le domaine 7β S.

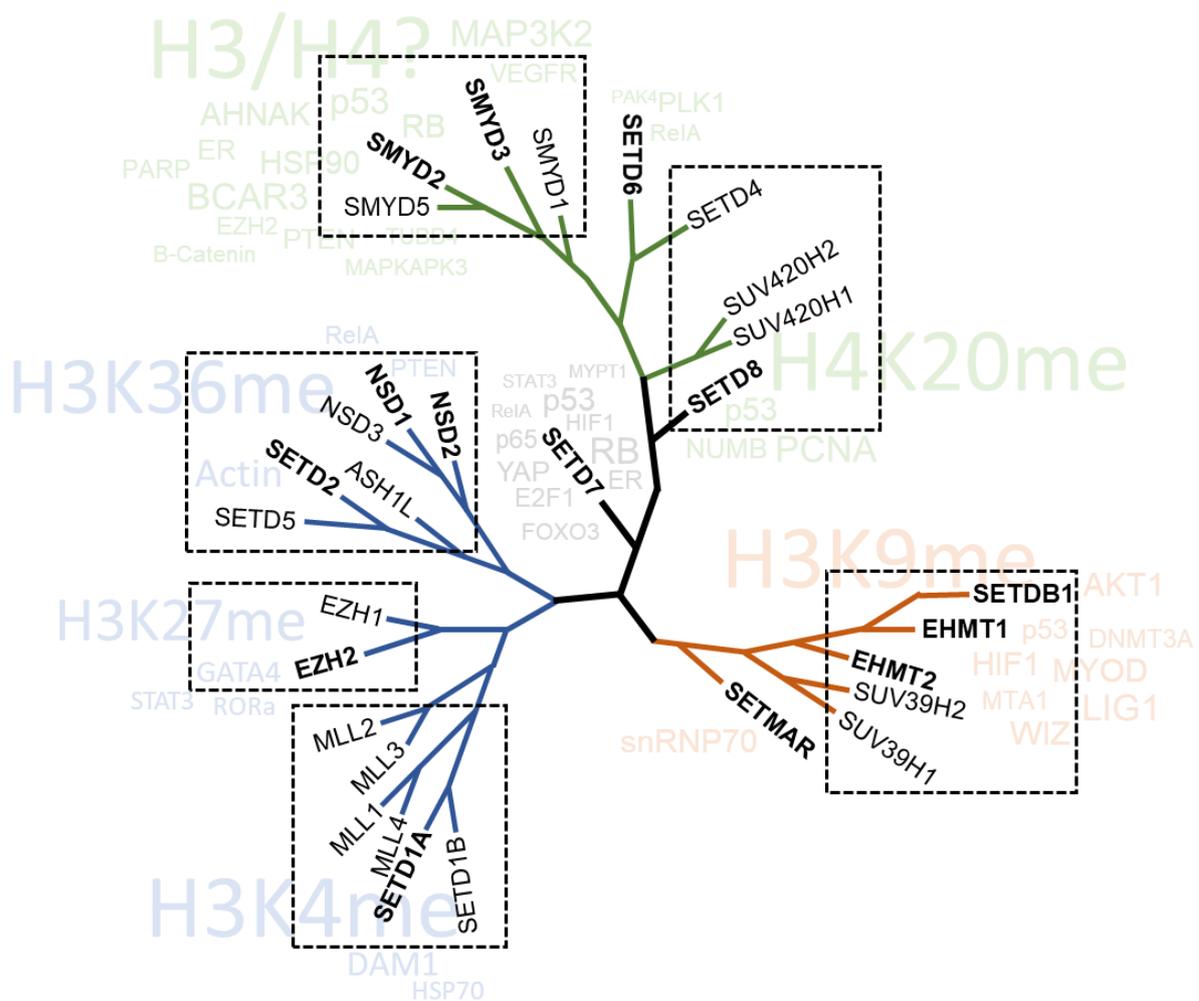


Figure 3. Représentation dendritique des différentes KMTs à domaine SET validées à ce jour. Dans ce schéma, nous pouvons retrouver le nom des différentes KMTs, avec, en filigrane, certains de leur substrats, histones et non-histones. Les KMTs représentées en gras sont celles possédant des substrats non-histones. On notera la grande diversité de ces substrats notamment pour les KMTs SMYD2, EHMT1/2 et SETD7

Aujourd'hui, près de 55 protéines à domaine SET ont été identifiées. Parmi elles, plus de 60% ont démontré une activité méthyltransférase, l'activité des protéines restantes restant encore à vérifier (Husmann and Gozani 2019). Vérification absolument essentielle, comme l'illustre le récent exemple de la KMT SETD3, qui catalyse la méthylation de l'actine sur l'histidine H73, plutôt que sur une lysine (Wilkinson et al. 2019). D'autres, comme la KMT SETD5 possèdent un domaine SET inactif du fait de l'absence d'acides aminés cruciaux pour catalyser la réaction de méthylation. Une représentation de ces KMTs à SET domaine dont l'activité lysine méthyltransférase a été validée à de multiples reprises est disponible en **(Figure 3)**.

Plus conséquent encore, on dénombre environ 150 protéines à domaine 7βS (Husmann and Gozani 2019). En revanche, seulement une quinzaine de ces protéines ont pu formellement être identifiées comme KMTs. En effet, ces protéines peuvent méthyler bien d'autres substrats que les lysines, tels que d'autres chaînes latérales d'acides aminés (comme l'arginine ou la glutamine), et même l'ADN, l'ARN et certains métabolites (Clarke 2013). Par exemple, METTL13 est responsable de la di-méthylation sur la lysine K59 de EEF11, tandis que les protéines METTL3 et METTL14 sont capables de former un complexe et catalyser la méthylation de l'adénosine N6 sur l'ARN (Jianzhao Liu et al. 2014; S. Liu et al. 2019). Enfin, il semblerait que la différence majeure entre ces KMTs « à SET » et ces KMTs « à 7βS » soit liée à des modalités catalytiques : tandis que les domaines SET méthyleront ponctuellement et finement leurs substrats, souvent multiples, les domaines 7βS seraient responsables de méthylation massive d'un nombre restreint de substrat (communication personnelle). Un champ de réflexion s'ouvre donc sur cette dichotomie entre KMTs à domaine SET et 7βS, et son implication fonctionnelle.

1.1.3. Les Lysine Déméthylases : les « erasers »

A l'instar de la phosphorylation et pendant longtemps contestée, la méthylation des lysines est une modification réversible. Ce sont les travaux du Dr Shi qui apportent la première preuve d'une enzyme capable d'oxyder l'amine-ε primaire d'une lysine afin d'assurer l'éviction du groupement méthyl, une lysine déméthylase (KDM). Il démontre ainsi que LSD1 (Lys-specific demethylase 1) est capable de catalyser la déméthylation de la H3K4 (Y. Shi et al. 2004). Peu de temps après, l'équipe de Zhang complète le panel de déméthylases en caractérisant une famille de KDMs à domaines JmjC (Jumonji C-terminal), capables d'oxyder le groupe méthyl lui-même, une hydroxylation, afin d'assurer la déméthylation (Tsukada et al. 2006).

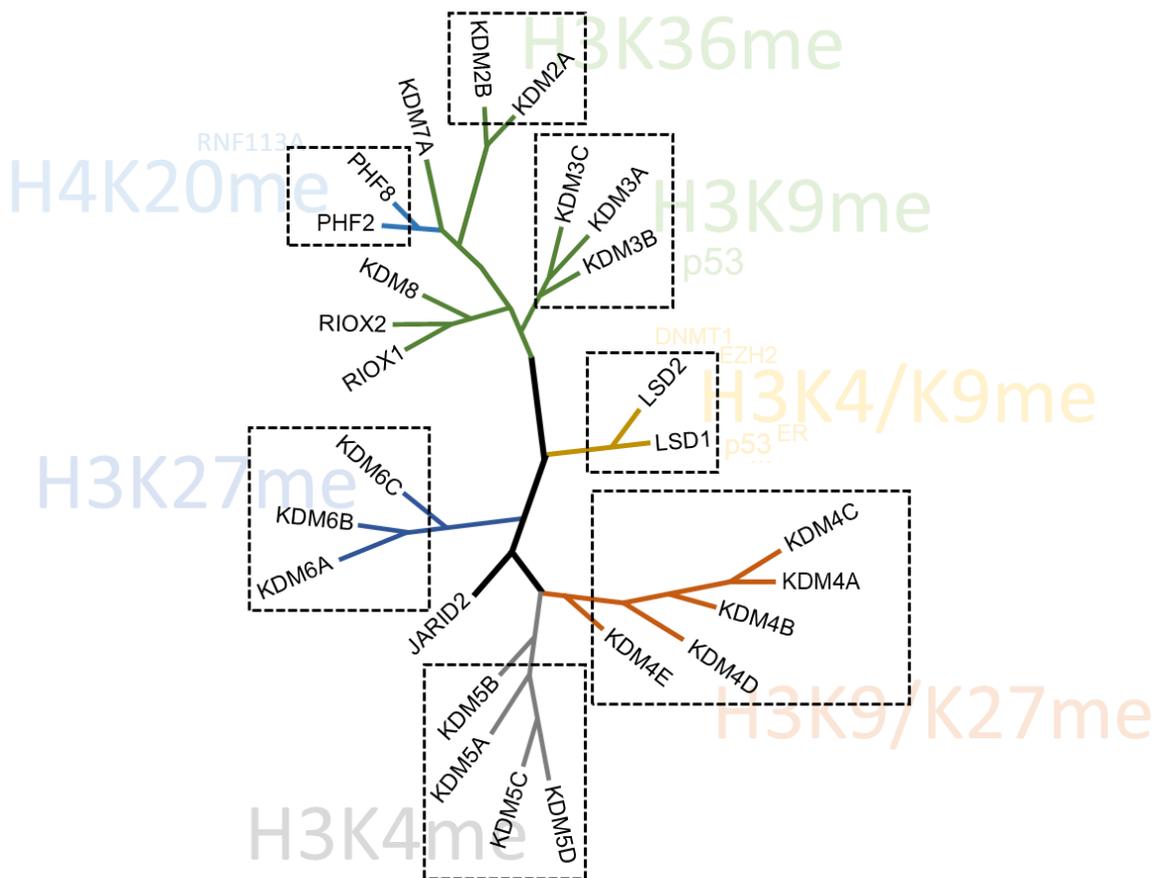


Figure 4. Représentation dendritique des différentes KDMs. Dans ce schéma, nous pouvons retrouver le nom des différentes KDMs, avec, en filigrane, certains de leur substrats, histones et non-histones.

On notera une dissymétrie fondamentale entre ces 2 modes de déméthylation, tandis que seulement deux KDMs sont capables d'oxydation d'amine (LSD1 et LSD2), il existe près de 20 hydroxylases avec un domaine JmjC. Cette spécificité de mécanisme catalytique a d'ailleurs une importance fonctionnelle directe. Les LSD1/2 ne peuvent catalyser que la déméthylation des Kme1/2 (en cas de tri-méthylation, il leur est impossible d'oxyder l'amine- ϵ), tandis que les KDMs à JmjC peuvent déméthyler tous les stades de méthylation (Luo 2018). Les différentes lysines-déméthylases sont représentées en (**Figure 4**).

1.1.4. Les protéines lectrices de la méthylation : les « readers »

Peu de temps après la découverte du rôle de SUV39H1 dans la méthylation de H3K9, l'équipe de Jenuwein met en évidence un nouveau mécanisme de régulation : certaines protéines peuvent se lier spécifiquement aux lysines méthylés. Ainsi, ils démontrent que la protéine HP1 peut se lier à H3K9 méthylé via un chromodomaine (Lachner et al. 2001). C'est l'émergence des lecteurs de la méthylation, également appelés « readers ».

Comme nous l'avons déjà évoqué, si la méthylation elle-même ne modifie pas la charge nette positive portée par la lysine, elle peut en revanche modifier la capacité de la lysine à s'engager dans une interaction cation- π ou dans des liaisons hydrogènes (Taverna et al. 2007). Avec l'accumulation des structures disponibles entre ces domaines et des peptides portant une lysine méthylés, il est possible de dresser certaines caractéristiques générales dans les mécanismes de reconnaissance. Par exemple, il est fréquemment observé que la reconnaissance de la lysine méthylée, surtout en cas de tri-méthylation, se fasse via une poche hydrophobe contenant des résidus aromatiques comme la phénylalanine ou le tryptophane, extrêmement favorables aux interactions cation- π . Cette poche porte le nom évocateur de cage aromatique (Kamps et al. 2015). Par ailleurs, on observe souvent un résidu acide, comme un acide aspartique ou glutamique, afin d'engager une liaison hydrogène dans les cas mono- et di-méthylation (H. Li et al. 2007). Ainsi, les travaux du laboratoire de Patel ont pu décrire deux grands mécanismes de lecture des lysines méthylées : le mode cavité-insertion (« cavity-insertion »), comme par exemple pour le lecteur L3MBTL1, et le mode de sillon superficiel (« surface groove »), utilisé par le chromodomaine du lecteur HP1 (Taverna et al. 2007).

Durant les deux dernières décennies une dizaine de domaines lecteurs différents ont ainsi été mis en évidence, en fonction de leur capacité à distinguer les différences subtiles entre les lysines natives et les différents états de méthylation (Luo 2018). Parmi ces différents domaines lecteurs ont retrouvé notamment les répétitions Ankyrine, WD-40, les domaines BAH, les doigts PHDs et les différents domaines de la superfamille « Royal » (domaines MBTs, Tudor, PWWP, et chromodomaines). On notera également le haut niveau d'interconnexion entre ces différents acteurs de la signalisation par méthylation des lysines, à l'image de nombreuses KMTs et KDMs également porteurs d'un ou plusieurs de ces domaines lecteurs (Dilworth and Barsyte-Lovejoy 2019) (**Figure 5**).

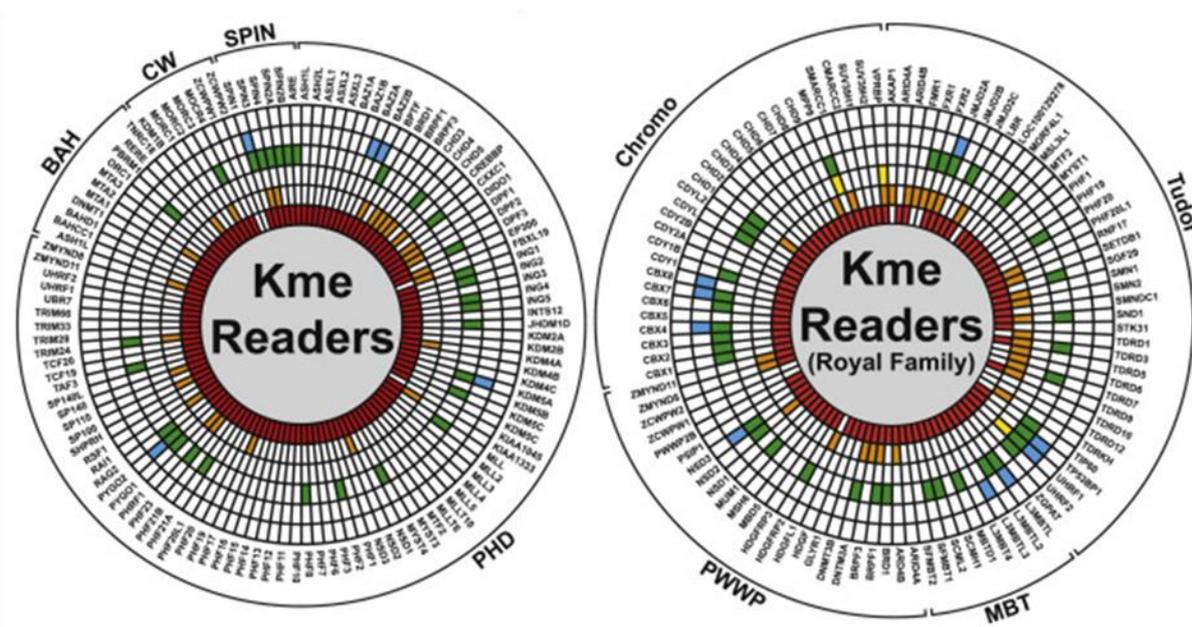


Figure 5. Représentation des différentes protéines à domaine lecteur de la méthylation des lysines. Cette image est issue de l'excellente revue du laboratoire du Dr. Defossez (Cornett et al. 2019a). Outre leur grande diversité, on notera le cercle le plus interne, constitué de cases rouges, indiquant la quasi-exclusivité nucléaire de ces lecteurs.

1.2. Du « code histone » au méthylome, une épopée technique

1.2.1. Le « code histone »

Quelques années après la découverte de la méthylation de la flagelline par Ambler et Rees, ce sont les travaux de Kenneth Murray, en 1963, qui apportent une nouvelle dimension à la méthylation des lysine : les histones sont méthylés (Murray 1964). Etant donné que les lysines méthylées ne peuvent s'accommoder à un ARN de transfert, et donc directement ajoutées lors de la traduction, il est rapidement conclu que la méthylation des histones est nécessairement une étape post-traductionnelle (S. Kim and Paik 1965). Enfin, tombe une spéculation tout à fait singulière, presciente, quant au rôle de la méthylation : la méthylation pourrait réguler la transcription des gènes (Allfrey, Faulkner, and Mirsky 1964).

Bien que le concept fût déjà évoqué, il faudra plus de 30 ans avant que les techniques d'observations permettent de démontrer l'importance de la méthylation des histones dans la régulation de la transcription. Ainsi est énoncé pour la première fois le « code histone », où les PTMs comme la méthylation peuvent être interprétés en tant que langage dictant les

phénomènes de transcription et de restructuration de la chromatine (Strahl and Allis 2000; Jenuwein and Allis 2001). En partant des simples « writers », les lysine méthyltransférases, responsables de l'apposition de ces marques, le code s'est progressivement enrichi. Des protéines « readers », lectrices, ont ensuite été découvertes, capables d'interpréter ces marques en s'y liant directement et en déclenchant différents systèmes de régulation épigénétiques, dits en *-trans-* (à l'opposé du *-cis-* où les mécanismes de régulation sont directement imputables à l'effet de charge). Ce sont ensuite les « erasers », les lysine déméthylases, qui sont découvertes et caractérisées : des protéines assurant l'éviction des marques, et ainsi orchestrant la dynamique de ce code. Aujourd'hui ce code s'est complexifié en un véritable langage typographié, à ces trois acteurs s'ajoute alors l'encre, c'est-à-dire les différents métabolites gravitant autour des réactions de méthylation et de déméthylation, ou encore la reliure, concernant les différentes conformations topologiques de la chromatine ou les phénomènes de séparation de phase liquide-liquide (Strahl and Allis 2000; Zhao, Allis, and Wang 2021) (**Figure 6**).

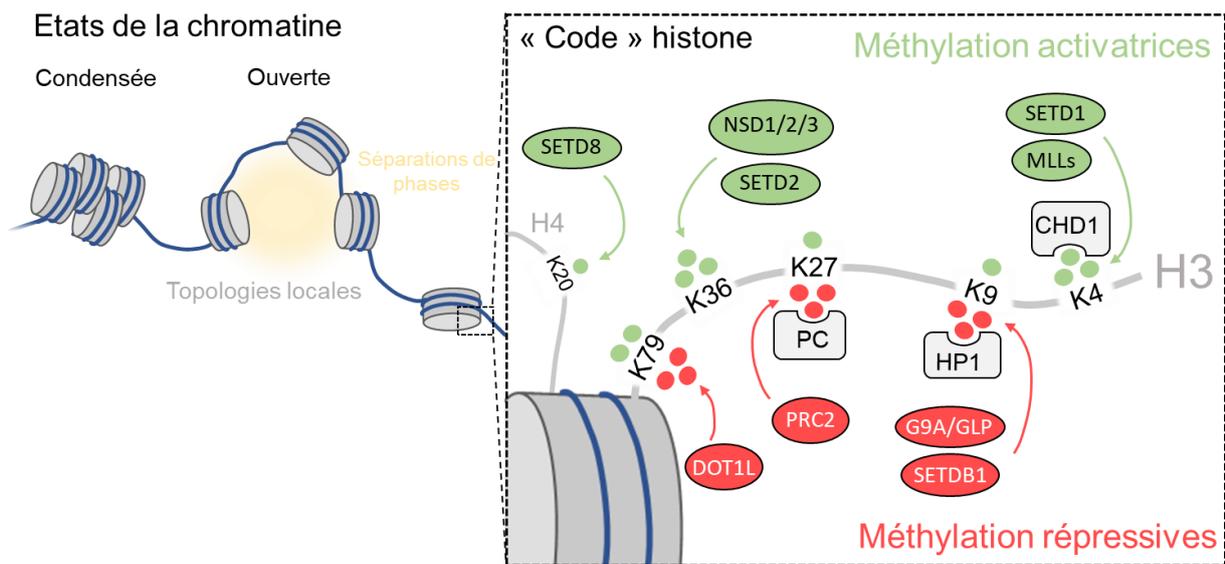


Figure 6. Méthylation des histones et son impact transcriptionnel. Ce schéma permet notamment d'illustrer la diversité fonctionnelle de la méthylation des histones. Celle-ci se décline à travers de valences et des lysines différentes, afin de promouvoir ou réprimer l'expression des gènes. Par exemple, la marque H3K9me3, catalysée par les KMTs G9A et SETDB1, va permettre de recruter la protéine HP1, afin de générer des zones d'hétérochromatine compacte. A l'inverse les différents stades de méthylation de H3K4, situé au niveau de promoteur et d'« enhancer » de gène, vont activer cette transcription.

Les différentes marques de méthylation d'histones ont été progressivement liées à différents processus, tels que la réplication ou encore la transcription des gènes. En particulier, ces marques ont été associées à différents états de la chromatine, permissif ou répressif en fonction de l'activité transcriptionnelle des gènes. Le consensus s'est ainsi construit autour des méthylations de H3K4 ou H3K36 qui sont typiquement activatrices de la transcription, tandis que les méthylations de H3K9 et H3K27 vont réprimer l'expression des gènes (Barski et al. 2007). Cependant, cette vision, très didactique, souffre d'un nombre incroyable de limitations et de contre-exemples. Par exemple, il est notable que tandis que H3K4me3 vient décorer presque universellement les promoteurs des gènes transcrits, la mutation de H3K4 ou l'inactivation de la KMT responsable SETD1 n'a presque aucun impact transcriptionnel chez les cellules totipotentes (H. Jiang et al. 2011).

Tout d'abord, ce « code » s'illustre par sa nature combinatoire. Par exemple, de nombreuses protéines lectrices ne reconnaissent qu'une combinaison de modifications, qui parfois s'additionnent, se synergisent ou s'antagonisent. Par exemple, le chromodomaine lecteur de CMT3 ne peut lire que la double modification H3K9me3K27me3, mais pas K9me3 ou K27me3 seules (Lindroth et al. 2004). Similairement, le domaine lecteur PHD du remodelleur de la chromatine BPTF présente une affinité graduelle pour H3K4me3 lorsque celui-ci est combiné avec différents états d'acétylation de H4K16ac (acétylé), indiquant un effet à l'échelle du nucléosome (Ruthenburg et al. 2011). A l'inverse certaines modifications vont venir antagoniser certaines lectures, comme c'est le cas de la célèbre phosphorylation de H3S10 qui va bloquer l'interaction adjacente de H3K9me3 avec le chromodomaine de HP1 (Fischle et al. 2005).

Un des mécanismes physiologiques les plus notables en terme de nature combinatoire, est celui de la chromatine « *poised* », de nature bivalente. Pendant le développement, les cellules s'engagent dans des lignages spécifiques. Pour cela les cellules doivent éteindre les gènes impliqués dans la pluripotence et ceux impliqués dans une destinée cellulaire différente. L'extinction de ces gènes se fait par exemple par tri-méthylation de H3K9me3, générant des régions d'hétérochromatines constitutives, ou H3K27me3, régulant cette répression de façon plus dynamique (J. Zhu et al. 2013). A l'inverse, la méthylation de H3K4 et ses différents niveaux de valence, allant de la mono- à la tri-méthylation, vont modifier l'accessibilité des promoteurs et des régions dites « *enhancers* » pour activer la transcription des gènes de la pluripotence et des différents lignages. (Local et al. 2018). Cependant, la présence d'une marque ne coïncide pas de façon systématique avec l'expression du gène associé. En réalité, au cours du développement, de nombreux promoteurs de gènes portent à la fois la méthylation activatrice H3K4me3 et la méthylation répressive H3K9me3. Cette ambivalence est à la base du concept de chromatine « *poised* », prédéterminée. C'est la

perte de l'une ou l'autre de ces marques qui va résulter en l'activation ou la répression du gène, et spécifier le destin cellulaire (Bernstein et al. 2006).

1.2.2. Vers un méthylome des lysines

L'émergence de la protéomique, basée sur des techniques d'identification par spectrométrie de masse a permis de révolutionner le domaine des modifications post-traductionnelles, et de la méthylation en particulier (Cornett et al. 2019a). Depuis 2004, avec la première signalisation « non-histone » impliquant la KMT SETD7 et le facteur de transcription p53, il est désormais clair que des milliers de protéines non-histones, sont également décorées de ce groupe méthyl (Chuikov et al. 2004; Lanouette et al. 2014). Une rapide recherche sur les différentes bases de données disponibles, comme PhosphoSitePlus, permet en effet de constater que plus de 9 000 événements de méthylation, affectant près de 1500 protéines différentes, sont à ce jour identifiés (Lukinovic et al. 2020). Il est donc clair que la méthylation des lysines traverse largement les frontières « histoniques » pour rallier différents territoires protéiques, d'une diversité extrême : le méthylome des lysines (**Figure 7**).

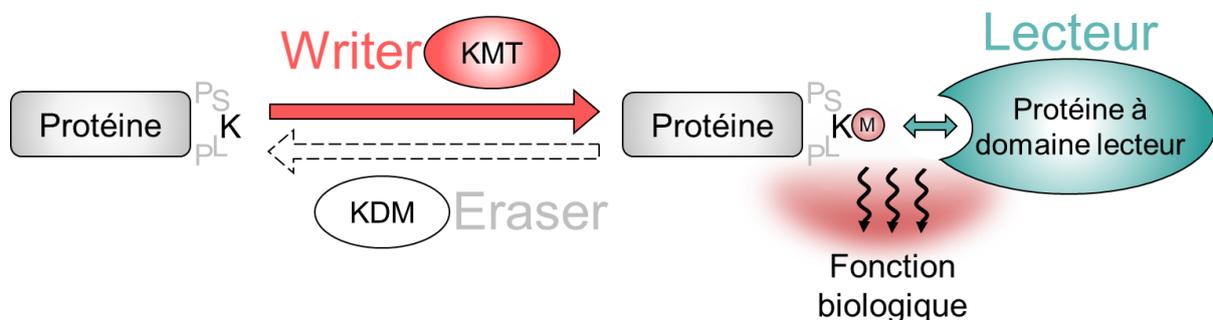


Figure 7. Signalisation par méthylation des lysines. Dans ce schéma est représenté la dynamique de la méthylation, à l'équilibre entre KMTs et KDMs ; et surtout le rôle crucial du lecteur. En effet, l'interaction du lecteur avec la lysine méthyliée va être le signal permettant de véhiculer la fonction biologique de l'évènement de méthylation.

De la méthylation des histones, transmettant diverses signalisations chromatinienne influençant la transcription, la réplication ou encore la réparation de l'ADN, nous avons changé de paradigme pour proposer une signalisation par un méthylome, régulant également divers aspects fonctionnels, d'un nombre croissant de substrats. La méthylation des lysines, et son éviction, s'est vue alors attribuer une incroyable diversité fonctionnelle, modulant la stabilité des protéines, leur statut de phosphorylation ou d'ubiquitylation, leur

localisation subcellulaire, leur activité, ou encore leurs interacteurs, aussi bien nucléiques que protéiques (Cornett et al. 2019a). Pourtant, ce qui distingue la méthylation de l'encombrant et chargé groupe phosphate par exemple, c'est justement son apparente inertie intrinsèque. Ainsi, de la même façon que la régulation des histones par méthylations, le lecteur est absolument essentiel dans la transduction de la fonction biologique (**Figure 7**).

Ces protéines lectrices représentent bien une pierre angulaire de la signalisation par méthylation des lysines car ce sont elles qui vont réellement transmettre la fonction biologique de cette modification. Une récente perspective souligne que dans les cas où la méthylation de ces protéines non-histones influencerai sur la dégradation ou la localisation du substrat, une étape intermédiaire impliquant l'ancrage de cette méthylation par un lecteur apporterai une explication mécanistique suffisante (Cornett et al. 2019a).. Par exemple, EZH2 peut méthyler la lysine K38 du récepteur orphelin ROR-alpha (« Retinoid-Related Orphan Receptor Alpha ») et ainsi promouvoir sa dégradation protéasomale. Mais cette méthylation est en réalité reconnue par le chromodomaine de DCAF1 (« DDB1-CUL4-Associated Factor 1 »), qui possède une activité E3-Ubiquitine ligase (Lee et al. 2012). Ainsi la méthylation en elle-même n'induit pas de dégradation, c'est bien la liaison de ce méthyl par un lecteur qui apporte la fonction, ici l'ubiquitylation et la dégradation.

De façon intéressante, on retrouve également chez les protéines non-histones des mécanismes où la méthylation ne vise pas à attirer des lecteurs, mais plutôt à repousser des interacteurs qui ciblaient la lysine native. Ce type de mécanisme avait déjà été observé dans un contexte chromatinien, par exemple dans le cas de H3K4, dont la lysine native est reconnue par un des domaines PHD de la déméthylase KDM5B (B. J. Klein et al. 2014). Concernant les protéines non-histones, SMYD3 est capable de tri-méthyler la lysine K260 de la protéine kinase MAP3K2 (« Mitogen-activated protein kinase »), et de la suractiver. Cette méthylation va en réalité repousser le complexe phosphatase PP2A (« Protein phosphatase 2A»), stabilisant la phosphorylation de MAP3K2 et donc l'activation de cette voie de signalisation (Mazur et al. 2014b). Autre exemple, il a été démontré que SETD1A pouvait mono-méthyler la lysine K342 de YAP1 (« Yes-Associated Protein ») et ainsi promouvoir sa localisation nucléaire. La méthylation de cette lysine va à l'inverse repousser l'interaction avec l'exporteur CRM1 (« Chromosomal Maintenance 1 »), une protéine cruciale dans l'export nucléaire de YAP1, le séquestrant ainsi dans le noyau (L. Fang et al. 2018). Ici encore, bien que la méthylation devienne un signal de répulsion, il s'agit toujours d'une régulation par modulation directe des interactions. Durant ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler sur ce type de mécanisme, où la tri-méthylation de l'ubiquitine ligase RNF113A par la KMT SMYD3, repoussait un complexe phosphatase.

Enfin, il est frappant de voir que la nature combinatoire du « code » histone est également retrouvée à l'échelle du méthylome, sur des protéines non-histones, telles RB ou p53. La complexité des combinaisons de méthylation affectant p53 est représentée dans la figure ci-dessous (**Figure 8**).

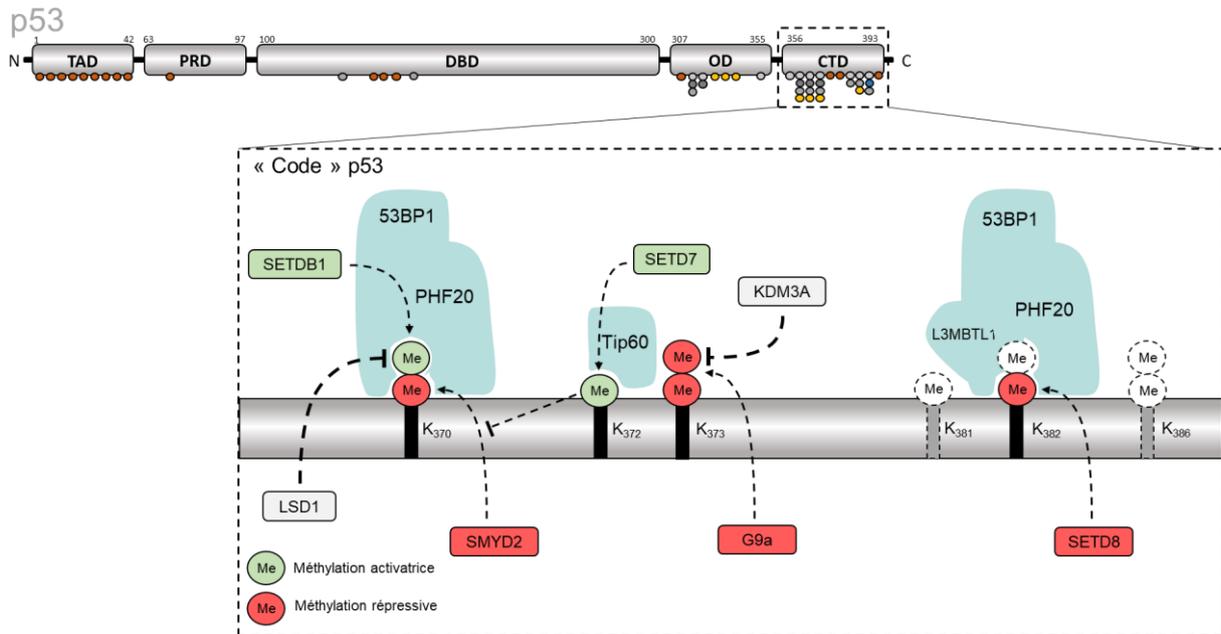


Figure 8. Régulation de p53 par méthylation des lysines. Dans ce schéma est représenté de façon exhaustive les différents événements de méthylation affectant l'extrémité C-terminale (CTD) de p53. On distingue les méthylations activatrices, qui vont promouvoir les fonctions de transactivation de p53 ; des méthylations répressives qui vont l'inactiver. Différentes KMTs sont responsables de ces méthylations, à l'instar de SETDB1, SETD7, SMYD2, G9A ou encore SETD8. Par ailleurs différents lecteurs vont intervenir dans la transduction des fonctions portées par la méthylation, telles PHF20, ou L3MBTL1.

1.2.3. Le méthylome, une épopée technique

Les avancées technologiques les plus spectaculaires concernent probablement notre capacité à détecter la méthylation des lysines par spectrométrie de masse. Néanmoins, la détection de ces lysines méthylées par le spectromètre et leur quantification nécessite une préparation de l'échantillon particulière, systématiquement conditionnée par une étape d'enrichissement de ces peptides ou protéines méthylés. Ainsi, la plupart des études visant à cartographier ce méthylome ont utilisé des anticorps « pan », c'est-à-dire reconnaissant, dans l'idéal collectif, l'ensemble des lysines méthylées (Guo et al. 2014b; X.-J. Cao and Garcia 2016; Olsen et al. 2016a). Loin d'être idéal, ces anticorps sont en réalité spécifiques d'un épitope donné, généralement d'une dizaine d'acides aminés autour de la lysine, et donc sélectifs pour certains substrats, nous éloignant de notre rêve de méthylome.

Afin de répondre à cette limitation, une autre méthode d'enrichissement a été développée dans le laboratoire du Dr. Gozani, et consiste à utiliser les domaines lecteurs MBT de la protéine L3MBTL1 (« Lethal-3 MBT-like Protein 1 ») (Moore et al. 2013b; Carlson et al. 2014a). En effet, ces domaines, aux propriétés avides et peu sélectives pour les lysine mono- et di-méthylées, permettent de « pêcher » un grand nombre de substrats potentiels, en s'affranchissant des limitations antigéniques des anticorps pan. Cette méthode a notamment été utilisée que dans le cadre du méthylome dépendant des KMTs G9A et SETMAR (Moore et al. 2013b; Carlson et al. 2015a). Spécifiquement, durant ma thèse, c'est cette méthode qui a été choisie afin de cartographier le méthylome de SMYD2 (**Figure 9**). Une des limitations notables de l'utilisation de ce domaine MBT est en revanche la très faible réactivité pour les lysines tri-méthylées, ce qui est problématique pour déterminer le méthylome de certaines KMTs, catalysant exclusivement une tri-méthylation processive telles que SMYD3 (Mazur et al. 2014b). Alternativement au domaine MBT, le chromodomaine de la protéine lectrice HP1, pouvant également reconnaître la tri-méthylation, a été utilisé dans un but similaire afin d'isoler des protéines méthylées (Rui Wang et al. 2018).

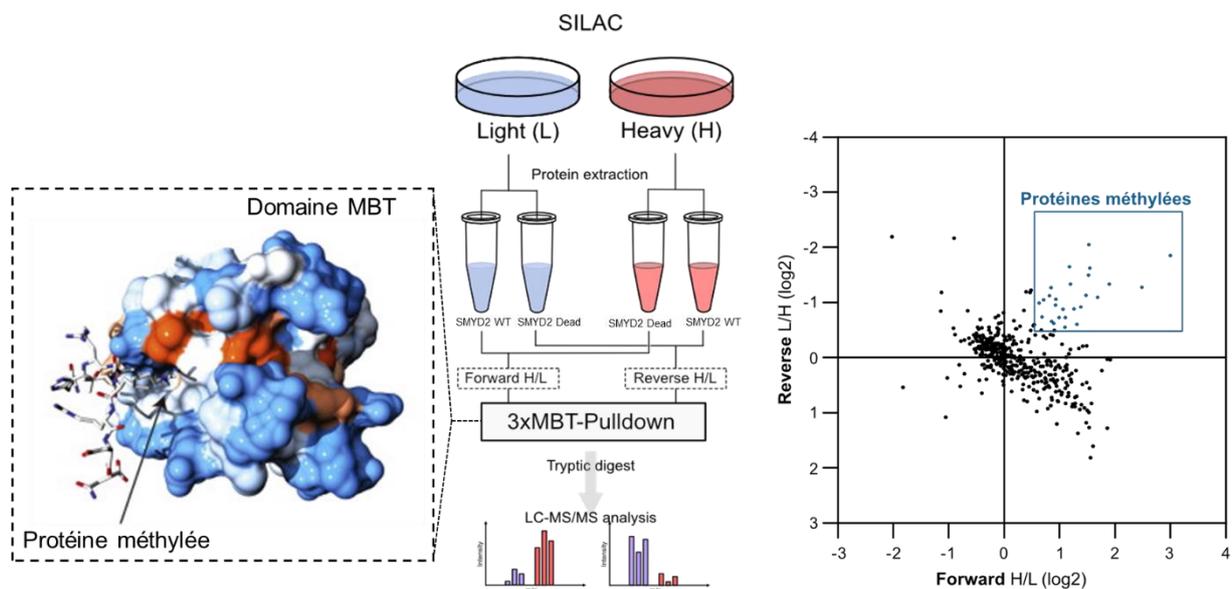


Figure 9. Expérience de SILAC-3xMBT pulldown couplée à une analyse protéomique afin d'identifier des protéine différentiellement méthylées. C'est cette expérience qui a été effectuée au cours de cette thèse afin d'identifier le lysine méthylome de SMYD2. Dans ce schéma, les cellules sont cultivées dans un milieu SILAC (Stable Isotope Labelling of Amino acid in Cell culture) lourd ou léger (contenant des isotopes stables du carbone ou de l'azote), afin de marquer les protéines. Après extraction, les protéines sont incubées avec un SMYD2 actif (WT) ou catalytiquement inactif (F184A), et les protéines méthylées sont pêchées avec les domaines lecteurs 3xMBT. Ces protéines sont ensuite identifiées par spectrométrie de masse. Les substrats candidats sont ceux démontrant un enrichissement significatif dans les deux expériences parallèles (forward et reverse)

Parallèlement au développement des analyses protéomiques par spectrométrie de masse, l'identification de substrats via des puces particulières a également été développé. Par exemple, afin de déterminer le méthylome de SMYD3, mon directeur de thèse, Nicolas Reynoird, a utilisé une micro puce contenant des milliers de protéines recombinantes différentes, qu'il a soumise à l'activité méthyltransférase de SMYD3, identifiant ainsi MAP3K2 comme substrat préférentiel (Mazur et al. 2014b). Une approche semblable avait été également utilisée pour caractériser le méthylome de SETD6 (Levy et al. 2011). Afin de couvrir de façon sans cesse plus exhaustive ce méthylome, des puces contenant des milliers de peptides dégénérées ont été synthétisées et ont permis de caractériser les déterminants séquentiels autour des lysines cibles, les séquences consensus, de certaines KMTs comme G9A ou SETD8 (Cornett et al. 2018). Le rêve de pouvoir prédire ce méthylome par simple analyse bioinformatique semble approcher, bien qu'encore limité par certains paramètres, notamment structuraux (Biggar et al. 2020).

2. Cibler la méthylation des lysines dans les cancers

2.1. Importance physiologique de la méthylation des lysines

La méthylation des histones est un processus fondamental orchestrant les programmes transcriptionnels nécessaires au développement, et participant au maintien des fonctions des cellules différenciées. De la fertilisation aux différentes étapes post-natales, il a été largement démontré que les défauts de cette signalisation conduisaient invariablement à l'arrêt du développement et à la léthalité, où alors à différents déficits fonctionnels d'organes particuliers (Jambhekar, Dhall, and Shi 2019). L'haploinsuffisance de différentes KMTs conduit à de nombreuses pathologies développementales. Par exemple, les syndromes de Weaver ou de Sotos, responsables d'un retard intellectuel sévère, ont été liés à des mutations de NSD1, EZH2 ou SETD2 et des défaut de méthylation des histones (Husmann and Gozani 2019).

Si la méthylation des histones et sa régulation dynamique a été extraordinairement bien étudiée au cours du développement, les connaissances sur la méthylation du reste du protéome sont restées très rudimentaires. Ces événements de méthylation n'en demeurent pas moins essentiels, comme illustré par l'absence de phénotype lié à la perte de H4K20me1 chez la drosophile, alors que la perte de SETD8, la principale KMT responsable de cette marque, est létale (McKay et al. 2015). Dans ce cas particulier, il semblerait que

SETD8 puisse catalyser des évènements de méthylation sur des protéines non-histones absolument requis au développement. De façon plus directe, il a par exemple été montré que EZH2 puisse catalyser la méthylation de GATA4 afin de réprimer ces fonctions de facteur de transcription et permettre la cardiogenèse (He et al. 2012). Davantage de travail est donc nécessaire pour comprendre l'importance physiologique de ces évènements de méthylation sur protéines non-histones. En particulier, de l'édition précise des lysines méthylées sera nécessaire pour comprendre la fonction de ces évènements de méthylation.

2.2. La méthylation des lysines dans les cancers

Les analyses « -omiques », de masse, des tumeurs de différents types ont pu mettre en exergue l'abondance des altérations des différents acteurs de la signalisation par méthylation des lysines. Jonglant entre mutations somatiques, translocations, amplifications, délétions, méthylation des promoteurs ou encore expressions différentielles, les fonctions des KMTs, KDMs, lecteurs et substrats méthylés sont fréquemment subverties par les cellules cancéreuses. L'altération de ces protéines va influencer sur les états permissifs ou restrictifs de la chromatine au regard de différents acteurs oncogéniques ; et, par une certaine héritabilité mitotique, contrôler directement la progression tumorale (Flavahan, Gaskell, and Bernstein 2017). Au-delà de son rôle sur l'épigénome, l'altération de ces acteurs va profondément impacter le lysine-méthylome des cellules cancéreuses et contribuer à leur plasticité signalétique. Ainsi, on retrouvera un grand nombre de protéines non-histone méthylées et impliquées dans un grand nombre de signalisations oncogéniques.

La sous-unité catalytique du complexe PRC2, la KMT EZH2, a été particulièrement étudié au cours de la tumorigénèse. Responsable de l'apposition de H3K27me₃, la surexpression de EZH2 a été décrite comme un facteur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers, tels que la prostate, le sein, ou encore le mélanome. Au-delà de sa surexpression, certaines mutations activatrices affectant son site catalytique SET (au niveau de la tyrosine Y761), ont été identifiées dans différents lymphomes (K. H. Kim and Roberts 2016). Son rôle oncogénique est notamment médié par la suppression des programmes de différenciation, et donc à la maintenance de caractères souches de cellules cancéreuses (Chang et al. 2011). Le rôle de EZH2 dans les cancers ne se limite pas à la tri-méthylation de H3K27. On retrouve différents substrats non-histone, tels que STAT3 ou AR, qui, lorsque méthylés par EZH2, vont promouvoir la progression du glioblastome ou du cancer de la prostate respectivement (K. Xu et al. 2012; E. Kim et al. 2013). Enfin, d'autres KMTs comme SMYD2 et SMYD3 possèdent des activités oncogéniques décrites presque exclusivement à travers la

méthylation de substrats non-histones. Le répertoire de substrat de SMYD2 et ses implications oncogéniques seront abordés dans le second chapitre de cette introduction.

Un des exemples d'implication dans les cancers les plus notables parmi les KDMs est LSD1. Connu pour la déméthylation de H3K4me2 (Y. Shi et al. 2004) et de H3K9me2 (Metzger et al. 2005), LSD1 est retrouvé très fréquemment surexprimé dans les cancers, notamment les leucémies, où il joue un rôle oncogénique absolument clé (Schenk et al. 2012; W. J. Harris et al. 2012). Parallèlement, cette KDM est impliquée dans la déméthylation de nombreux autres substrats, comme p53, RB, E2F1, HIF1 ou MYPT1 pour contrôler directement différentes voies de signalisations et influencer sur la tumorigénèse (Perillo et al. 2020).

Au même titre, les substrats modifiés par méthylation sont également fréquemment altérés dans les cancers, aussi bien au niveau transcriptionnel, que génétique, avec la sélection de mutations sur les lysines méthylées. Un des exemples les plus frappant de l'altération de ces substrats par mutation est l'émergence des « oncohistones », des événements mutationnels oncogéniques dit « drivers » dans différentes formes de gliomes et sarcomes. En effet, les mutations tels que H3K27M ou H3K36M vont d'une part empêcher toute signalisation dépendante des lysines mutées, et d'autre part utiliser la méthionine (M) pour séquestrer la KMT associée à cette marque, dérégulant en profondeur l'épigénome au profit de programmes oncogéniques (C. Lu et al. 2016; D. Fang et al. 2018).

Le conditionnement épigénétique des cellules au cours de la dissémination métastatique est un concept émergent. Il est désormais clair que les cellules métastatiques conservent en grande partie le même terrain génétique que celui des cellules de la primo-tumeur, et qu'une partie significative du potentiel métastatique est portée par les altérations de l'épigénome (Turajlic and Swanton 2016; Makohon-Moore et al. 2017; McDonald et al. 2017). En particulier, de nombreuses signalisations par méthylation des lysines ont été impliquées dans des processus pro-métastatiques. Certaines KMTs et KDMs ont déjà été reliés à des programmes pro-métastatiques, les plus connus étant EZH2 et LSD1 dans le cancer du sein (Yan Wang et al. 2009; Anwar et al. 2018). Au cours de ma thèse, nous avons par exemple pu mettre en évidence le rôle décisif de SMYD2 et de son activité méthyltransférase dans la dissémination métastatique du cancer du sein.

Ainsi, il devient de plus en plus clair que les cellules cancéreuses présentent une plasticité de leur épigénome et de différentes signalisation cellulaires dépendantes de la méthylation des lysines. Il n'est pas étonnant qu'au cours de ces deux dernières décennies les scientifiques aient cherché si intensément à cibler les différents acteurs de cette signalisation par méthylation des lysines afin de contrer la progression tumorale.

2.3. L'inhibition de la signalisation

L'implication croissante des KMTs dans les cancers a initié un vaste programme de caractérisation de leurs structures et leurs mécanismes catalytiques afin de développer un certain nombre d'agent permettant de les inactiver. Une de leur caractéristique principale est leur structure bipartite, avec d'un côté une poche spécifique à la liaison du SAM et de l'autre une poche pour accommoder les différents substrats. De plus, un grand nombre de KMTs sont co-régulés par différentes autre protéines, comme par exemple le cas du complexe PRC2 avec EZH2 et les protéines SUZ12 et EED (W. Kim et al. 2013). Ainsi, il existe différentes stratégies afin de bloquer l'activité catalytique des KMTs : une compétition avec le substrat, une compétition avec le SAM ou encore une compétition avec les co-régulateurs des KMTs (qui ne sera pas évoqué ici).

Le premier inhibiteur de KMT découvert concerne l'enzyme G9A. Cet inhibiteur, le BIX-01294 a prouvé son efficacité dans l'inhibition de la di-méthylation de H3K9, en se liant au niveau de la poche de reconnaissance du substrat de G9A (Kubicek et al. 2007). Ce mécanisme de compétition avec le substrat est celui qui a été le plus largement privilégié en raison de l'évidente sélectivité qu'il permet : chaque KMTs possède un répertoire de substrat relativement exclusif. Par exemple, les inhibiteurs de G9A (UNC0642) (F. Liu et al. 2013), de SETD7 (PFI-2) (Baryte-Lovejoy et al. 2014), de SETD8 (UNC0379) (Ma et al. 2014) ou de SMYD2 (A-893, LLY-507 et BAY-598) (Nguyen et al. 2015; Sweis et al. 2015; Eggert et al. 2016b), sont tous des inhibiteurs entrant en compétition avec la liaison du substrat.

La base d'une compétition avec le SAM implique la mise au point de petits inhibiteurs pouvant occuper la poche de liaison du SAM avec une haute affinité. Le mécanisme global, largement élucidé par des analyses structurales, a pu mettre en évidence que la liaison de ces inhibiteurs aboutissait à des changements conformationnels extrêmes. Il est ainsi reconnu qu'en absence de grande différence au niveau du site de liaison au SAM entre les différentes KMTs, ce sont ces changements conformationnels qui établissent la sélectivité de ces inhibiteurs pour une KMT particulière (Luo 2018). Néanmoins le défi de ces inhibiteurs n'est pas tant leur sélectivité mais plutôt leur nature hydrophile, absolument nécessaire afin d'accueillir le site de liaison au SAM. Cette nature hydrophile vient en effet à l'encontre des propriétés hydrophobes nécessaires à la bonne perméance de ces composés dans les cellules (Bhat et al. 2021). Parmi les plus sélectifs et perméants, on retrouve par exemple les analogues du SAM, EPZ004777 ciblant DOT1L, et les Pr/Br-SNFs ciblant SETD2 et NSD2 (Daigle et al. 2011; Zheng et al. 2012; Tisi et al. 2016). Notons que les inhibiteurs les plus prometteurs sur le plan clinique sont, comme nous allons le voir dans

la sous-partie suivante, des inhibiteurs entrant en compétition avec le SAM (Bhat et al. 2021).

L'inhibition des KDMs s'est organisée en deux grands pans de travail. D'un côté l'inhibition des LSD1/2 et de l'autre l'inhibition des KDMs à domaines JmjC. Dans le cas de LSD1, les inhibiteurs les plus probants sont à ce jour le TCP, le ORY-1001 et le GSK2879553, tout trois en essais cliniques. Il s'agit d'inhibiteurs irréversibles, basés sur l'inhibition de l'activité amine oxydase de LSD1.

L'inhibition des interactions a été pendant longtemps un système délaissé face à l'inhibition de l'activité catalytiques des enzymes. Cependant, bien que plus complexe qu'anticipé, les avancées dans le domaine de la modulation des facultés lectrices des bromodomains sur les lysines acétylées ont prouvé l'intérêt de ce genre d'approche (Mita and Mita 2020). Généralement, tandis que l'antagonisme de lecteur utilisant le mode « cavité-insertion » va se faire en utilisant des petits inhibiteurs, il sera plus facile de mettre au point des peptidomimétiques – c'est-à-dire des molécules présentant une importante homologie structurale avec un peptide donné – afin d'inhiber les interactions basées sur un mécanisme de « sillon superficiel » (James and Frye 2016).

La grande majorité des antagonistes développés à ce jour vise les lecteurs appartenant à la superfamille « Royal », comme les domaines MBT, Tudor et les chromodomains. Par exemple, le laboratoire de Stephen Fries a développé le UNC1215, un petit inhibiteur capable d'interférer entre le domaine MBT et les lysines méthylées avec une efficacité sous-micromolaire (James et al. 2013). Les chromodomains, qui vont engager préférentiellement des interaction de type sillon superficiel, ont été ciblés quant à eux par différents peptidomimétiques. Par exemple, l'équipe du Dr Fries, a pu mettre au point un composé peptidomimétique, le UNC3866, qui lie les chromodomains des lecteurs CBX- 4 et -7 à des efficacités également sous-micromolaires (Stuckey et al. 2016). Cependant, si l'efficacité en cellule a été démontré, il n'y a encore pas de modèle *in vivo* dans lesquels ces différents composés ont montré leur potentiel.

Dans la clinique, comment ne pas citer, le Tazemetostat, un inhibiteur de EZH2, qui est devenu en 2020 le premier inhibiteur de KMT approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour traiter des patients atteints de sarcome épithélioïde métastatique (Rothbart and Baylin 2020), puis des patients atteints de lymphome folliculaire réfractaire (Morschhauser et al. 2020).

Résumé

La méthylation des lysines est une **modification post-traductionnelle**. Contrairement à d'autres modifications, telles que l'acétylation ou la phosphorylation, elle ne **modifie pas la charge** de la protéine, mais va modifier la **réactivité** de la lysine. De plus, la **mono-, di- et tri-méthylation** d'une lysine peut affecter différenciellement sa réactivité.

Elle est catalysée par les lysine-**méthyltransférases** (KMTs), évincée par les lysine-**déméthylases** (KDMs) et **transmet sa fonction biologique** via différentes familles de protéines **lectrices**, pouvant accommoder la lysine méthylée.

La signalisation par méthylation des lysines a été abondamment décrite au **sein de la chromatine**, où elle prend part à un langage, le « **code histone** », notamment essentiel au contrôle de **l'expression des gènes**. Quelques lysines canoniques des histones 3 et 4 se sont ainsi vu attribuer un **éventail fonctionnel gargantuesque**.

L'émergence des **techniques de protéomique** a fracturé les frontières de cette signalisation par méthylation des lysines. Elle a été observée dans des milliers de protéines non-histones différentes : on peut parler aujourd'hui d'un lysine-**méthylome**.

Cette signalisation est cruciale au cours du **développement**. Différents **mécanismes** ont été décrits et participent notamment à la **spécification des lignages** cellulaires en jouant sur la régulation de **programmes transcriptionnels** précis. Le rôle physiologique de la méthylation des protéines **non-histones** est cependant **largement inconnu**.

La méthylation est largement impliquée dans de nombreux processus pathologiques, tels que **les cancers**. Les acteurs de cette signalisation, **KMTs, KDMs et lecteurs** sont fréquemment **mutés ou dérégulés** dans les cancers. Ainsi, une **dérégulation de l'abondance de différentes marques** de méthylation, qu'elles soient histones, ou non-histones, a clairement été reliée à de nombreux **processus oncogéniques**. En conséquence, différents **inhibiteurs et peptidomimétiques** ont été mis au point, grâce à de remarquables travaux de biologie structurale, pour **cibler ces différents acteurs** dans les cancers.

En 2020, le premier inhibiteur de KMT, le **Tazemetostat**, ciblant EZH2, a été approuvé par la FDA. Cet élan confirme le formidable potentiel du **ciblage de la méthylation** des lysines dans les **cancers**, et appelle à davantage d'applications.

II. La lysine méthyltransférase SMYD2

La lysine méthyltransférase SMYD2 a été l'objet principal de ma thèse, puisqu'il aura été question d'évaluer ses fonctions oncogéniques potentielles et les différents mécanismes sous-jacents.

Cette enzyme a offert des champs d'investigation remarquablement différents des autres KMTs puisqu'elle a rapidement été associée à la méthylation de substrats non-histones. Les signalisations par méthylation dépendantes de SMYD2 se sont donc éloignées progressivement d'un rôle direct sur la chromatine, tout en conservant une mécanistique conservée, basée sur les « writers », les « erasers » et les « readers ». En partant d'une méthylation incertaine de H3K36, une robuste méthylation du suppresseur de tumeur p53 a été identifiée et a clairement inscrit l'activité de SMYD2 dans une perspective oncogénique.

Dans ce chapitre, nous allons présenter la famille des SMYDs et leur domaine SET particulier et éclairer les raisons structurales à la base de la grande diversité des substrats de SMYD2. Puis nous allons détailler les différentes signalisations par méthylation des lysines orchestrée par SMYD2, en partant des histones, jusqu'aux protéines cytoplasmiques. Enfin nous irons analyser l'implication de SMYD2 dans les cancers et les différents inhibiteurs mis au point afin de bloquer son activité catalytique.

1. Famille et structure

1.1. La famille des SMYDs

La famille des lysine méthyltransférases SMYDs (SET and MYND domain-containing proteins) est constituée de 5 membres, énumérés de SMYD1 à SMYD5, et découverts entre 2002 et 2006 (Gottlieb et al. 2002; Hamamoto et al. 2004; Brown et al. 2006). Le nom particulier de cette famille de protéine fait directement référence à la structure particulière des SMYDs, comportant le domaine catalytique SET, entrecoupé d'un domaine à doigt de zinc, le domaine MYND (Myeloid-Nervy-DEAF1) (Brown et al. 2006). A l'exception de SMYD5, tous les SMYDs comportent également un domaine C-terminal (CTD) (**Figure 10**).

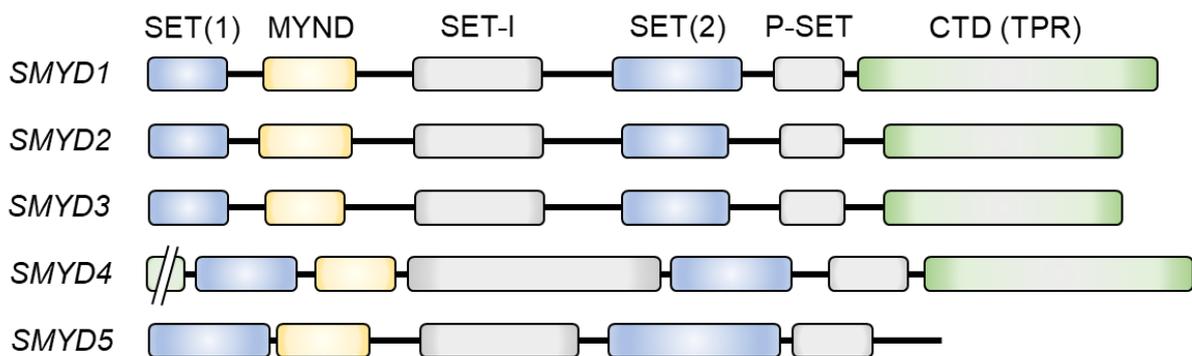


Figure 10. Domaines protéiques de la famille de lysine méthyltransférases SMYDs. Les différents domaines SET (bleu), MYND (jaune), SET-inhibiteur et post-SET (gris), ainsi que le domaine C-terminus, ou TPR, (vert) sont indiqués avec une taille proportionnelle à leur longueur en acide aminé. Le domaine TPR N-terminal de SMYD4 a été tronqué graphiquement.

Bien que clivé par le domaine MYND, le domaine SET présente une topologie relativement similaire aux domaines SET retrouvés chez les autres KMTs. Tandis qu'un domaine SET central vient assurer l'activité catalytique, des sous-domaines post-SET, SET-I et pré-SET sont là pour aider à accommoder le substrat et différents cofacteurs, comme le SAM (Spellmon et al. 2015). Le domaine MYND, quant à lui, n'interviendrait pas dans l'activité catalytique, du moins pas sur celle détectée sur H3K4 par SMYD2, ce qui laisse, comme nous le verrons plus tard, une certaine ambiguïté (Abu-Farha et al. 2008). Il trouverait plutôt ses fonctions dans la régulation d'interactions avec des régions riches en proline, ou encore, dans le cas de SMYD3, directement avec l'ADN (S. Xu et al. 2011). Enfin le domaine CTD est extrêmement similaire au domaine TPR (« Tetratricopeptide-repeats »), essentiel dans

les phénomènes de liaison avec des protéine chaperonnes, telles que HSP90. Ainsi, de nombreuses preuves viennent argumenter la relevance physiologique des complexes formés entre SMYD2 ou SMYD3 avec les HSP90, via cette CTD. Ces interactions serviraient notamment à réguler finement l'ouverture de la poche de liaison au substrat du domaine SET et moduler sa sélectivité (Sirinupong et al. 2011; Chandramouli and Chillemi 2016; Chandramouli, Melino, and Chillemi 2019).

Les SMYDs semblent avoir des tropismes tissulaires relativement différents. SMYD1 est presque uniquement présent dans le tissu cardiaque embryonnaire, puis perdu dans les tissus adultes. La délétion de SMYD1, constitutive ou conditionnelle dans le lignage des cardiomyocytes, est d'ailleurs létale due à des malformations cardiaques (Gottlieb et al. 2002; Rasmussen et al. 2015). SMYD2 est exprimé essentiellement dans le tissu musculaire cardiaque adulte. Tandis que SMYD3, SMYD4 et SMYD5 sont quant à eux exprimés de façon ubiquiste dans la plupart des tissus, y compris le tissu myocardique (Tracy et al. 2018) (**Figure 11**).

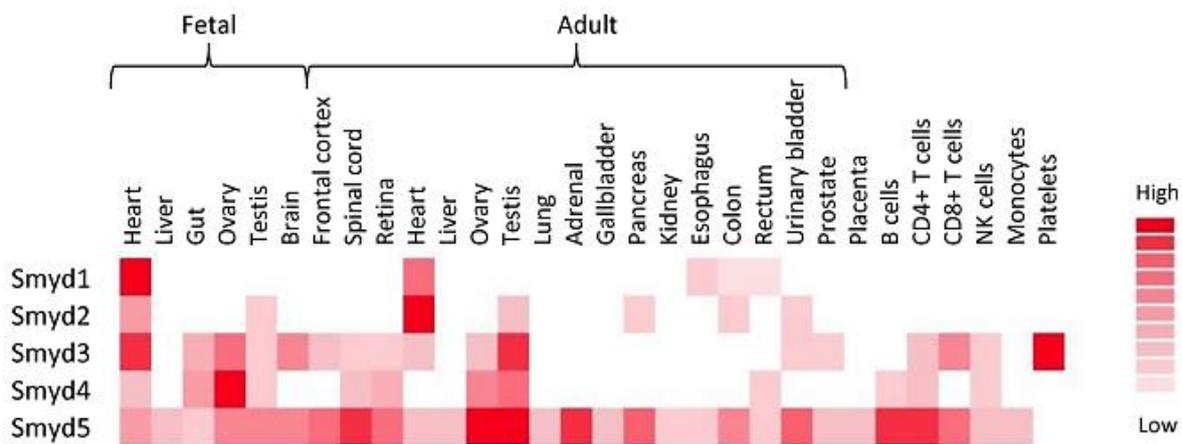


Figure 11. Expression des protéines SMYDs dans les tissus humains. Illustration issue de (Tracy et al., 2018). Est représenté l'expression relative des SMYDs dans différents tissus, telle que mesurée par spectrométrie de masse. On notera la quasi-exclusivité de l'expression de SMYD2 dans le tissu myocardique.

L'activité lysine méthyltransférase des SMYDs est encore en exploration. SMYD2 et SMYD3 sont clairement des enzymes actives, méthylant de nombreux substrats, notamment impliqués dans les cancers. SMYD1 est capable de tri-méthyliser H3K4 *in vitro* (Tracy et al. 2018). SMYD5 catalyserait la tri-méthylation de H4K20, afin de réprimer la transcription (Stender et al. 2012). Cependant, aucune activité méthyltransférase n'a été détectée à ce jour pour SMYD4.

1.2. SMYD2 : une structure expliquant la promiscuité

Le mécanisme catalytique de SMYD2 est assez classique et a pu être élucidé par les travaux de 2011 du structuraliste Andrew Ferguson. La poche de liaison au cofacteur est formée par les domaines SET, SET-I et post-SET et vient accommoder le SAM, notamment grâce au noyau aromatique de la phénylalanine F260 et à la chaîne latérale de la lysine K17. La poche de liaison au substrat permet quant à elle d'accueillir des substrats de conformation incurvée, en forme de U, en les stabilisant grâce notamment à la phénylalanine F184. La très conservée tyrosine, Y240 dans le cas de SMYD2, apporte enfin le SAM à la lysine cible, permettant une proximité nécessaire au transfert du méthyle (Ferguson et al. 2011) (**Figure 12**). Des versions mutantes de SMYD2 ont pu d'ailleurs être développées, dénuées de toute activité catalytique : la F184A et la Y240A (Ferguson et al. 2011; Reynoird et al. 2016a).

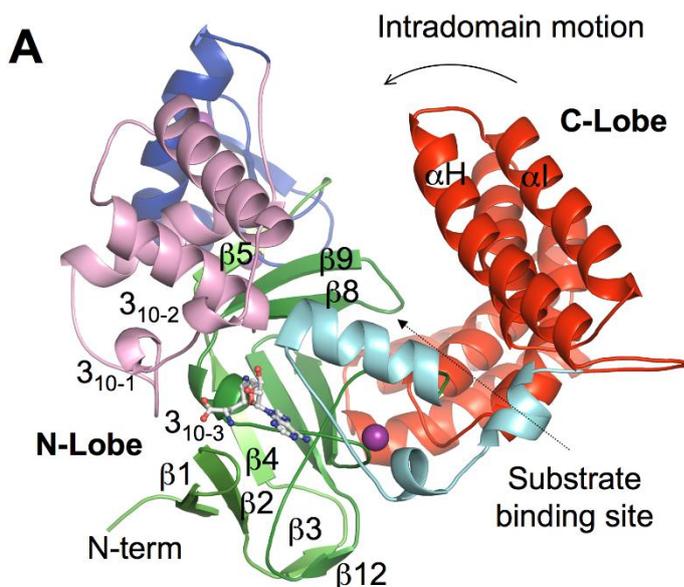


Figure 12. Structure de la KMT SMYD2. Représentation issue de (Spellmon et al., 2015).

Comme nous allons le constater dans le paragraphe suivant, SMYD2 est une enzyme d'une grande promiscuité, c'est-à-dire qu'elle est capable d'accueillir et de méthyler un grand nombre de substrats. L'explication de cette large spécificité de substrat nous a été apportée par les études structurales de SMYD2 en complexe avec différents peptides provenant de quelques-uns de ses substrats (eg., ER et p53). En effet, la poche de reconnaissance de substrat de SMYD2 est particulièrement volumineuse, permettant ainsi à des substrats de conformations incurvées relativement différentes de venir s'y loger, et d'engager des interactions de natures diverses (Ferguson et al. 2011; L. Wang et al. 2011; Y. Jiang et al. 2014).

SMYD2 est également régulé directement par modifications post-traductionnelles. Ce niveau de régulation a été récemment mis en évidence au sein de cardiomyocytes, où SMYD2 peut-être oxydé et glutathionylé au niveau de la cystéine C13. Malgré la proximité de la lysine K17 et de son importance dans la liaison au SAM, les auteurs ont démontré que cette modification n'impactait pas sur l'activité catalytique de SMYD2 (Munkanatta Godage et al. 2018). En 2021, les laboratoires de Jean Calvet et Xiaogang Li, ont montré que SMYD2 était phosphorylé par les sérine/thréonine kinases CDK4 et CDK6. Bien que le ou les résidus modifiés soient encore inconnus, il semblerait que cette phosphorylation stimule l'activité méthyltransférase de SMYD2 sur H3K4 et H3K36 (L. X. Li et al. 2020).

2. Diversité des substrats de SMYD2

Un des points essentiels dans la compréhension des fonctions d'une enzyme, et plus particulièrement ici d'une KMT, est de caractériser son répertoire de substrat. Autrement dit, quelles protéines SMYD2 est-elle capable de méthyler ? De nombreuses études ont cherchées à répondre à cette question depuis la découverte de SMYD2 en 2006 (Brown et al. 2006). En partant d'un rôle attendu sur les histones, les chercheurs ont su s'abstraire de la contrainte nucléaire et apporter de nouveaux horizons au répertoire fonctionnel de SMYD2, aux confins du cytoplasme. Y a-t-il un avenir pour la méthylation des protéines de surface, voire sécrétées ?

2.1. Une histone méthyltransférase ?

Tout d'abord, pourquoi un point d'interrogation ? Jusqu'à récemment, l'essentiel des recherches sur la méthylation des lysines était ainsi porté sur les histones et son rôle dans le remodelage de la chromatine et la régulation de la transcription. Mais cette tendance a généré un biais fondamental consistant à attribuer systématiquement aux nouvelles KMTs, encore orphelines, un substrat histone. Ce biais est devenu une source importante d'erreurs car les méthodes de caractérisation de l'époque, essentiellement à base d'anticorps spécifiques de marques de méthylation canoniques, n'était souvent pas assez précises pour déterminer le lien causal entre une KMT et la méthylation du substrat. Un travail conséquent d'analyse bibliographique est venu récemment apporter une relecture vérifiée des liens entre KMT et substrats histones (Husmann and Gozani 2019). Certains liens relèvent clairement

de la fraude scientifique, comme le cas de MLL5, dont l'article original, paru en 2014 a été rétracté pour manipulation d'image (Fujiki et al. 2014). L'absence d'activité ayant été directement démontrée peu de temps après (Mas-Y-Mas et al. 2016). D'autres liens sont uniquement inférés sans aucune preuves factuelles, tels que SETDB2, supposé être capable de méthyle H3K9, à l'instar de son homologue SETDB1. Enfin certains demeurent incertains, comme SMYD2.

Alors que différentes KMTs à domaine SET embrayent le pas de SUV39H1 (Rea et al. 2000; Nishioka et al. 2002), dont SMYD1 et SMYD3 (Gottlieb et al. 2002; Hamamoto et al. 2004), la présence de ce fameux domaine SET sur SMYD2 interroge. SMYD2 possède-t-elle une activité lysine méthyltransférase elle-aussi ? En 2006, un premier élément de réponse est apporté : SMYD2 est capable de catalyser la di-méthylation de H3K36 *in vitro*, à la fois sur histone isolé et sur octamère d'histones (Brown et al. 2006). Puis en 2008, cette marque est contestée, au profil d'une autre modification : la mono-/di-/tri-méthylation de H3K4, où l'utilisation d'un anticorps non-spécifique pour la valence de méthylation rend toute caractérisation plus fine impossible (Abu-Farha et al. 2008). Sur un panel de différents peptides d'histone et d'histone recombinants, il a été démontré que SMYD2 est en fait incapable de méthyle H3K4 et très faiblement H3K36. En revanche, une forte activité pour les histone recombinants H4 et H2B est détectée (J. Wu et al. 2011). Cette propriété de SMYD2 à méthyle H4 est d'ailleurs élégamment validée dans un modèle d'infection latente au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), qui démontre que SMYD2 est capable de méthyle *in vitro* H4K20, et est nécessaire au maintien de cette marque *in vivo* (Boehm et al. 2017). Face à ces nombreux résultats contradictoires, souvent artéfactuels, la relevance de SMYD2 comme histone lysine méthyltransférase demeure donc incertaine.

Je ne prendrais personnellement pas partie dans cette introduction. Cependant il est utile de rappeler que si SMYD2 est en effet capable de méthyle de nombreuses histones libres, ou même des octamères *in vitro*, aucune démonstration formelle sur nucléosome, véritable substrat physiologique dans le cadre de la chromatine, n'a été concluante jusqu'à présent. Réciproquement, on ne peut exclure que SMYD2 nécessite certains facteurs extrinsèques afin de méthyle les histones dans le cadre du nucléosome, comme c'est le cas pour certaines KMTs, telles que MLL1 nécessitant le complexe COMPASS (« Complex Proteins Associated with Set1 ») pour di-/tri-méthyle H3K4 (Cenik and Shilatifard 2021). Le débat sur l'activité histone lysine méthyltransférase de SMYD2 nécessite donc d'être sereinement approché dans les prochaines années afin d'en tirer des conclusions claires.

2.2. Substrats non-histones gravitant autour de la chromatine

Simultanément à la première démonstration de l'activité KMT sur histone, le laboratoire de Shelley Berger met en évidence un substrat inattendu pour SMYD2. Il s'agit non pas d'une histone, mais de la protéine suppresseur de tumeur p53 (Huang et al. 2006) (**Figure 13**). Cette découverte fait directement écho à la découverte deux plus tôt, par le laboratoire de Danny Reinberg, de la mono-méthylation de p53 sur la K372 par SETD7. En effet, bien que SETD7 ait été initialement lié à la méthylation de H3K4, ils démontrent que l'activité de SETD7 n'est restreinte qu'aux histones libres ou aux octamères et en aucun cas au nucléosome, le rendant donc peu susceptible d'une régulation physiologique de la chromatine. En utilisant une librairie de peptide candidats, ils observe une méthylation sur p53 au niveau de la lysine K372 (Chuikov et al. 2004). L'histoire se répétant pour SMYD2, la mono-méthylation de la lysine K370 de p53 est décrite. Dans cette élégante étude, teintant pour les quinze prochaines années la recherche sur SMYD2, les auteurs démontrent que la KMT catalyse la méthylation de p53 afin de réprimer son activité co-transcriptionnelle. Cette méthylation entre d'ailleurs dans un antagonisme direct avec celle de la K372 : la méthylation par SETD7 bloque l'accessibilité de la K370 pour SMYD2, empêchant la réaction catalytique. Finalement, ils achèvent la description de ce mécanisme par la découverte du rôle de la lysine déméthylase LSD1 dans la déméthylation de cette marque, et de la reconnaissance spécifique de la di-méthylation de la lysine K370 par la protéine 53BP1 via ses domaines lecteurs TUDOR (Huang et al. 2007). Par la suite de nombreuses autres KMTs, KDMs et lecteurs de la méthylation vont graviter autour de cette « queue » C-terminale de p53, flexible et accessible à la manière des « queues » N-terminales des histones, massivement modifiées. Ainsi, p53 est devenu un exemple emblématique du rôle de la signalisation par méthylation des lysines sur les protéines non-histones et SMYD2 y joue un rôle central. Ma première année de thèse fut d'ailleurs entièrement dédiée à l'étude de la dynamique de la méthylation de p53. Les résultats feront l'objet d'une courte annexe.

Toujours non loin des histones, dans la contrainte nucléaire, le laboratoire du Dr. Gozani montre que SMYD2 mono-méthyle la protéine suppresseur de tumeur RB (« Retinoblastoma protein ») au niveau de la lysine K860 (Saddic et al. 2010). De la même façon que p53, la méthylation de RB par SETD7 avait été récemment observée sur une lysine à proximité, la lysine K873 (Munro et al. 2010). Cette méthylation par SMYD2 est conservée dans les cellules quiescentes afin de maintenir la protéine RB active, puis perdue lors de l'entrée dans le cycle cellulaire. Enfin, mécaniquement, les auteurs montrent que la méthylation est lue par la protéine L3MBTL1 afin de compacter la chromatine, éteignant des gènes importants pour l'avancée du cycle cellulaire (Saddic et al. 2010). En 2012, dans

l'équipe de Ryuji Hamamoto, une toute autre dimension est apportée à la méthylation de RB par SMYD2. En effet, ils montrent que SMYD2 mono-méthyle également un autre résidu, la lysine K810. Contrairement à la lysine K860 qui aurait tendance à bloquer l'entrée en cycle cellulaire, les auteurs montrent ici que la méthylation de la lysine K810 contribue à l'augmentation de la phosphorylation des sérines adjacentes S807/S811 afin de stimuler la progression du cycle cellulaire (Cho et al. 2012). La mono-méthylation de la lysine K810 avait au préalable déjà été observée, en 2011, mais comme étant dépendante d'une autre KMT, SETD7. Fait surprenant, les auteurs montrent que la méthylation de la lysine K810 empêche les phosphorylations des sérines S807/S811 par CDK4 (« Cyclin-dependent kinase 4 »), participant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire (Carr et al. 2011). Ainsi, les résultats concernant la méthylation de la lysine K810 et ses conséquences fonctionnelles semblent contradictoires.

En 2013, le laboratoire du Dr. Shi caractérise la mono-méthylation du récepteur aux œstrogènes (ER) sur la lysine K266 par SMYD2. Les travaux menés par son équipe décrivent un mécanisme par lequel la méthylation de la lysine K266 entre en compétition directe avec l'acétylation des lysines K266/K268. Ainsi l'activation de ER par son ligand, l'œstrogène, menait à une perte de la méthylation et réciproquement une augmentation de l'acétylation. Ils démontrent également que la déméthylation de la lysine K266 par LSD1 permet de rétablir cette acétylation et de promouvoir l'interaction avec le lecteur d'acétylation p300/CBP afin d'activer les fonctions co-activatrices de ER (X. Zhang et al. 2013). Enfin, en 2019, le laboratoire du Dr. Wang identifie la di-méthylation de la lysine K307 de EZH2 par SMYD2, et son rôle dans la stabilisation de la protéine. Néanmoins, la valence de cette méthylation est surprenante. Si l'interaction de SMYD2 et EZH2 semble bien démontrée, l'évènement de méthylation est peu supporté par les données disponibles. Le complexe SMYD2/EZH2 serait capable de promouvoir un programme transcriptionnel de gènes liés à la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT), processus que nous allons largement discuter dans le chapitre prochain, couvrant la migration cellulaire (Y. Zeng et al. 2019a). Ainsi, SMYD2 est capable de méthyler différents substrats non-histones, gravitants autour de la chromatine, et obéissants bien à cette signalisation par méthylation des lysines.

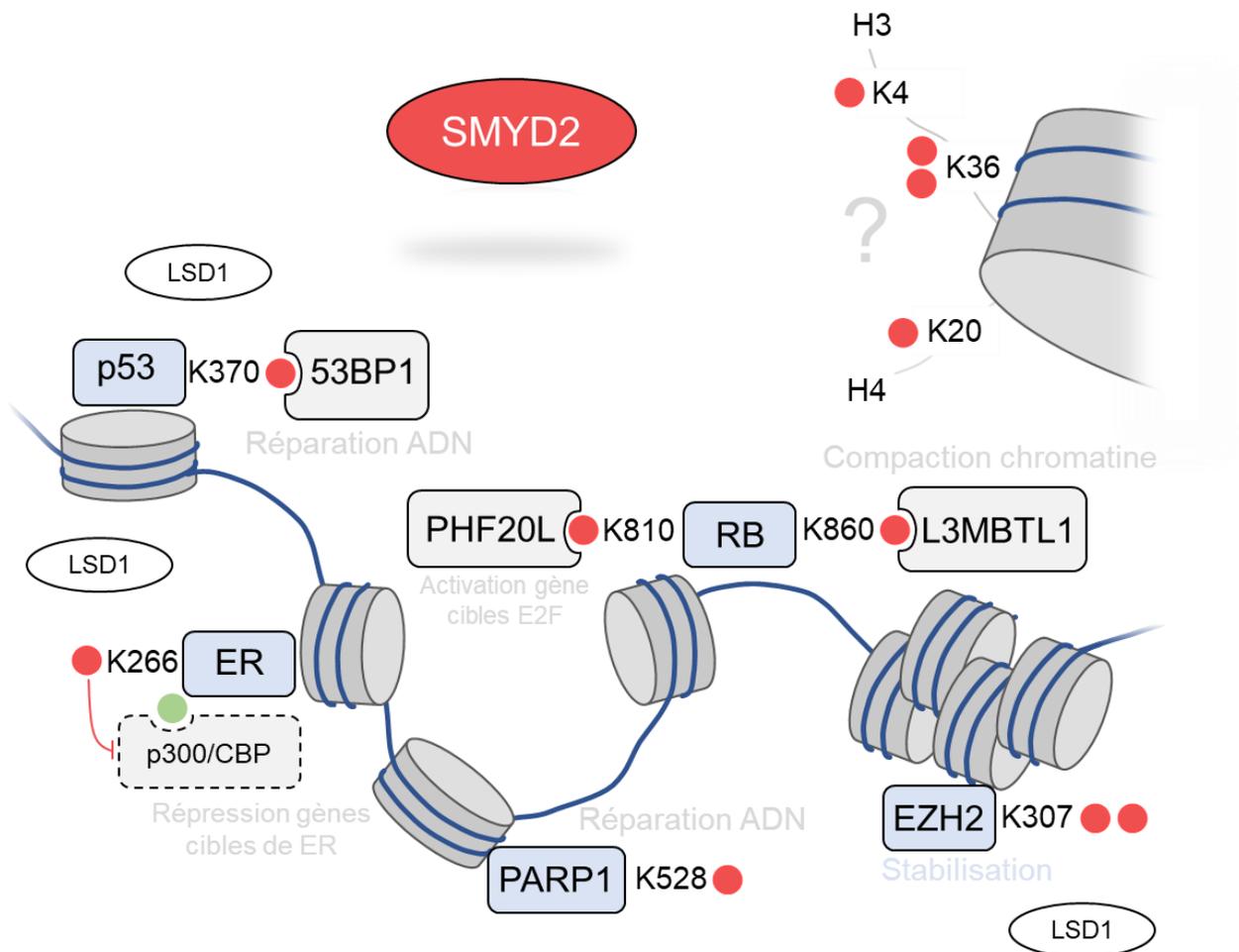


Figure 13. Substrats nucléaires de SMYD2 et signalisation associées. Dans ce schéma est représenté les différents substrats nucléaires de SMYD2 connus à ce jour. Bien que la méthylation des histones reste une question en suspens, la méthylation de substrats non-histone semble également influencer sur la chromatine et différents processus. De façon récurrente, la lysine déméthylase LSD1 est identifier comme pouvant déméthyliser ces substrats. Cependant, la spécificité de ces réaction de déméthylation peut être remise en cause dans de nombreuses études.

2.3. Une KMT cytoplasmique

Un fait particulièrement irrécyclable avec les fonctions nucléaires de SMYD2 émane de sa localisation. SMYD2 est une protéine très largement cytoplasmique, et ce dans des modèles cellulaires très différents, allant de cellules embryonnaires, à des lignées myoblastiques murines et du tissu musculaire strié humain (Donlin et al. 2012).

En 2011, le laboratoire du Dr. Couture utilise une approche sensiblement différente pour élucider les mécanismes d'action de SMYD2, et des SMYDs en général. Par analyse protéomique des interacteurs de SMYD2, SMYD3 et SMYD5, l'équipe dresse un réseau dans lequel elle trouve notamment les protéines chaperonnes HSP90 α et HSP90 β (**Figure 14**). Ainsi ils démontrent que la protéine HSP90 α est méthylée par SMYD2 au niveau des lysines K209 et K615 dans le cytoplasme. Ils montrent également la réversibilité de cette marque, puisqu'elle est sensible à la déméthylation par LSD1. De façon intéressante, ils montrent que l'environnement biochimique est essentiel à la sélectivité de la méthylation : tandis que la lysine K615 est le site majeur de méthylation à pH physiologique, la lysine K215 devient davantage méthylée en condition alcaline. Ils avancent alors un concept intéressant de compartimentalisation de l'activité catalytique de SMYD2, où un environnement alcalin, par exemple à proximité directe des queues d'histones, pourrait résulter en une sélectivité différente de SMYD2 (Abu-Farha et al. 2011). Ce concept n'a pas été creusé davantage depuis. De façon indépendante, deux autres laboratoires montrent que SMYD2 est capable de mono-méthyliser HSP90 α au niveau de la lysine K615. Ils apportent alors un trait fonctionnel essentiel à cette marque de méthylation : elle favoriserait la formation d'un complexe avec la Titine, une protéine essentielle à la formation des sarcomères, afin de les stabiliser (Donlin et al. 2012; Voelkel et al. 2013).

En 2016, le Dr. Gozani et son équipe montrent que SMYD2 méthyle la lysine K355 de la kinase MAPKAPK3 (« MAPK Activated Protein Kinase 3 ») dans des lignées de carcinome pancréatique canalaire. Cette méthylation serait notamment importante dans les mécanismes de réponse au stress cellulaires, fréquemment rencontrés au sein des tumeurs (Reynoird et al. 2016a). De façon intéressante, peu de temps après, une méthylation SMYD2-dépendante des protéines p65 et STAT3, respectivement sur les K685 et K221/K310, est suggérée par l'équipe du Dr. Li. Ces deux protéines sont également des acteurs essentiels de réponse au stress cellulaire, et leur méthylation est associée à la perte de leur phosphorylation, promouvant la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (L. X. Li et al. 2017; 2018a). En 2017, il est démontré que SMYD2 est capable de mono-méthyliser la lysine K133 de la β -Caténine. Dans leur étude, les auteurs observent que cette

méthylation est importante pour favoriser l'import nucléaire de la β -caténine, prémisses de ses fonctions co-transcriptionnelles. Mécanistiquement la méthylation favoriserait la formation d'un complexe de la β -caténine avec FOXM1 (« forkhead box protein M1 »), une protéine cruciale à la translocation nucléaire de la β -caténine. La translocation de la β -caténine permettant de coordonner un programme transcriptionnel favorable à la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (Deng et al. 2017). SMYD2 méthylerait également le domaine kinase du récepteur membranaire BMPR2, afin d'activer des voies de signalisation de survie SMAD-dépendantes (S. Gao et al. 2017). Enfin, en 2021, l'équipe de Xiaogang Li montre que SMYD2 est capable de catalyser la tri-méthylation de la tubuline alpha sur la lysine K394, afin de stabiliser les microtubules au sein d'une structure spécialisée appelée le cil (L. X. Li et al. 2020). Notons que cette dernière méthylation est surprenante du fait de sa valence, une tri-méthylation alors que SMYD2 n'est capable catalytiquement que de mono-méthylation, et n'a été validée que par association indirecte en utilisant un anticorps spécifique reconnaissant cette marque.

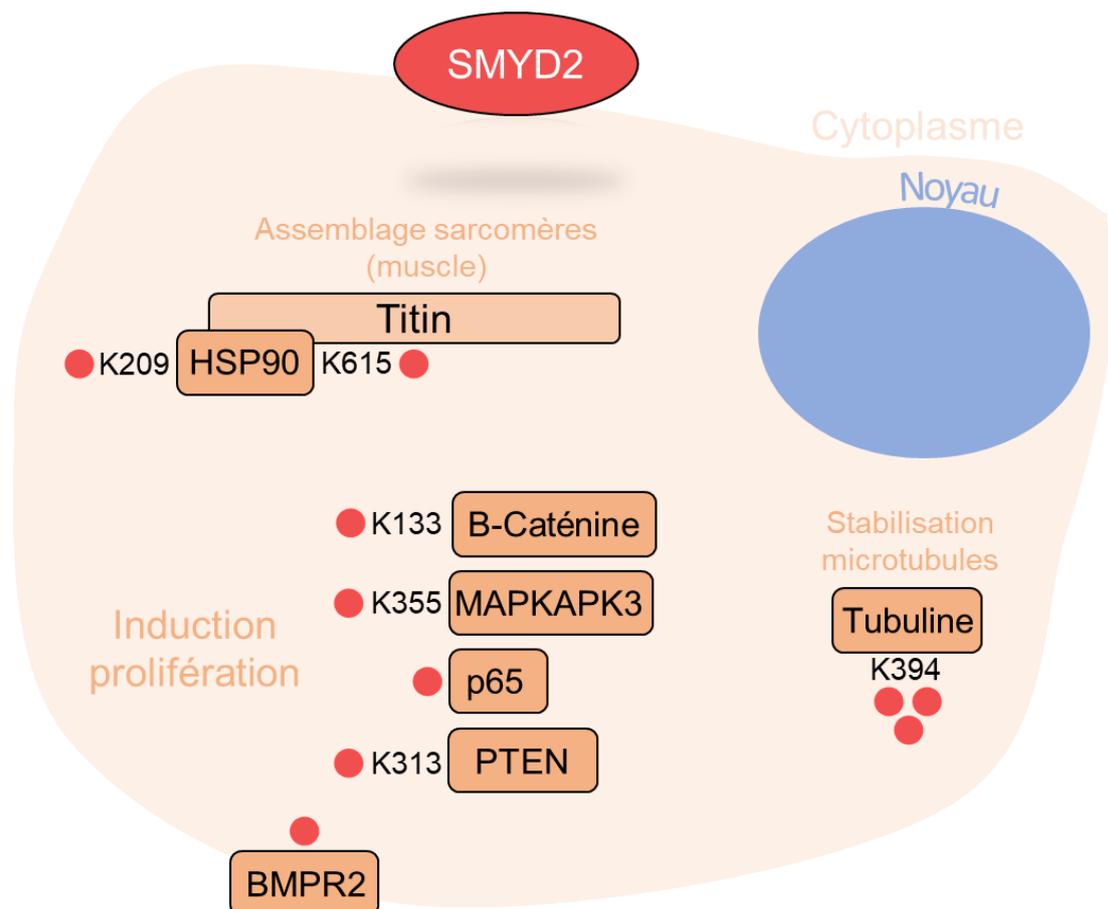


Figure 14. Substrats cytoplasmiques de SMYD2 et fonctions associées. Dans ce schéma est représenté les différents substrats cytoplasmiques de SMYD2 connus à ce jour.

Ces différents substrats caractérisés laissent entrevoir la diversité du méthylome de SMYD2, s'engageant bien au-delà de la chromatine. L'intérêt de ces études, focalisées sur un substrat donné, est de donner une signification fonctionnelle à ces différentes marques. Nous allons nous consacrer dans la partie suivante à présenter la méthode opposée, qui est d'entrevoir le méthylome dans sa globalité en utilisant différentes techniques, sans caractériser la signalisation dépendante des substrats découverts.

2.4. Le méthylome de SMYD2

En 2016, deux analyses protéomiques mettent en évidence un répertoire de substrats de SMYD2. L'équipe menée par le Dr. Schapira, propose une première approche bioinformatique rétrospective basée sur une analyse du motif consensus pouvant correspondre aux substrats de SMYD2. Ils parviennent alors à confirmer *in vitro* 6 nouveaux substrats, parmi lesquels : MAPT, CCAR2, EEF2, NCOA3, STUB1, et UTP14A (Ahmed et al. 2016). La seconde étude, menée dans le laboratoire de Hannah Nguyen, utilise une méthode prospective basée sur une analyse protéomique quantitative, et donc présente une bien plus grande fiabilité. Dans cette étude, les protéines sont étiquetées par SILAC (voire les méthodes), et les protéines spécifiquement méthylées sont enrichies par immuno-affinité, à l'aide d'anticorps pan-monométhyl. Ainsi, en jouant sur l'expression ou l'activité de SMYD2 au sein des cellules, les auteurs parviennent à dresser pour la première fois un répertoire des substrats de la KMT, comportant près de 35 protéines (Olsen et al. 2016a).

Dans un autre registre, fin 2018, le laboratoire de Scott B. Rothbart utilise une approche innovante afin de déterminer la séquence consensus respective de trois KMTs, et par extension leur répertoire de substrats : G9A, SETD8 et SMYD2. Ils effectuent pour cela des tests de méthylation *in vitro* sur une librairie de peptides dégénérés de 9 acides aminés contenant toutes les séquences possibles flanquant une lysine centrale. Grâce à cette méthode, notamment non biaisée par la digestion par spectrométrie de masse incombant toute caractérisation de lysine méthylée à ce jour, ils identifient un motif consensus pour SMYD2 et surtout mettent en évidence les paramètres séquentiels responsables de l'affinité de SMYD2 pour ses substrats. En revanche, les paramètres structuraux ne peuvent être appréciés compte-tenu de la petite taille des peptides utilisés. Grâce à cette méthode ils valident la méthylation *in vitro* de nombreux substrats, tels que PRMT11, CDC5L, PER2 et ATP6V1G3 (Cornett et al. 2018). On notera que la grande majorité des substrats identifiés ont une localisation cytoplasmique, renforçant l'idée d'un rôle de SMYD2 éloigné de la chromatine.

3. Rôles physio-pathologiques de SMYD2

3.1. Rôle de SMYD2 dans la physiopathologie cardiovasculaire

Paradoxalement à son vaste répertoire fonctionnelle, SMYD2 semble tout à fait dispensable au cours du développement murin. En effet, l'invalidation de SMYD2 chez la souris est parfaitement viable, sans problème de fertilité détecté.

Le haut niveau d'expression de SMYD2, et des SMYDs en général, dans le tissu myocardique ont néanmoins poussé d'intense recherches sur les fonctions que la KMT pourrait avoir dans ce tissu. Cependant, contrairement au phénotype léthal de malformation cardiaque, résultant de l'invalidation de SMYD1 (Gottlieb et al. 2002), les fonctions de SMYD2 ne semblent pas essentielles au développement cardiaque chez la souris (Diehl et al. 2010). Dans un modèle murin d'extinction conditionnelle de SMYD2 dans le tissu myocardique, les auteurs n'observent aucun en effet aucune altération physiologique générale, en accord avec l'absence de nécrose ou de différence dans l'organisation des fibres musculaires cardiaques (Diehl et al. 2010). Ces résultats peuvent en revanche être nuancés à la lumière des fonctions de SMYD2 dans le développement cardiaque du poisson zèbre. Suite à l'invalidation de SMYD2, une étude montre que les poissons développent d'importantes malformations atriales menant à une insuffisance cardiaque par défaut de volume de rejection systolique (Voelkel et al. 2013). Une des raisons à cette apparente contradiction, outre le fond génétique lié à l'espèce, pourrait être le modèle murin conditionnel utilisé. En effet, ce dernier n'invalide SMYD2 que chez les progéniteurs ventriculaires, or le phénotype principal chez le poisson relève de l'atrium et de la rejection atriale.

Enfin, SMYD2 a également été liée à des phénomènes d'anévrisme de l'aorte abdominale, c'est-à-dire une dilatation localisée de l'aorte, le plus souvent dans sa portion proche des reins. L'expression de SMYD2 était alors largement éteinte dans les parois musculaires aortiques de ces patients, une absence probablement à l'origine d'une réponse hyper-inflammatoire (G. T. Jones et al. 2017; Toghil et al. 2018; W. Tang et al. 2020). En effet, certains liens ont été établis entre SMYD2 et l'inactivation de la polarisation des macrophages, concourant ainsi à un environnement anti-inflammatoire (G. Xu et al. 2015). L'absence de SMYD2 est donc un bon argument expliquant cette hyper-inflammation des parois aortiques. Davantage d'études sur les rôles physiopathologiques de SMYD2 sont néanmoins requises.

Les fonctions moléculaires de SMYD2 ont également été bien décrites dans les tissus myocardiques et musculaires striés (**Figure 15**). Comme évoqué précédemment, SMYD2 est capable de méthyler HSP90. Cet événement de méthylation a été largement caractérisé *in vitro* dans des lignées cellulaires myoblastiques, ainsi que *in vivo* dans des tissus musculaires. Cette méthylation est absolument essentielle afin de permettre le complexe de SMYD2 et HSP90 avec le domaine N2A de la Titine au niveau des bandes I des sarcomères. La formation de ce complexe permettrait notamment de stabiliser la titine et l'intégrité des sarcomères (Donlin et al. 2012; Voelkel et al. 2013). De façon intéressante, en 2018, une étude montre le rôle pivot de l'oxydation, ou la glutathionylation, de la cystéine C13 de SMYD2 dans ce processus. À la suite d'un stress oxydant, cette cystéine est modifiée menant à la dissociation du complexe, à la dégradation de la titine et à une déstabilisation des sarcomères (Munkanatta Godage et al. 2018). Cette étude fait d'ailleurs écho à celle de 2014, utilisant des sels de cobalt afin de générer un stress oxydant dans des cardiomyocytes de rat à l'origine de l'inactivation de SMYD2. Dans cette étude, les sels de cobalt induisent la baisse d'expression de SMYD2, levant ainsi son rôle protecteur médié par la méthylation inactivatrice de p53 : la perte de la méthylation de p53 déclenche l'apoptose des cardiomyocytes (Sajjad et al. 2014). Ainsi, le stress oxydant serait un signal « input » particulièrement attractif dans la régulation des fonctions de SMYD2 dans les tissus musculaires.

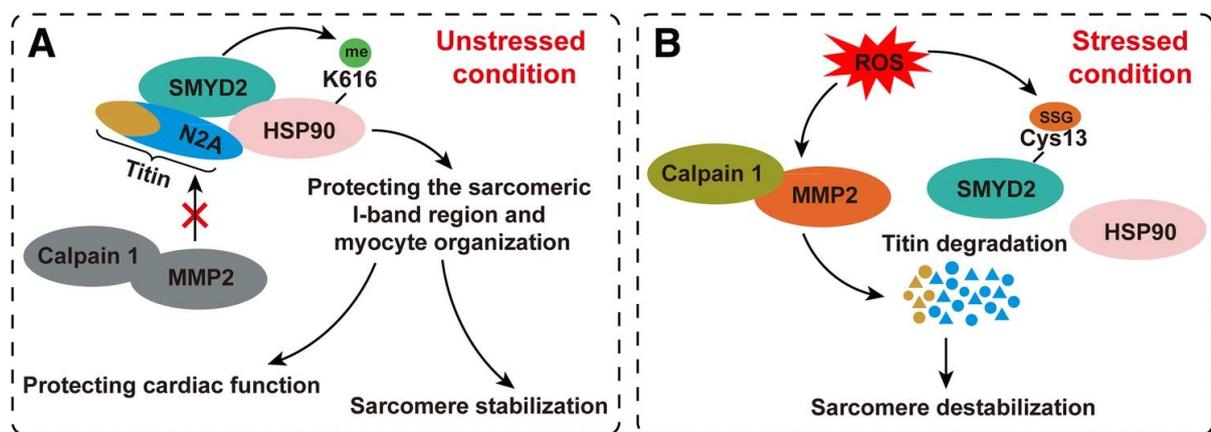


Figure 15. Fonctions moléculaires de SMYD2 liées à la physiologie cardiaque. Schéma adapté de (Yi et al., 2018). Dans une situation normale (« *unstressed condition* »), SMYD2 interagit avec HSP90 et le domaine N2A de la Titine afin de mono-métyler KSP90 K616me1. Ainsi, ce complexe empêche la dégradation de la titine par la Calpaine et MMP2. En cas de stress oxydant, SMYD2 est glutathionylé sur la cystéine C13, dissociant le complexe avec HSP90 et la Titine. De cette manière, la Titine est dégradée par les métalloprotéases, menant à la déstabilisation des sarcomères.

3.2. Rôle de SMYD2 dans les cancers

Les fonctions méthyltransférases de SMYD2 ont été caractérisées dans de nombreux types de cancer, et souvent associées à une progression de la maladie. Conjointement, la présence de SMYD2 a été associée à un mauvais pronostic dans le cancer malpighien de l'œsophage, la leucémie aigüe lymphoblastique, le cancer colorectal, le cancer papillaire de la thyroïde, le carcinome hépatocellulaire, le cancer du sein, et différents cancers gynécologiques et hématologiques (Shuhei Komatsu et al. 2009; Sakamoto et al. 2014; S. Komatsu et al. 2015; W. Xu et al. 2018; Zuo et al. 2018; Y. Zeng et al. 2019a; Brown et al. 2020; Engqvist et al. 2020).

Une des descriptions les plus complètes du rôle de SMYD2 au cours de la tumorigénèse nous est probablement apporté par les travaux de 2016 de Nicolas Reynoird, au sein de l'équipe de Or Gozani (**Figure 16**). Au cours de la tumorigénèse pancréatique, SMYD2 joue un rôle décisif dans les processus d'initiation et de progression de la maladie. Dans différents modèle murins, modélisant d'une part les stades précoces métaplastiques (« PanINs) et d'autre part l'adénocarcinome pancréatique canalaire (« PDAC »), ils démontrent le rôle pivot de SMYD2, notamment via ses fonctions permettant l'adaptation au stress cellulaire, inhérent à la transformation cancéreuse. Par ailleurs ils démontrent qu'à l'instar de SMYD3, l'inhibition de SMYD2 permet de générer un environnement plus permissif à la chimiothérapie (eg., Gemcitabine), et ainsi améliorer la survie *in vivo* (Reynoird et al. 2016a). Cette étude indique donc le potentiel de SMYD2 dans le contrôle de la plasticité des cellules cancéreuses, une notion que l'on reverra dans le prochain chapitre, relatif au cancer du sein.

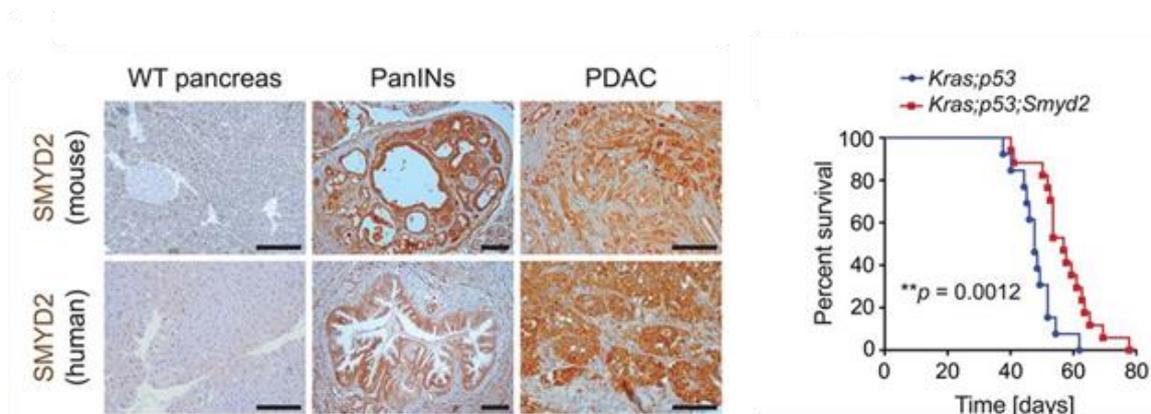


Figure 16. Rôle oncogénique de SMYD2 durant la tumorigénèse pancréatique. Ce panel est issu de (Reynoird et al., 2016). On note la surexpression de SMYD2 déjà présente dans les lésions précancéreuses, qui s'amplifie par la suite lors de la progression vers l'adénocarcinome canalaire. L'inactivation de SMYD2 (courbe rouge) dans un modèle de carcinogénèse pancréatique murin étant effectivement lié à une survie améliorée.

Parmi les différents cancers, celui qui a probablement été le plus lié à SMYD2 est le cancer du sein. A raison, puisque la localisation de SMYD2 sur le bras « long » du chromosome 1 (1q), le rend particulièrement susceptible aux phénomènes d'amplifications géniques du bras 1q fréquemment observées dans les cancers du sein (Andre et al. 2009; L. Liu et al. 2015a). Ainsi, une analyse des données du TCGA rapporte une amplification de SMYD2 chez plus de 20% des patients atteints de cancer du sein, tous types confondus (L. X. Li et al. 2018a). Cette analyse est particulièrement congruente avec les deux différents rapports attestant de la surexpression de SMYD2 dans les cancers du sein, et plus particulièrement ceux de sous-type moléculaire « basal-like », ou triple-négatif, sous-type connu pour son mauvais pronostic (L. X. Li et al. 2018a; Y. Zeng et al. 2019a). Enfin, une récente analyse bio-informatique sur l'expression de SMYD2 vient confirmer que le niveau d'expression de SMYD2 est globalement plus élevé dans les tissus de cancer du sein que les tissus sains. Ils démontrent notamment son utilité potentielle en tant que biomarqueur diagnostique, et sa relevance pronostique chez les patients avec un cancer du sein présentant une récurrence métastatique : les patients présentant des niveaux élevés de SMYD2 seraient plus à risque de récurrences métastatiques (J. Song et al. 2019).

Contrairement à ce que pourrait laisser suggérer sa grande diversité de substrats, peu de fonctions biologiques différentes ont été attribuées à SMYD2 dans les cancers. En effet, elles se résument presque essentiellement à une régulation de la prolifération et de la mort cellulaire, rapprochant ainsi SMYD2 du concept d'oncogène. Les méthylations de p53, RB1, β -Caténine ou encore de ER, ont toutes été décrites comme participant à la prolifération et la survie de différents types de cellules cancéreuses. De nombreuses négligences dans l'interprétation de la littérature ont d'ailleurs mené à l'amalgame de considérer que les méthylations de RB1 et de ER favorisaient la prolifération, alors qu'il s'agissait de l'effet inverse, les méthylations de RB1 et de ER par SMYD2 concourant à stopper la prolifération. Les mécanismes liés ont été décrits dans la partie précédente. Cependant une récente étude visant à caractériser de nouveaux inhibiteurs de la KMT démontre par invalidation génétique et inhibition pharmacologique que SMYD2 ne régule pas ces fonctions, du moins pas *in vitro* (Thomenius et al. 2018). Il est donc très probable que le rôle de SMYD2 dans la tumorigénèse impliquerait d'autres fonctions des cellules cancéreuses, comme leurs propriétés invasives (Y. Zeng et al. 2019a), ou bien participerait à la mise en place d'un environnement plus permissif à la progression tumorale, notamment via des mécanismes inflammatoires potentiellement immunosubversifs (Reynoird et al. 2016a). Davantage d'étude *in vivo* sont donc nécessaires afin de comprendre comment les cellules cancéreuses détournent les fonctions de SMYD2 à leur avantage pour promouvoir la tumorigénèse.

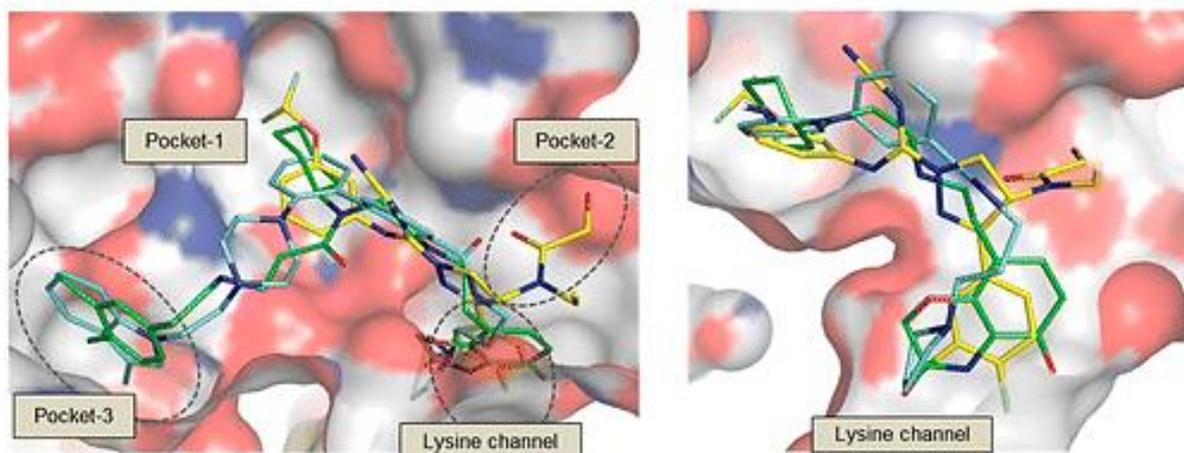
3.3. Développement des inhibiteurs de SMYD2

L'important rôle de SMYD2 au cours de la tumorigénèse, couplé à l'absence de phénotype physiologique évident lié à son invalidation, a évidemment motivé de nombreux projets visant à développer des inhibiteurs efficaces. Depuis la publication pionnière de la structure de SMYD2 en 2011, une douzaine d'inhibiteurs, avec des mécanismes différents ont été synthétisés et caractérisés. Ils sont le fruit de programmes internes de différentes compagnies comme AstraZeneca (AZ505), Bayer (BAY-598) ou Epizyme (EPZ033294 et EPZ032597), ou de la collaboration de laboratoires publics avec le consortium SGC (Structural Genomics Consortium in Toronto).

Le premier inhibiteur, le AZ505 présente un mécanisme d'action de compétition avec le substrat, et une capacité d'inhibition de l'ordre du micromolaire (Ferguson et al. 2011). Néanmoins, il présente une faible efficacité intracellulaire, sous le millimolaire, augmentant dramatiquement le risque de non-spécificité et de toxicité. Dans la même veine de développement, les inhibiteurs LLY-507 et A-893 ont été mis au point, et présentent des mécanismes d'action similaire à l'AZ505 (Nguyen et al. 2015; Sweis et al. 2015). Seul le LLY-507 a une capacité d'inhibition intracellulaire suffisante pour être utilisé pour bloquer l'activité de SMYD2 dans des cellules sans risquer une trop grande toxicité. En revanche, une récente étude de la spécificité de cet inhibiteur met en garde sur sa capacité à également inhiber d'autres enzymes (Thomenius et al. 2018). Il est intéressant de noter que les seuls inhibiteurs ayant abouti aux effets controversés antiprolifératifs et pro-apoptotiques de SMYD2 sont ces 3 inhibiteurs, présentant peu d'efficacité et de spécificité intracellulaire. Cela laisse suggérer que les effets phénotypiques observés sont largement non-spécifiques et liés à la toxicité de ces composés à dose trop importante.

En 2016, l'unité de recherche et développement de Bayer Pharma identifie un composé capable d'inhiber l'activité de SMYD2, de façon compétitive avec ses substrats, à des niveaux nanomolaires, et ce dans la cellule : le BAY-598 (**Figure 17**). Ils complètent ces résultats prometteurs avec d'excellents paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du composé, propulsant cette molécule au rang de premier inhibiteur de SMYD2 utilisable *in vivo* (Eggert et al. 2016b). Cet inhibiteur a été utilisé avec succès, notamment pour potentialiser les effets d'agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine ou la gemcitabine dans des modèle de xénogreffes de cancer de l'œsophage squameux (Eggert et al. 2016b) et d'adénocarcinome pancréatique murin (Reynoird et al. 2016a). Au cours de ma thèse, c'est cet inhibiteur qui a été utilisé afin de réprimer l'activité de SMYD2 *in vitro*, en cellule et *in vivo* dans le cancer du sein.

Figure 17. Comparaison des liaisons du BAY-598 avec SMYD2, par rapport aux autres inhibiteurs. Cette figure est issue du papier original caractérisant le BAY-598 (Eggert et al., 2016). Dans ces représentations, le BAY-598 est la molécule jaune, tandis que les molécules verte et cyan représentent deux autres inhibiteurs de SMYD2. De façon intéressante on remarque le BAY-598 revêt un mécanisme de fixation relativement différents des autres inhibiteurs, et vient se loger dans la poche 2, expliquant potentiellement sa spécificité accrue.



Récemment des chercheurs de la société Epizyme ont présenté et comparé les propriétés de deux nouveaux inhibiteurs, n'entrant cette fois pas en compétition avec les substrats de SMYD2, le EPZ033294 and le EPZ032597. Également à l'origine d'une inhibition de l'ordre du nanomolaire de l'activité intracellulaire de SMYD2, ils concluent, à l'instar du BAY-598, que l'inhibition de SMYD2 n'est pas responsable d'effet sur la prolifération (Thomenius et al. 2018). Actuellement, en 2021, deux structures de SMYD2 en complexe avec les inhibiteurs MTF1498 et MTF9975 sont disponibles, et les résultats devraient être prochainement publiés par les équipes du SGC (PDB : 6CBX et PDB: 6CBY, respectivement).

Bien que des inhibiteurs de différentes KMTs soient déjà entrés dans des essais cliniques, comme je l'ai évoqué dans le chapitre 1, aucun inhibiteur de SMYD2 n'a donc encore franchi ce cap, et restent donc cantonnés à des visées de recherche. La principale raison provient probablement du manque de donnée pré-cliniques et de la récentes mise en demeure des effets antiprolifératifs de certain inhibiteurs, pas assez spécifiques. Néanmoins les « inhibiteurs nanomolaires », comme le BAY-598 ou ceux synthétisés par Epizyme semblent d'excellents candidats comme futurs agents utilisables *in vivo*. Cependant, en absence d'impact sur la prolifération ou la survie des cellules cancéreuses, il reste à identifier leur spectre fonctionnel et à adapter leurs applications thérapeutique potentielles.

Résumé

Les protéines de la famille SMYDs possèdent un **domaine SET** capable de catalyser la **méthylation** des lysines **d'histones** et principalement **de protéines non-histones**.

La protéine SMYD2 a été découverte comme histone lysine méthyltransférase en 2006. La résolution de **sa structure** a révélé une poche catalytique particulièrement volumineuse, pouvant accommoder un **grand nombre de substrats** potentiels différents.

La nature « **promiscuiste** » de SMYD2 a été confirmée depuis, avec la découverte de **dizaines de substrats** différents, tels que **p53, RB, HSP90** ou encore récemment la **tubuline**. Cependant, seule une poignée d'entre eux a été caractérisée, rendant les **conséquences fonctionnelles** de leur méthylation largement **méconnues**.

SMYD2 a été abondamment étudiée dans le tissu **myocardique et musculaire strié**, et semble jouer un rôle crucial dans **l'organisation des sarcomères**, *via* notamment la **méthylation de HSP90**.

SMYD2 est retrouvée **surexprimée et amplifiée** dans de nombreux **cancers**. Dans le cancer du pancréas et les leucémies, SMYD2 est clairement impliquée dans les **processus de tumorigénèse**. Un rôle potentiel a été suggéré dans les **cancers du sein**, notamment à des **stades avancés**.

Cependant, les mécanismes orchestrant les fonctions **oncogéniques** de SMYD2 ont été récemment **remis en question**. La caractérisation de **nouveaux substrats** est donc nécessaire afin de comprendre comment les fonctions de SMYD2 sont détournées par les cellules cancéreuses afin de **promouvoir la progression tumorale**.

L'implication de SMYD2 dans les cancers a poussé à développer des **inhibiteurs**, qui, aujourd'hui arrivent à des capacités d'inhibition de l'ordre du **nanomolaire**, avec notamment une **excellente tolérance *in vivo***. Il est donc urgent de trouver des **applications** à ces inhibiteurs, qui pourraient être des armes fantastiques pour **lutter contre les cancers**.

III. La migration dans le cancer du sein métastatique

Pendant le développement embryonnaire, les cellules migrent, parfois isolées, parfois collectivement, de façon contrôlée, afin de former les tissus et futurs organes. Ce sont ces mêmes procédés qui sont subvertis par les cellules cancéreuses afin d'envahir les tissus environnants et ultimement coloniser des organes distants pour y former des métastases. Ainsi la dérégulation des paramètres migratoire est aujourd'hui une caractéristique fondamentale des cellules tumorales invasives. Au cours de cette thèse, le cancer du sein invasif a été pris comme modèle.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les caractéristiques générales de la tumorigénèse mammaire et faire le point sur ses classifications. Puis nous verrons plus en détail les différents déterminants qui semblent favoriser la bascule vers une maladie métastatique, et quelles stratégies thérapeutiques sont aujourd'hui déployées afin de contrer les métastases. Enfin, nous développerons un aspect particulier de la cascade métastatique, l'acquisition d'un phénotype migratoire et invasif. En particulier, nous allons aborder les trois grandes catégories de migration cellulaire observées dans les tissus que sont la migration mésenchymateuse, amiboïde et lobopodiale. Bien que très différents, ces modes de migrations impliquent tous une génération des forces et de leur transmission basée sur la dynamique du cytosquelette d'actomyosine. Cette dynamique est contrôlée par un ensemble de facteurs moléculaires, souvent dérégulés dans les cancers invasifs.

1. Pathologie et traitement du cancer du sein métastatique

Selon les chiffres de l'INCA (« Institut National de la recherche contre le Cancer), le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et le plus meurtrier chez la femme. En 2018, près de 1 million de femmes étaient atteintes de cancer du sein, et plus de 12000 en sont décédés sur cette seule année. Le cancer du sein est généralement détecté assez tôt, avec 60% des cas diagnostiqués à des stades précoces, facilitant ainsi sa prise en charge et expliquant le bon taux de survie à 5 ans (pour un cancer), se stabilisant autour de 87%. L'importance du dépistage et de la prise en charge est d'ailleurs illustrée par un constat dramatique : les pays à revenu faible ont des taux de survie aussi bas que 40 % pour l'Afrique du Sud, par exemple (CP, E, and BW 2020). Globalement, le cancer du sein est de mauvais pronostic lorsqu'il atteint des stades plus avancés, plus invasifs. Ainsi, 90 % de la mortalité liée au cancer du sein est due à la dissémination métastatique, stade final de la pathologie cancéreuse (Lambert, Pattabiraman, and Weinberg 2017a).

1.1. Classer les cancers du sein

1.1.1. Caractérisation histopathologique

Le cancer du sein se développe à partir des cellules épithéliales tapissant la glande mammaire, on parle alors d'adénocarcinome mammaire. Dans de rares cas (<5%), la transformation cancéreuse peut concerner des cellules des tissus conjonctifs, adipeux ou musculaire environnants, il s'agit alors de sarcome mammaire. Initialement, la primo-tumeur est confinée, on parle alors de cancer *in situ*. Puis la tumeur peut éventuellement progresser, envahir localement le parenchyme mammaire et ainsi devenir invasive. Cette histoire linéaire ne saurait cependant résumer la complexité de la progression du cancer du sein, ou plutôt des cancers du sein. L'adénocarcinome mammaire est en effet une pathologie extrêmement hétérogène, et ce à différents niveaux (Lüönd, Tiede, and Christofori 2021). On observe d'une part l'hétérogénéité inter-tumorale, qui nous renvoie au cancer de chaque patient, avec ses caractéristiques histologiques et moléculaires propres. Sa caractérisation a mené d'ailleurs à la plupart des classifications que nous allons évoquer, et représente un outil essentiel aux praticiens dans leur décision thérapeutique. Et d'autre part,

l'hétérogénéité intra-tumorale, relative aux sous-population tumorales présentes dans la tumeur primaire, ou dans les métastases, et fruit de la dramatique adaptabilité et plasticité des cellules cancéreuses.

Histologiquement, le type de cancer du sein le plus commun est le carcinome canalaire invasif, ou infiltrant, se déclarant à proximité des unités lobulo-canales terminales du sein (**Figure 18**). Plus rarement on retrouve également des carcinomes lobulaires invasifs et des cancers inflammatoires du sein. La progression de ce cancer canalaire se distingue par 3 étapes, précoces, pré-invasives : l'atypie épithéliale plate, l'atypie canalaire hyperplasique, puis le carcinome canalaire *in situ*. Il s'agit alors du stade 0. Lorsque ce carcinome franchi la membrane basale myoépithéliale tapissant les canaux, on parle alors de carcinome canalaire invasif, qui va graduellement progresser des stades 1 à 4 (SgROI 2010). Tandis que les stades vont indiquer le degré de dissémination, chaque lésion invasive se voit également attribuer un grade en fonction de son degré de différenciation cellulaire, allant de 1 (bien différencié) à 3 (peu différencié, de moins bon pronostique).

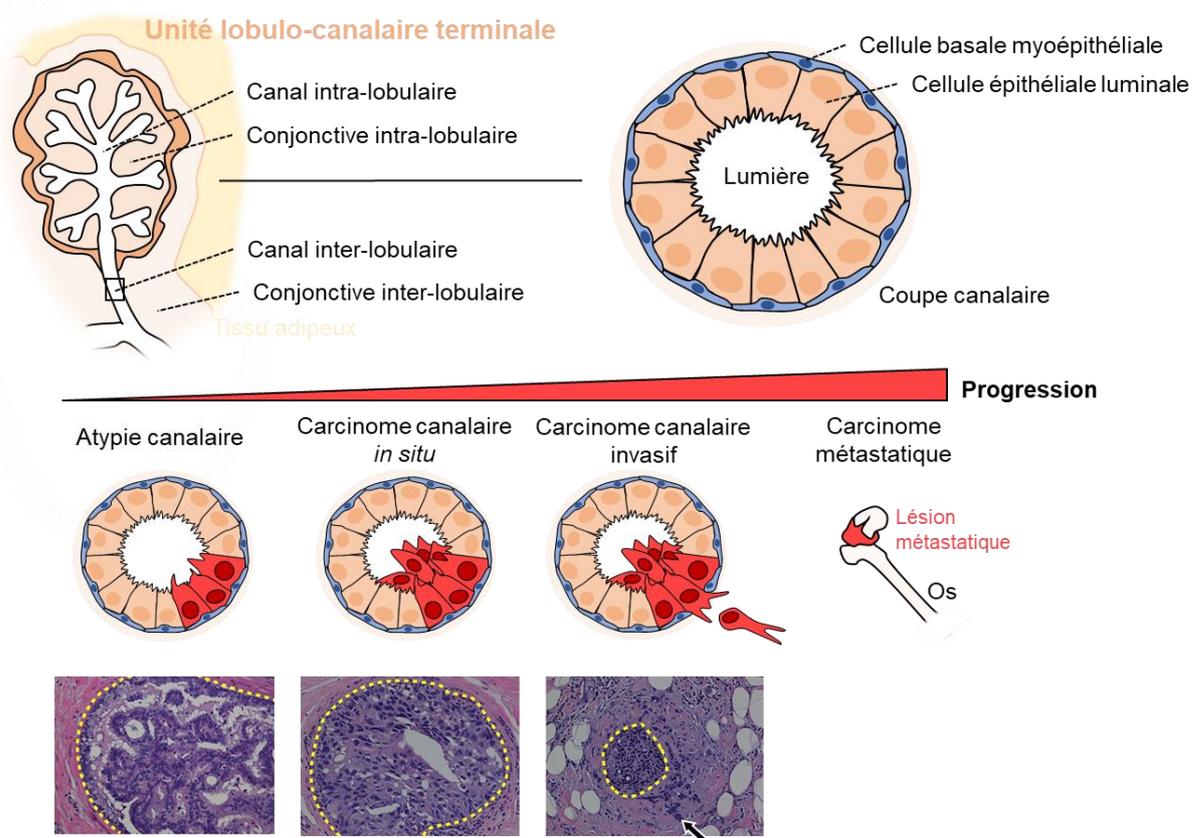


Figure 18. Progression du cancer du sein. Dans ce schéma est représenté l'unité lobulo-canaire terminale situé dans la glande mammaire, avec une coupe canalaire. Dans ce canal on distingue les cellules épithéliales des cellules basales. La transformation concerne le plus souvent les cellules épithéliales, avec différents grades de progression, jusqu'au carcinome canalaire invasif, pouvant éventuellement métastaser à des sites distants.

1.1.2. Classifications moléculaires des cancers du sein

Afin de compléter l'analyse histologique, un grand nombre de classifications moléculaires a été mis en évidence. Traditionnellement, chaque type de cancer du sein a été sous-divisé en fonction de son niveau d'expression de 3 récepteurs : ER (« Estrogen Receptor »), PR (« Progesterone Receptor ») et HER2 (« Human Epidermal growth factor Receptor 2 »). Les études génétique pionnières du Dr. Perou ont ainsi permis d'identifier 4 sous-types : luminal A/B, HER2-enrichi et « basal-like ». Depuis, un cinquième sous-type, « claudin-low », a été identifié (Perou et al. 2000; Prat and Perou 2011). Ainsi le luminal A est positif pour ER et PR, négatif pour HER2, et généralement de grade 1, tandis que le luminal B, également positifs pour ER/PR, va exprimer variablement HER2 et sont fréquemment de grade 2 à 3. Le HER2-enrichi (HER2+) va exprimer fortement HER2, est négatif pour ER et PR et est de grade 2 à 3. Enfin, les « basal-like » et les « claudin-low » se distinguent par des profils transcriptionnels différents. Ils sont tous deux des sous-types négatifs pour ER, PR, et HER2, et typiquement de grade 3. Ils forment la grande majorité des cancers dits « triple-négatifs », connus pour leur mauvais pronostic (Prat and Perou 2011) (**Figure 19**).

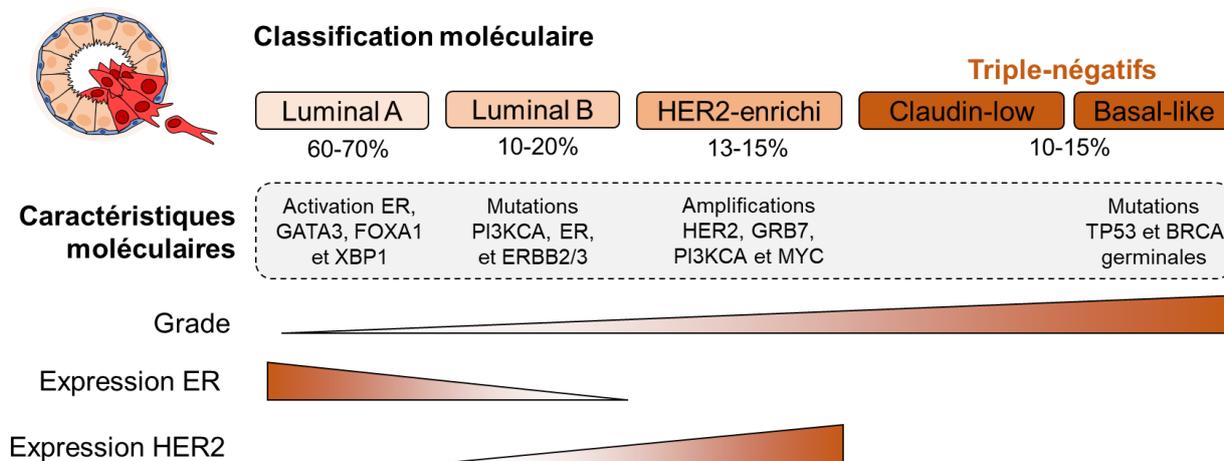


Figure 19. Classification moléculaire des sous-types de cancer du sein. Dans ce schéma on retrouve les différents sous types du cancer du sein, luminal A/B, HER-enrichi, claudin low et basal-like ; ainsi que leur proportion relative (%). Ces différentes sous-types possèdent es caractéristiques moléculaires typiques, à commencer par l'expression des récepteurs ER et HER2. Les travaux de TCGA ont également permis de cartographier leurs profils génétiques. Par exemple il est reconnu que les tumeurs basal-like possèdent très fréquemment des mutations du suppresseur de tumeur p53.

Avec la démarche du TCGA (« The Cancer Genome Atlas »), les analyses génétiques, épigénétiques, transcriptionnelles et protéomiques sont venues enrichir la caractérisation moléculaire des cancers (« The Cancer Genome Atlas Program, 2018). Dans le cas du

cancer du sein, la base de données BRCA (« BReast Cancer »), regroupant plus de 1000 échantillons de cancer du sein invasifs, a permis de mettre en évidence un certain nombre de gènes fréquemment mutés ou altérés, dit « drivers », dans les différents sous-types (Koboldt et al. 2012). Quelques-uns de ces gènes vous sont présentés dans la **figure X**. Récemment, une étude est venue compléter la caractérisation moléculaires des cancers du sein, en constituant une cohorte de centaines de patientes atteintes de cancer métastatique de différents sous-types. Les auteurs observent que les tumeurs métastatiques sont globalement enrichies dans ces différentes mutations « drivers », par rapport aux tumeurs primaires. En revanche, ils ne trouvent pas d'évènement génétique fondateur liés spécifiquement à la dissémination métastatique (François Bertucci et al. 2019).

1.1.3. La méthylation des lysines dans le cancer du sein

Un nombre croissant d'étude lie la signalisation par méthylation des lysines et la progression du cancer du sein. En effet, de nombreuses KMTs telles que SETDB1, SMYD2, SMYD3, ASHL1, SUV40H1 sont retrouvées amplifiées et surexprimées dans les tumeurs mammaires, et ce particulièrement dans celles de sous-type « *basal-like* » (L. Liu et al. 2015a). De façon globale, les mutations des KMTs représentent plus de 5% des évènements génétiques « drivers » de la progression des cancers du sein (Nik-Zainal et al. 2016).

Certaines KMTs se sont particulièrement illustrées dans le cancer du sein. Par exemple, la KMT EZH2, est un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein, et est très fréquemment surexprimée dans les tumeurs invasives et métastatiques (Kleer et al. 2003; Bachmann et al. 2006). La délétion d'EZH2 mène un développement anormal de la glande mammaire, et sa surexpression, notamment suite à l'exposition à la progestérone est directement impliquée dans l'initiation tumorale mammaire (Michalak et al. 2013; Pal et al. 2013). Cependant, il est intéressant de constater que l'expression d'EZH2 et l'abondance de la tri-méthylation H3K27me3 sont inversement corrélées, particulièrement dans les cancers basal-like (Anwar et al. 2018). Différentes hypothèses ont été avancées, mais un aspect particulièrement intéressant pourrait être qu'EZH2 joue son rôle oncogénique dans le cancer du sein via la méthylation de substrats non-histones, ou différentes fonctions non-canoniques.

Plus généralement, la méthylation des lysines dans les cancers du sein représente un aspect de régulation particulièrement intéressant dans la transition entre les stades primaires et métastatiques.

1.2. La dissémination métastatique mammaire

1.2.1. La cascade métastasique : de la tumeur primaire à la métastase

Derrière ce titre éloquent se cache en réalité le problème probablement le plus prégnant de la recherche dans le cancer du sein, et probablement des cancers en général. D'où viennent les métastases, ou autrement dit, qu'est ce qui fait d'une cellule tumorale une cellule métastatique ? Si la partie précédente nous a permis de développer le concept d'hétérogénéité inter-tumorale, avec ses typologies et ses classifications moléculaires, la question ici vient toucher l'autre partie du spectre, plus insaisissable, l'hétérogénéité intra-tumorale. Sous-entendu, si toutes les cellules tumorales ne sont pas capables de métastaser, la masse tumorale est nécessairement hétérogène, avec des clones pouvant métastaser, et d'autres qui en sont incapables.

Peter Nowell a initialement postulé que la force guidant la progression tumorale était l'instabilité génétique (Nowell 1976). Ainsi, chaque sous-population est soumise à des pressions de sélection particulières, spatio-temporellement différentes au sein de la tumeur, menant à des clones tumoraux distincts, selon une dynamique darwinienne. Ces pressions sont notamment apportées par le microenvironnement tumoral, dans toute sa complexité cellulaire, biochimique et mécanique. Aujourd'hui, il est désormais clair que ces pressions apportent bien plus qu'une instabilité génétique mais également tout un éventail de fluctuations épigénétiques et métaboliques, à l'origine de cette hétérogénéité tumorale (Lambert, Pattabiraman, and Weinberg 2017a).

Différents modèles viennent actuellement décrire comment se forment les métastases. Afin de comprendre le « comment », il peut être utile de résoudre le « quand ». Les deux modèles temporels impliquent soit une acquisition linéaire d'altérations, et donc prédit l'apparition de métastases tardives (c'est le modèle linéaire), soit une dissémination précoce et une évolution indépendante des cellules métastatiques et de la tumeur primaire (c'est le modèle parallèle) (C. A. Klein 2009). Si le modèle linéaire a été largement observé (Venet et al. 2020), de plus en plus de preuves viennent abonder dans le sens du second modèle, de dissémination précoce. Ainsi, le laboratoire de Christoph Klein a démontré que les cancers du sein hormono-dépendants et HER2-enrichis présentaient des signes évidents de dissémination précoce (Hüsemann et al. 2008; Harper et al. 2016; Hosseini et al. 2016). Bien que ce « quand » soit encore largement incompris, il soit désormais clair que les métastases peuvent survenir à des stades précoces de la tumorigénèse.

La dissémination des cellules cancéreuses de la tumeur primaire et leur subséquente colonisation est le fruit d'un procédé multi-étape appelé cascade métastatique. Cette cascade vient décrire le « comment ». De façon très schématique, cette cascade implique une invasion locale du parenchyme, une intravasation de ces cellules dans la circulation sanguine ou lymphatique, leur survie dans la circulation, leur arrêt, l'extravasation dans le parenchyme hôte, la formation de colonies microscopique et enfin la prolifération de ces colonies en lésion métastatique, la colonisation (Fares et al. 2020). A l'apparence bien huilé, ce processus est pour autant hautement inefficace, avec moins de 0.01% des cellules tumorales entrant dans la circulation qui deviennent des lésions métastatiques cliniquement détectables (Chambers, Groom, and MacDonald 2002). Une représentation graphique de cette cascade vous est présentée en (**Figure 20**).

Si les métastases sont parfois déjà détectées au moment du diagnostic, elles se manifestent la plupart du temps après le traitement, parfois des années après, sous forme de métastases réfractaires (récurrentes) (Seltzer, Corrigan, and O'Reilly 2020). Derrière ce problème majeur, se cache une caractéristique de certaines cellules tumorales disséminées, la dormance. Ainsi, ces cellules, à leur arrivée dans l'organe cible, vont entrer dans un état de quiescence, plus ou moins long (de quelques années à plusieurs décennies), jusqu'à se « réveiller », et former une macro- métastase détectable (Riggio, Varley, and Welm 2021).

1.2.2. L'organotropisme métastatique mammaire

En 1889, Stephen Paget émet cette célèbre hypothèse de graine et de terreau (« seed and soil ») pour décrire la spécificité des métastases mammaires pour certains organes (Paget 1889). Au cours de la cascade métastatique, la distribution des métastases à certains organes n'est pas aléatoire, et obéit à un processus de colonisation préférentiel, appelé l'organotropisme métastatique. Un grand nombre de facteurs vont ainsi orienter la formation de métastase dans un organe particulier, tel que le sous-type tumoral, les caractéristiques moléculaires (« seed ») ou encore le micro-environnement, on parlera alors de niche pré-métastatique (« soil »). A cela s'ajoute différentes barrières physiologiques, que les cellules cancéreuses devront surmonter afin de coloniser un organe cible, comme la barrière hémato-encéphalique, « filtrant » l'accès au cerveau (W. Chen et al. 2018).

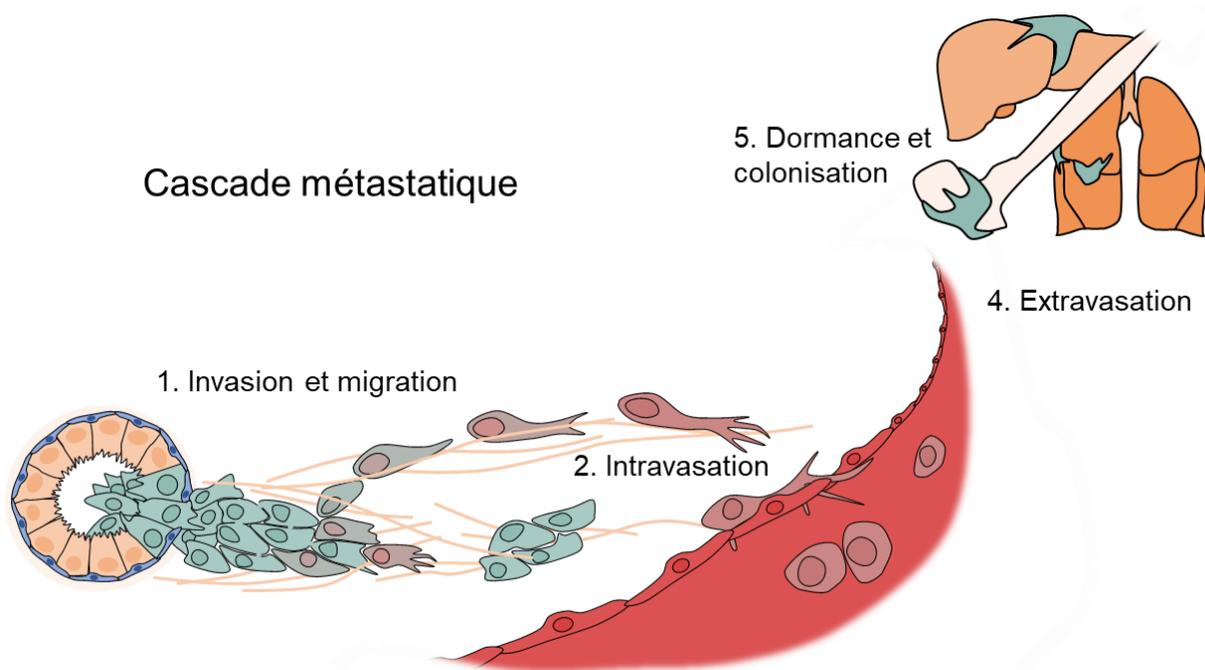


Figure 20. La cascade métastatique. La première étape, d'invasion et de migration, comprend la dégradation de la lame basale de l'épithélium et remodelage de la matrice extracellulaire. Les cellules cancéreuses vont alors disséminer de façon isolées ou en groupe, par migration collective. Cette plasticité de la migration sera abordée dans la partie suivante. La seconde étape consiste en l'intravasation, c'est-à-dire l'entrée des cellules cancéreuses dans les vaisseaux sanguins, ou parfois lymphatiques. La troisième étape concerne la survie des cellules cancéreuses, alors appelé CTC (Cellules Tumorales Circulantes), dans la circulation sanguine. Les cellules doivent alors résister à l'anoïkose, une forme d'apoptose par perte des points d'adhérences, échapper à la pression immunitaire, ainsi qu'aux forces hémodynamiques. La quatrième étape, l'arrêt et l'extravasation au niveau du site distant, est menée par organotropisme et/ou différents paramètres passifs du système vasculaire, piégeant les cellules cancéreuses. Enfin, la dernière phase, de semence et de colonisation, répond également aux différents paramètres de l'organotropisme, et peut faire intervenir un système de dormance, où certaines cellules tumorales stoppent leur prolifération pendant un temps plus ou moins long, avant de sortir de leur stase et coloniser l'organe distant.

Parmi les organes ciblés par les cellules cancéreuses mammaires, on retrouve essentiellement les os, le cerveau, le foie, les poumons et les ganglions lymphatiques. Les os sont de loin, à plus de 50%, les organes les plus touchés par les métastases mammaires (Weillbaecher, Guise, and McCauley 2011). Vient ensuite le foie, dans environ 20 à 30 % des cas, puis le cerveau et les poumons dans 10 à 20 % des cas (W. Chen et al. 2018). Quant à la dissémination dans les nœuds lymphatiques, elle devrait davantage être considérée comme un marqueur de haute propension à métastaser plutôt que comme un

site métastatique *per se*. Enfin, on notera que la survie des patientes est très différente en fonction de l'organe colonisé. La survie médiane de patientes atteintes de métastases osseuses étant de 36 mois, tandis qu'elle ne dépasse pas les 8 mois avec les métastases du cerveau (Ru Wang et al. 2019).

1.3. Traitement du cancer du sein métastatique

Le cancer du sein métastatique a longtemps été considéré comme une maladie incurable. A ce titre, les traitements proposés aux patients sont donc essentiellement palliatifs et ne rallongent que modestement la durée de vie de la patiente. Récemment, le paradigme semble changer, où le cancer du sein métastatique est passé d'incurable à difficile à guérir (Cardoso et al. 2020). Ainsi, certaines patientes, essentiellement présentant un cancer HER2+ et des métastases non viscérales, pourraient être guéries. En revanche les cancers dits « triples négatifs » progressant au stade métastatique demeurent incurables avec des espérances de vie n'excédant pas un an (X. Wang et al. 2021).

Parmi les traitements locaux, on retrouve la chirurgie et la radiothérapie. La résection chirurgicale n'est possible que dans moins de 10% des cas. Bien que la radiothérapie soit essentiellement efficace sur de petits groupes de cellules, seyant donc particulièrement aux petites lésions métastatiques, elle n'est généralement utilisée que dans une visée palliative, symptomatique, notamment dans le cas des métastases osseuses (Pagani et al. 2010). En revanche, elle est relativement efficace dans la prise en charge des métastases cérébrales (Dawood and Gonzalez-Angulo 2013).

Les traitements systémiques incluent l'hormonothérapie, la chimiothérapie, les thérapies ciblées et les différentes combinaisons possibles. L'hormonothérapie sera proposée en première intention chez les femmes atteintes d'un cancer métastatique ER positif, le plus répandu. Comme nous le décrirons plus tard, il existe différents types d'hormonothérapie, toutes basées sur des stratégies d'inactivation différente de ce récepteur. Il n'est ainsi par rare de voir des patientes bénéficier de différentes hormonothérapie à la suite pour améliorer la durée de vie (Hortobagyi 1998). Différentes études ont montré que la chimiothérapie avait globalement la même efficacité que l'hormonothérapie, cependant elle était également responsable d'effets secondaires bien plus handicapants. Elle est donc en général proposée lorsque les patientes ne répondent plus à l'hormonothérapie, ou bien lorsqu'elles sont négative pour ER (Abotaleb et al. 2018).

Enfin les thérapies ciblées sont probablement celles apportant le plus d'espoir dans le traitement du cancer du sein métastatique. Par exemple, différents agents ciblant HER2 ont été développés, comme les anticorps monoclonaux (trastuzumab ou pertuzumab) ou des inhibiteurs des tyrosine kinases (lapatinib et neratinib), qui ont montré des résultats très encourageants dans le traitement du cancer du sein métastatique, notamment au cours de l'étude Cleopatra (Swain et al. 2015; Y. Liang et al. 2020). L'immunothérapie est également une modalité thérapeutique émergente. Si elle avait montré peu d'efficacité seule, de récentes études semblent indiquer des résultats prometteurs lorsque les anticorps monoclonaux anti-PD-L1 et anti-PD1 – molécules phares de l'immunothérapie, ciblant les lymphocytes infiltrants – sont administrés en combinaison avec différents anti-HER2 ou encore des inhibiteurs de CDK4/6 (Esteva et al. 2019) (**Figure 21**).

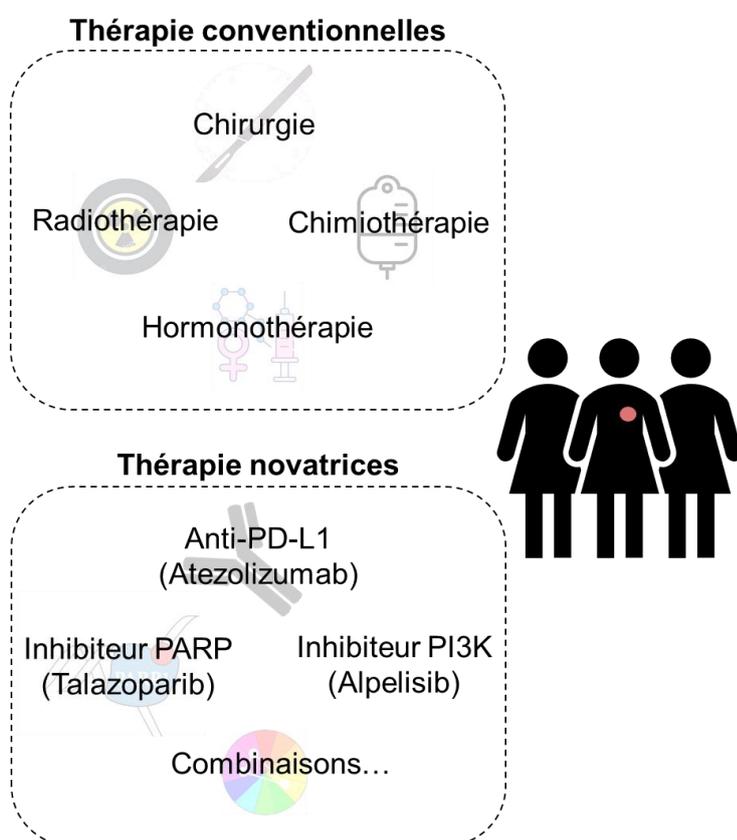


Figure 21. Différentes stratégies thérapeutiques dans la prise en charge du cancer du sein. Hormis les thérapies conventionnelles, il existe certaines thérapies ciblées novatrices qui vont pouvoir être utilisées dans certains cas. Par exemple, l'immunothérapie anti-PD-L1 en combinaison avec des inhibiteurs de CDK4/6 a prouvé une certaine efficacité dans les triples négatifs. Les inhibiteurs de PARP peuvent être utilisés dans les cancers négatifs pour ER et PR ou encore les tumeurs avec des mutations du gène BRCA. A l'inverse on utilisera des inhibiteurs de PI3K pour des cancers positifs pour les récepteurs hormonaux.

2. La plasticité de la migration des cellules cancéreuses

Les cellules peuvent engager un grand nombre de stratégies afin de migrer à travers des environnements aux caractéristiques biochimiques et topologiques parfois extrêmement différentes. Bien que de la morphologie cellulaire aux mécanismes moléculaires mis en jeu, ces « modes » de migration diffèrent grandement, les principes de génération et de transmission des forces intrinsèques au phénomène de motilité demeurent remarquablement conservés (Yamada and Sixt 2019). Ainsi, pour la quasi-totalité des cellules animales c'est la dynamique du cytosquelette d'actomyosine qui gouverne le mouvement.

De façon schématique, on peut retenir trois grands paramètres de ce cytosquelette régissant la motilité : la protrusion, les phénomènes d'adhérence et la contractilité d'actomyosine. En fonction de la façon et de l'ordre par lesquels la cellule va organiser ces différentes étapes, différents modes de migration alternatifs se mettent en place pour répondre tous aux besoins d'adaptation à l'environnement (Pandya, Orgaz, and Sanz-Moreno 2017). Cette plasticité de la migration est notamment observable chez les cellules cancéreuses durant les phénomènes d'invasion et de dissémination, où différents types de migration vont s'entremêler, allant de la migration mésenchymateuse à amiboïde, collective ou individuelle.

2.1. Les modes de migration

2.1.1. La migration mésenchymateuse

Les modes de migration mésenchymateux et amiboïdes sont les deux modes extrêmes de la migration cellulaire. Les cellules mésenchymateuses en migration, à l'instar des fibroblastes, se distinguent par une morphologie allongée et polarisée, comprenant un front de migration et une traîne. Ce mode de migration va mobiliser un nombre important de points d'adhérences avec l'environnement matriciel et se caractérise par une importante contractilité du cytosquelette. Il s'agit donc d'une stratégie motile relativement lente, de l'ordre de 0.1 à 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Friedl and Wolf 2010). Comme il s'agit d'un mode de migration particulièrement étudié au cours de ma thèse, il sera davantage détaillé que le mouvement amiboïde.

A l'avant de ce front de migration, la cellule va former des protrusions telles que les lamellipodes ou les filopodes. Les lamellipodes, comme nous aurons l'occasion de le voir plus tard, sont de larges protrusions aplaties, de 100 à 200 nm d'épaisseur, qui vont largement mener la migration (Krause and Gautreau 2014a). De leur côté, les filopodes sont de fines protrusions en formes de doigts, ayant davantage un rôle d'exploration et de détection des paramètres biochimiques et mécaniques de l'environnement, bien qu'ils puissent également générer un faible mouvement en l'absence de lamellipode (Krause and Gautreau 2014a; Bischoff et al. 2021). Dans les deux cas, la force générée par ces protrusions provient de la polymérisation d'actine (Thomas D. Pollard 2016).

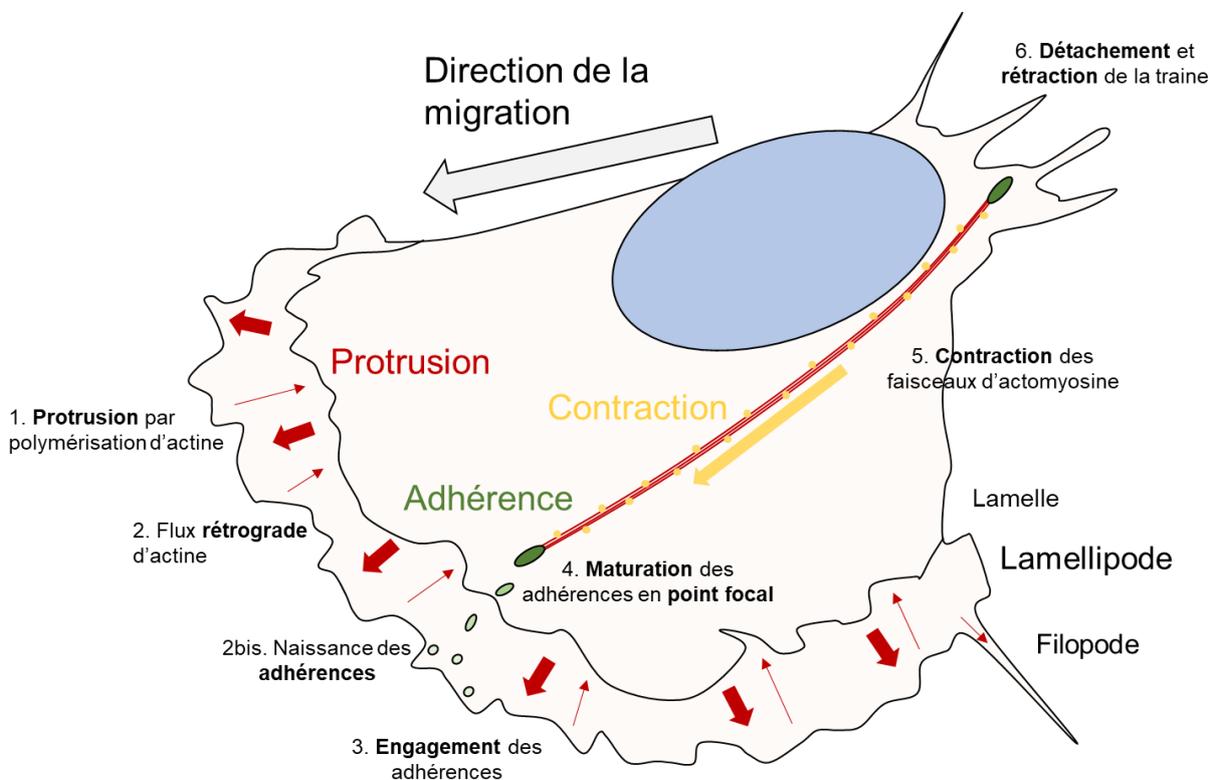


Figure 22. Cellule mésoenchymateuse en migration. Dans ce schéma est représenté les différentes étapes de la reptation mésoenchymateuse bidimensionnelle. Sur le front de la cellule le lamellipode est le lieu des mouvements de protrusions par polymérisation d'actine (1). Cette activité protrusive va générer un flux rétrograde d'actine (2), qui va se transformer en un mouvement protrusif net dès lors que les filaments sont engagés par les complexes d'adhérence (3). Certaines adhérences vont quant à elles mûrir en point d'adhérence focal (4), nécessaires pour connecter l'avant et l'arrière de la cellule. Ces connexions, constituées de faisceaux d'actomyosine vont se contracter (5) et en parallèle tirer la traîne qui se détache (6).

La dynamique de ce mouvement de reptation a été remarquablement bien étudiée au cours de ces dernières décennies. Lorsque le front de migration de la cellule en mouvement est projeté vers l'avant, il rencontre une force contraire qui vient le repousser vers l'arrière, générant un flux rétrograde des filaments d'actine, dans le sens inverse de la migration (Y. L. Wang 1985). Afin de transformer cette contrainte en un mouvement vers l'avant, les cellules font intervenir un système d'embrayage moléculaire (« the molecular clutch ») (Mitchison and Kirschner 1988). Cette métaphore vient en réalité illustrer le rôle des adhérences dans la transmission de ce flux rétrograde en mouvement vers l'avant. Les adhérences sont constituées par une famille de protéine appelée les intégrines. Ces intégrines connectent physiquement les éléments de l'environnement extracellulaire au cytosquelette d'actine, via différentes protéines adaptatrices et d'armature (Humphries et al. 2019). Les adhérences naissent dans le lamellipode, au front de migration, où les filaments d'actine vont pouvoir s'y engager, se lier : c'est l'embrayage. Ainsi, la force repoussant le cytosquelette vers l'arrière va pouvoir être contenue par ces adhérences et transmise en force de traction sur le substrat, permettant le mouvement vers l'avant (Case and Waterman 2015) (**Figure 22**).

Au fur et à mesure que le front de migration va avancer, les adhérences naissantes vont soit se désassembler, soit mûrir jusqu'à devenir des points d'adhérences focaux à la jonction arrière du lamellipode avec une région appelée la lamelle (Choi et al. 2008; Parsons, Horwitz, and Schwartz 2010). Ainsi, l'existence des adhérences s'inscrit donc dans un continuum en perpétuel renouvellement au cours de la migration, appelé le « turnover » des adhérences. Les points focaux, stade final de maturation situés dans la lamelle, sont fortement attachés à des faisceaux de filament d'actine entre-chassés de myosine II, pour former ce que l'on appelle les fibres de stress. Ces faisceaux sont responsables de la traction de la traîne de la cellule, qui engage simultanément une dissociation des adhérences à l'arrière (Case and Waterman 2015). (**Figure 23**)

Le mouvement de reptation inhérent à la migration mésenchymateuse est donc gouverné par une polymérisation d'actine au niveau du lamellipode, couplé à une traction de la traîne par contraction des faisceaux d'actomyosine. Les forces générées sont transmises à différents éléments de la matrice par un système d'adhérence, permettant à la cellule de migrer à travers cet environnement. Une dernière caractéristique de ce mode de migration est son utilité topologique. La migration mésenchymateuse est couplée à une activité protéolytique intense, permettant de dégrader certains éléments de la matrice extracellulaire. Cette dégradation est essentielle afin de permettre à la cellule de traverser les tissus conjonctifs, et autres barrières fibreuses, dans le cadre d'une migration invasive (Friedl and Wolf 2009).

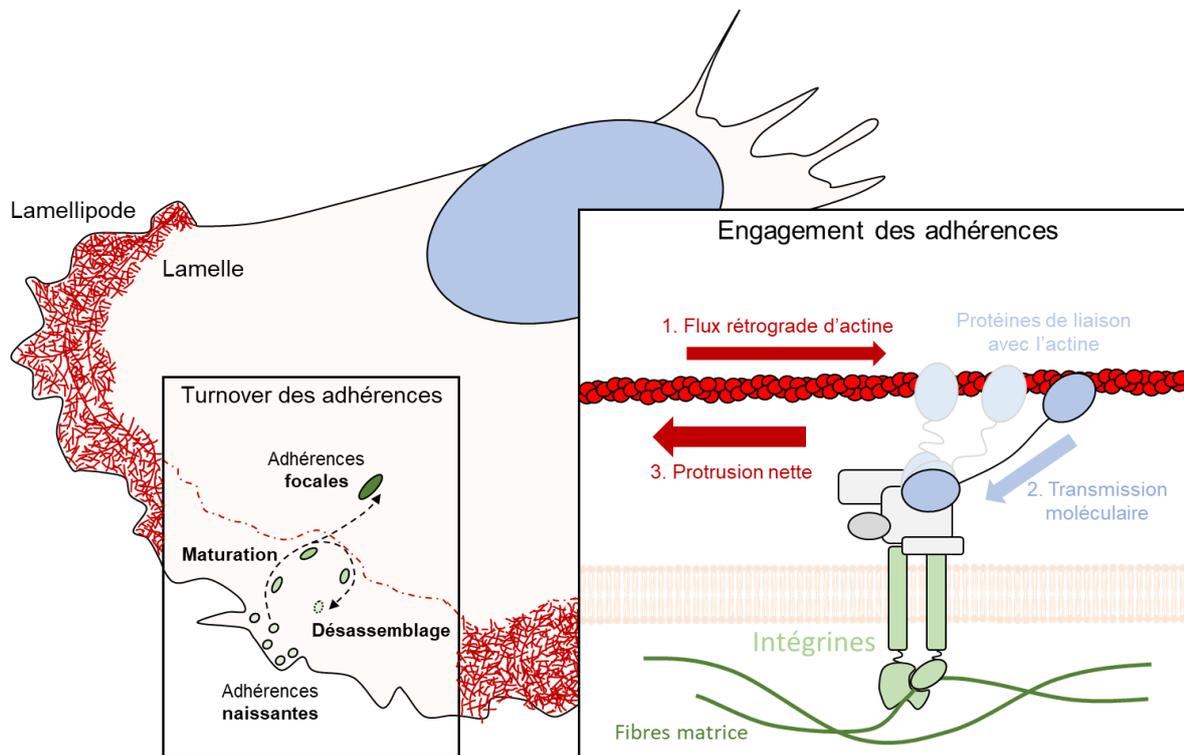


Figure 23. Mécanisme du renouvellement et d'engagement des adhérences. Dans ce schéma est représenté le mécanisme de renouvellement des adhérences ; ainsi que l'engagement des adhérences avec le cytosquelette d'actine, relatif au mouvement de « molecular clutch » énoncé précédemment.

2.1.2. La migration amiboïde

Les cellules en migration amiboïde, comme les leucocytes ou les cellules primordiales germinales, sont généralement caractérisées par une forme arrondie. Ce mode de migration se distingue notamment par l'absence de point d'adhérences mature et de fibres de stress, ce qui va engager la cellule dans une motilité généralement extrêmement rapide, de plus de 10 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Friedl and Wolf 2010). Il existe 2 types principaux de mouvement amiboïdes, par bleb ou par filopodes (Yoshida and Soldati 2006).

Le type le plus fréquemment retrouvé est basé sur la génération d'un type de protrusion appelé le bleb. Il s'agit de petites hernies de la membrane plasmique formées par pression hydrostatique, à la suite du détachement de la membrane du cortex d'actomyosine, ou d'une rupture ponctuelle de ce dernier. Mécanistiquement, à la suite de la désolidarisation de la membrane et du cortex, le cytoplasme se déverse dans le bleb, qui, par pression hydrostatique s'expand, c'est la phase de protrusion. Le bleb va alors générer des points d'adhérences relativement faibles, mais suffisant pour assurer un ancrage transitoire. Puis le cortex d'actine se reforme au niveau de la membrane du bleb, initiant alors la rétraction de la structure, et donc la traction du reste de la cellule (Paluch and Raz 2013).

2.1.3. La migration collective

Contrairement à la migration individuelle, les cellules en migration collective sont en contact, formant alors de large regroupement cellulaire cohésifs ou bien des flux de cellules plus lâches. Au sein de ces formations on retrouve fréquemment des cellules aux phénotypes variés, épithélial ou mésenchymateux, en réalité souvent entre les deux. Ces cellules utilisent également toute la panoplie de protrusions cellulaire, des lamellipodes, des filopodes ou encore des blebs. Par exemple, des filopodes, des lamellipodes et des blebs ont été observés séquentiellement sur le front de cellules de poisson-zèbre migrant durant la gastrulation (Diz-Muñoz et al. 2010).

Dans tous les cas, un groupe de cellules migrant collectivement peut être schématiquement représenté en 2 catégories : les meneuses (« leaders ») et les suiveuses (« followers »). Les cellules situées au front vont dicter à la fois la direction et la vitesse de la migration du groupe de cellule. Les cellules à l'arrière forment des jonctions inter-cellulaires et participent dans la modulation de la direction et de la vitesse, à l'instar de la traine d'une cellule en mouvement mésenchymateux. Ainsi, cet ensemble de cellules développe un mouvement coordonné, souvent bien plus efficace que celui des cellules isolées (Mayor and Etienne-Manneville 2016) (**Figure 24**).

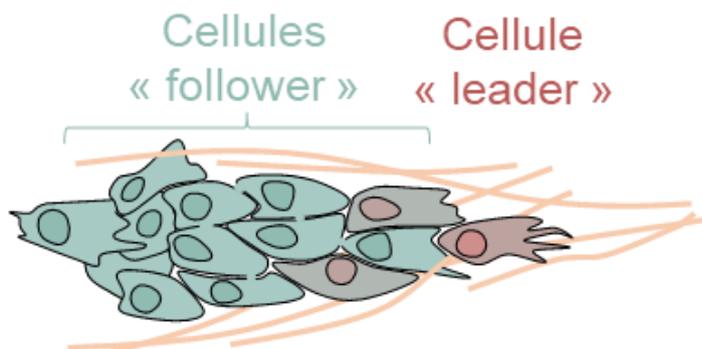


Figure 24. Schéma de cellules en migration collective. La cellule « leader », avec des caractéristiques plus mésenchymateuses, va dégrader la matrice extracellulaire à l'avant. Les cellules « followers », plus cohésives grâce à un fort maillage de cadhérines et autres protéines de jonctions cellulaire, vont suivre la migration, mais également promouvoir la survie des cellules leaders.

2.1.4. La migration sous contrôle des GTPases

Les phénomènes de migration sont intrinsèquement régulés par un grand nombre de protéines. Ces protéines peuvent couvrir un grand nombre de fonctions, allant des propriétés de détection des signaux extracellulaires, aux mécanismes de signalisation intracellulaires. Quel que soit le mode de migration, une classe de protéines joue un rôle

pivot, absolument fondamental dans le contrôle spatio-temporel du remodelage du cytosquelette d'actine, des adhérences et de la contractilité au cours de la migration, ce sont les Rho-GTPases.

Les vingt Rho-GTPases présentes chez l'Homme fonctionnent toutes selon un cycle rythmé par leur liaison au GTP ou au GDP. Ainsi, une GTPase liée au GTP sera active et pourra stimuler différentes protéines en aval, appelées les effecteurs, tandis qu'une GTPase liée au GDP adoptera une conformation inactive. Le rythme de ce cycle est imposé par 2 classes de protéine, les GEFs (« Guanine nucleotide Exchange Factors »), activatrices, capable d'échanger le GDP en GTP, et les GAPs (GTPases-Activating Proteins «), inhibitrices, provoquant l'hydrolyse du GTP en GDP sur les GTPases. Les 3 principales GTPases impliquées dans les phénomènes de migration sont les protéines Rho, Rac et Cdc42 (Ridley 2015) (**Figure 25**).

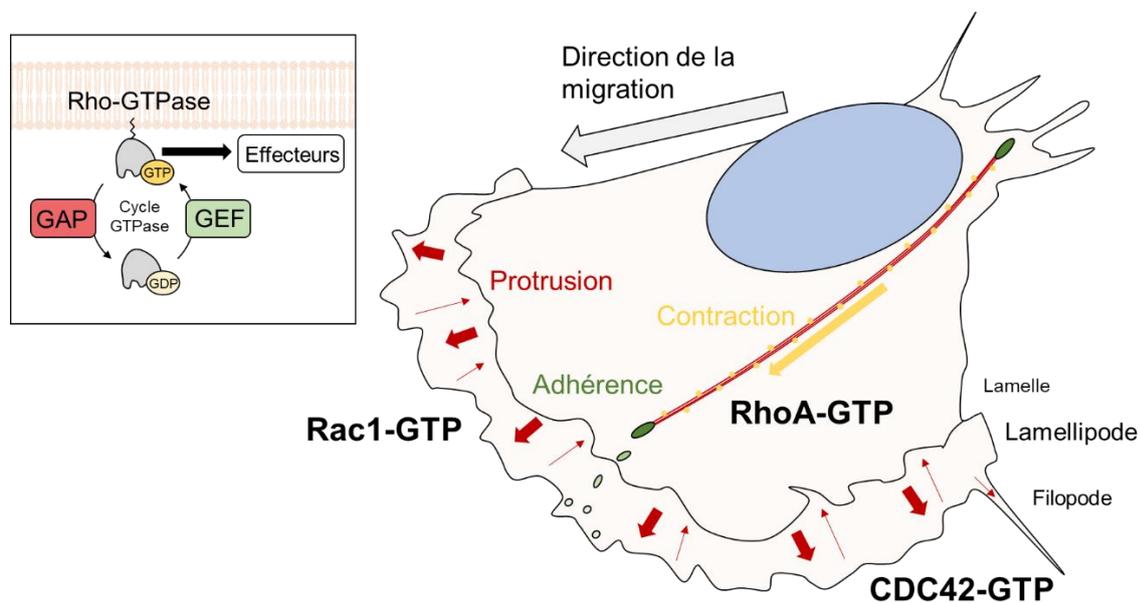


Figure 25. Cycle d'activation des GTPases au cours de la migration mésenchymateuse. A gauche, est représenté le cycle d'activation des GTPases, avec la Rho GTPase (gris) lié au GDP, puis au GTP. Cette activation est souvent associée à une localisation membranaire de la GTPase. Une fois activé, la GTPase va pouvoir s'associer avec des effecteurs pour médier différents effets biologiques. Il est reconnu que Rac va potentialiser l'actine branchée dans le lamellipode, Cdc42 va promouvoir les filopodes et la polarisation de l'activité de Rac, tandis que RhoA va activer la contraction d'actomyosine.

Au cours de la migration mésenchymateuse, le lamellipode est notamment initié par la GTPase Rac, qui comme nous le verrons plus tard, peut recruter le complexe WAVE, chargé d'activer à son tour le complexe Arp2/3, médiateur de la polymérisation d'actine branchée, principale composante architecturale du lamellipode. De son côté CDC42 est principalement actif dans la génération des filopodes, fréquemment retrouvés au front des

lamellipodes. Cependant, CDC42 a également été impliqué dans le maintien d'un Rac actif au niveau du front des lamellipodes, et joue donc un rôle direct sur cette structure. Enfin certaines isoformes de Rho, telles que RhoC, vont davantage agir au niveau de la traine de la cellule, afin de stimuler la contractilité d'actomyosine (Ridley 2015).

Avant de continuer, il me semblait nécessaire de préciser l'utilité de cette partie, puisqu'au-delà de la simple introduction mécanistique, il permet également de situer le rôle des comparses qui seront présentés dans les chapitres suivant, BCAR3 et les FMNLs. D'une part, BCAR3 a été caractérisé comme une protéine GEF-like, bien que ses fonctions soient indirectes (K. N. Felekis et al. 2005). D'autre part, les formines FMNLs ont été largement décrites comme des effecteurs de ces Rho-GTPases, en particulier de CDC42 (Kühn and Geyer 2014b). Ainsi, un lien étroit va rapprocher ces deux protéines : le cycle d'activation des Rho-GTPases.

2.1.5. La migration dans un environnement tridimensionnel

Dans toutes ces différentes configurations, il est néanmoins un paramètre fondamental qu'il faut garder à l'esprit : à l'exception de rares cas, telle que la migration de leucocytes le long des parois vasculaires (Auffray et al. 2007), la migration des cellules au sein des tissus se fait dans un environnement tri-dimensionnel. Ainsi la cellule doit faire face à certain nombre de contraintes imposées par la matrice extracellulaire (ECM) et les autres cellules. De façon plus spécifique à notre thématique, dans le cas de la migration au cours de la dissémination métastatique, il s'agit en effet d'une migration à travers des environnements de topologie tridimensionnelle, de natures parfois extrêmement variés (e.g, tissus conjonctifs mammaires vs tissu conjonctif osseux). Au cours de ma thèse j'ai eu l'occasion de m'y intéresser et de venir observer cette migration tridimensionnelle. Notamment par microscopie optique adaptative, permettant de corriger les aberrations optiques liées justement à cette topologie.

La migration tridimensionnelle est tout d'abord modulé par les paramètres de la matrice, l'ECM, qui va revêtir une topologie particulière, des concentrations variables en composants fibrillaires ou en petites molécules chimiotactiques (haptotaxis), des duretés (durotaxis) et des élasticités différentes, ou encore une porosité différentielle. La cellule en migration, acteur actif dans son processus de migration, peut également venir remodeler cette matrice avec tout un éventail de métalloprotéases, qui vont considérablement modifier les forces appliquées sur la cellule et donc sa façon de se déplacer (Yamada and Sixt 2019).

Ces « façons » de se déplacer peuvent être regroupées en 3 grands modes, le mode mésenchymateux, le mode amiboïde et le mode lobopodial. La migration mésenchymateuse, lente mais capable de se frayer un chemin dans la matrice par dégradation de la matrice. La migration amiboïde, rapide, incapable de dégradation, mais les cellules sont capables de subir d'importantes déformations, ce qui leur permet de passer par les espaces et interstices de la matrice extracellulaire. Ainsi, la topologie de la matrice va grandement influencer sur le mode de migration, ce qui nous amène à la partie suivante, qui va s'intéresser à cette migration tridimensionnelle, dans le cadre de la dissémination métastatique (**Figure 26**).

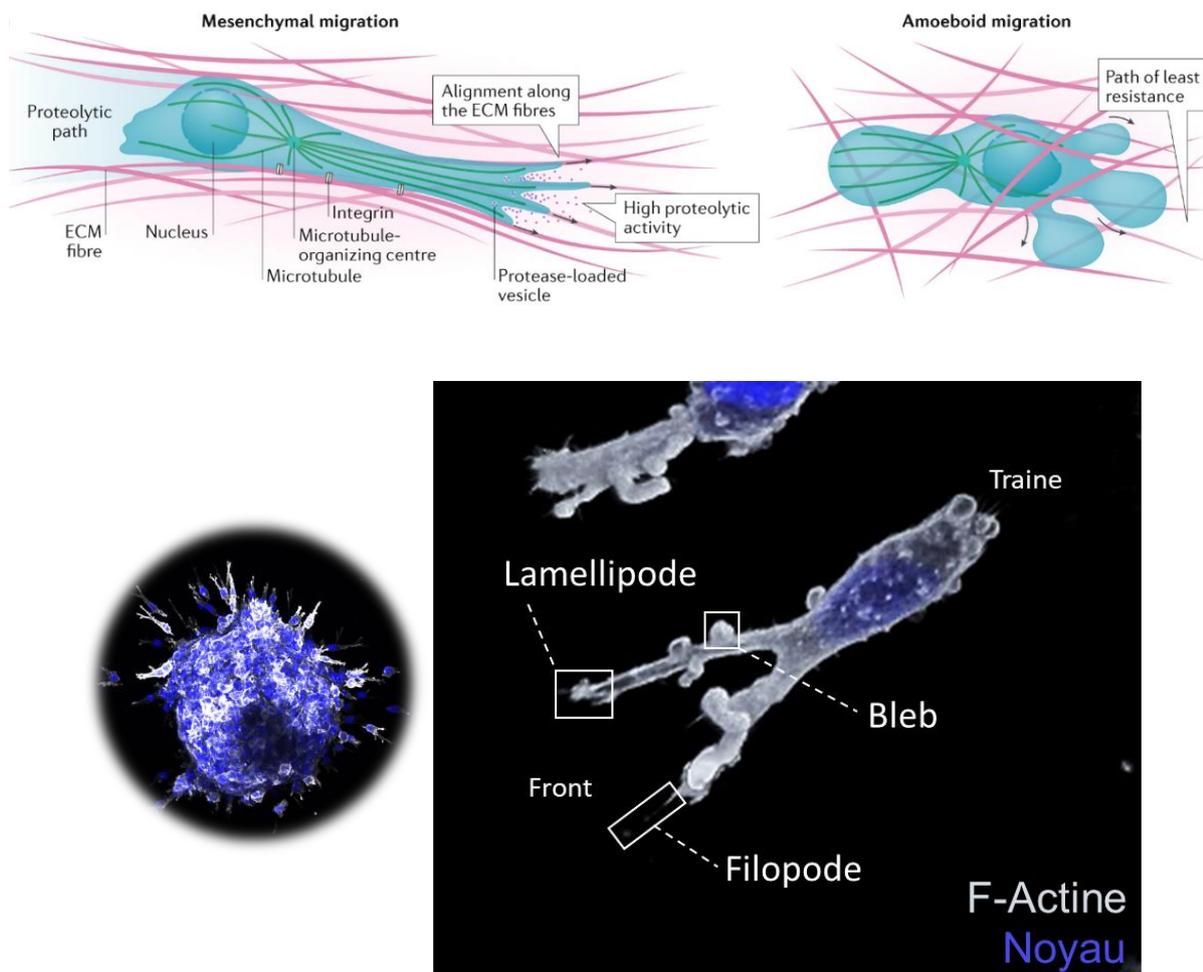


Figure 26. Représentation de cellules en migration tri-dimensionnelle. Au-dessus, l'image a été adaptée de (Sixt et al., 2019). Il s'agit de représentations de cellules en migration mésenchymateuse ou amiboïde dans une matrice tridimensionnelle. En dessous, il s'agit d'image prise au cours de mon travail. A gauche le sphéroïde de cellules tumorales mammaires (noyau en bleu et actine en blanc). A droite, un cellule s'échappant radialement du sphéroïde, prise par imagerie confocale et optique adaptative. ON observe différentes sortes de protrusions, tels que le lamellipode tridimensionnel (pseudopode allongé), des filopodes, et se qui s'apparente à des blebbs.

2.2. Plasticité de la migration au cours de la dissémination métastatique

2.2.1. La plasticité de la migration

Bien qu'elles puissent acquérir des mutations supplémentaires sur le site métastatique, durant la période de dormance notamment, les cellules disséminantes ont les mêmes déterminants génétiques que les cellules cancéreuses retrouvées dans la primo-tumeur (Yates et al. 2017). Ainsi, près de 90% des métastases possèdent les mêmes mutations « *drivers* » que les tumeurs primaires (Turajlic and Swanton 2016). L'argument purement génétique de la dissémination métastatique est donc souvent réfuté, au profit d'une notion plus dynamique, impliquant les interactions entre la cellule tumorale et son micro-environnement (Quail and Joyce 2013). Il est donc reconnu que les conditions micro-environnementales de la primo-tumeur coopèrent largement avec les différentes lésions génétiques pour orienter les cellules cancéreuses à « bouger » ailleurs. Cet environnement biochimique (oxygène, nutriments, cytokines...), cellulaire (fibroblastes associés, cellules immunitaires...) et mécanique (rigidité et topologie de la matrice) est responsable de la réponse plastique des cellules tumorales qui vont alors s'adapter. Il a par exemple été élégamment montré dans le laboratoire du Dr. Matthieu Piel qu'une cellule peut changer son phénotype migratoire uniquement en fonction des paramètres topologiques et mécaniques de la matrice, sans aucune altération génétique (Y.-J. Liu et al. 2015). La plasticité de la migration, c'est-à-dire la capacité des cellules cancéreuses à adapter leur mode migratoire en fonction de leur besoin, est donc une caractéristique fondamentale d'une cellule métastatique en puissance.

Cette plasticité de la migration va notamment s'illustrer à travers différentes transition phénotypiques, comme la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et sa réciproque mésenchymo-épithéliale (MET), ou encore la transition mésenchymo-amiboïde (MAT). Ces transitions seront notamment à l'origine des phénomènes d'interconversions entre migration collective et migration individuelle. La résultante est un patchwork de phénotypes motiles présentant une granulométrie extrême, consistant en des flux cellulaires plus ou moins denses et cohésifs, avec parfois même une lumière interne, et des cellules migrant de façon isolée (**Figure 27**).

Au cours de la cascade métastatique, les capacités motiles de la cellule sont sollicitées à différentes étapes, selon des modalités variables et viennent répondre à deux grands programmes. D'une part, la faculté des cellules de migrer à travers des barrières tissulaires,

comme les lames basales ou les parois vasculaires (Glentis, Gurchenkov, and Matic Vignjevic 2014). D'autre part, les cellules doivent migrer à travers des micro-environnements aux propriétés hétérogènes, allant du parenchyme entourant la tumeur primaire, aux tissus conjonctifs et épithéliaux de l'organe distant à coloniser. La cellule va également se mouvoir dans différentes voies circulatoires comme les capillaires sanguins, les vaisseaux lymphatiques ou même le long des fibres nerveuses (Alexander et al. 2013).

Plasticité de la migration lors de la dissémination

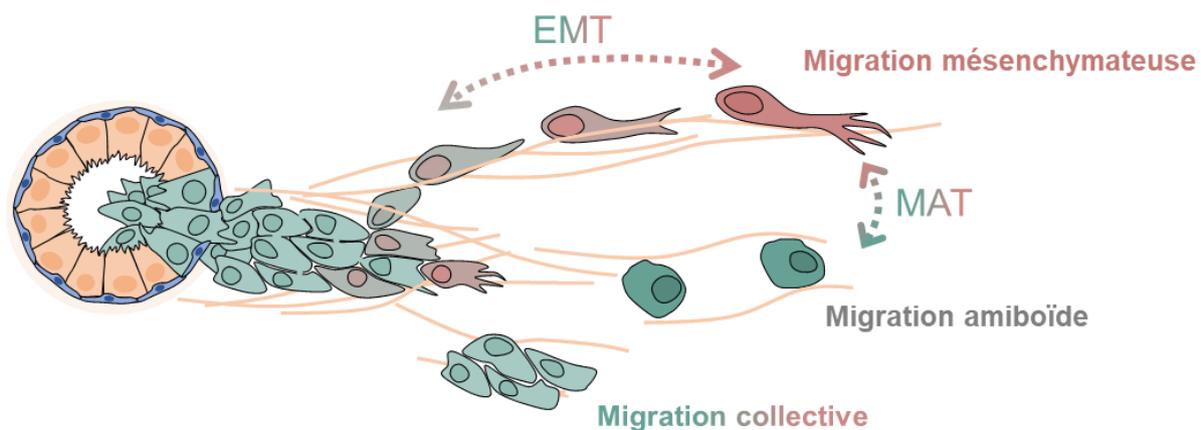


Figure 27. Plasticité de la migration au cours de l'invasion tumorale. Dans ce schéma est représenté l'invasion locale du parenchyme d'une tumeur canalaire mammaire. On observe un flux de cellules s'échappant de la tumeur. Certaines cellules peuvent poursuivre leur invasion du parenchyme de façon isolée en régulant leur caractéristiques mésenchymateuses (graduellement rouges), ou amoiboïdes (graduellement vertes). Des interconversions sont fréquemment retrouvées entre les phénotypes épithéliaux et mésenchymateux (EMT), ainsi que mésenchymateux et amoiboïdes (MAT). Enfin, la plupart du temps, il semblerait que les cellules tumorales migrent dans les tissus conjonctifs via des mécanismes collectifs.

2.2.2. Les métastases du cancer du sein, entre EMT, MET et collectif

L'EMT a fait l'objet d'un fort intérêt au cours des dernières années, si bien qu'un consortium s'est créé, le TEMTIA (« The EMT International Association »), regroupant les chercheurs probablement les plus influents du domaine. En 2020, ce consortium a proposé une vision consensuelle de ce phénomène. L'EMT est « *un changement réversible et multifactoriel du phénotype cellulaire, pendant lequel les cellules épithéliales perdent leur polarité apico-basale, remodelent leur cytosquelette et modifient leurs propriétés d'adhérence inter-cellulaires* ». Ainsi les cellules acquérant individuellement ou collectivement ces caractéristiques mésenchymateuses sont davantage aptes à migrer et à envahir les tissus (J. Yang et al. 2020).

Au cours du développement, les cellules épithéliales migrent souvent sur de longues distances. Le détachement et la sortie de leur feuillet épithélial et la migration qui s'en suit nécessite une EMT pour acquérir cet état mésenchymateux, invasif et migratoire. Dans la plupart des cas, les cellules ne perdent néanmoins pas totalement leurs jonctions intercellulaires, et vont davantage les adapter à une migration de type collective. Par ailleurs, il n'est pas rare de voir ces cellules procéder à la transition inverse, la transition mésenchymato-épithéliale (MET), afin de coloniser un nouveau territoire et y former une nouvelle structure épithéliale (Nieto et al. 2016). Il est important de noter que l'EMT retrouvée dans les cancers n'est pas un programme binaire, impliquant un stade épithélial et un stade mésenchymateux. De plus en plus de rapports font état d'une extrême granulométrie de cette transition. Ainsi, il existe un continuum d'états intermédiaires, hybrides, par lesquels les cellules transitent ; ces états sont souvent assimilés à de l'EMT partielle, et représentent en réalité davantage la norme que l'exception (Saitoh 2018). Il en découle un phénomène d'une grande plasticité, largement inscrit dans la palette phénotypique des cellules cancéreuses (**Figure 28**).

Le laboratoire de Cédric Blanpain, à la pointe du traçage in vivo des lignages cellulaires, a élégamment démontré que les tumeurs mammaires présentent des sous-populations cellulaires associées à toute une palette d'états intermédiaires de l'EMT, d'un statut épithélial à totalement mésenchymateux. Si toutes ces populations ont conservé leur potentiel tumorigénique, ce sont celles oscillant dans des états d'EMT partielle qui étaient clairement les plus invasives et aptes à atteindre la circulation et former des métastases. De façon intéressante, les cellules les plus mésenchymateuses étaient localisées à proximité des vaisseaux sanguins afin de promouvoir l'angiogenèse et constituer des niches favorables attirant localement les cellules tumorales et stimulant leur EMT (Pastushenko et al. 2018). Le concept sous-jacent relevant ainsi d'une notion d'éducation des autres cellules, les cellules les plus mésenchymateuses ne seraient pas les cellules métastatiques, mais plutôt celles qui « éduquent » les autres à le devenir.

Cette notion est d'autant plus importante à la lumière des preuves, de plus en plus abondante, du mode de migration collectif utilisé par les cellules tumorales mammaires qui disséminent. En effet, il a été montré que l'E-Cadhérine, une protéine essentielle intervenant dans la cohésion des cellules épithéliales, permettait une dissémination métastatique bien plus efficace dans de nombreux modèles de tumorigénèse mammaire (Padmanaban et al. 2019). Cela nous renvoie au constat que les cellules tumorales mammaires utilisent fréquemment un mode de migration collectif afin de coloniser des organes distants, avec des cellules « leaders » qui conservent un programme de base épithélial, malgré des caractéristiques motrices mésenchymateuses (Cheung et al. 2013). Ainsi, si l'EMT apparaît

comme un programme essentiel intégré dans la plasticité migratoire des cellules tumorales mammaire, il apparait de plus en plus comme un état transitoire et partiel, se coordonnant avec les autres modalités de migration.

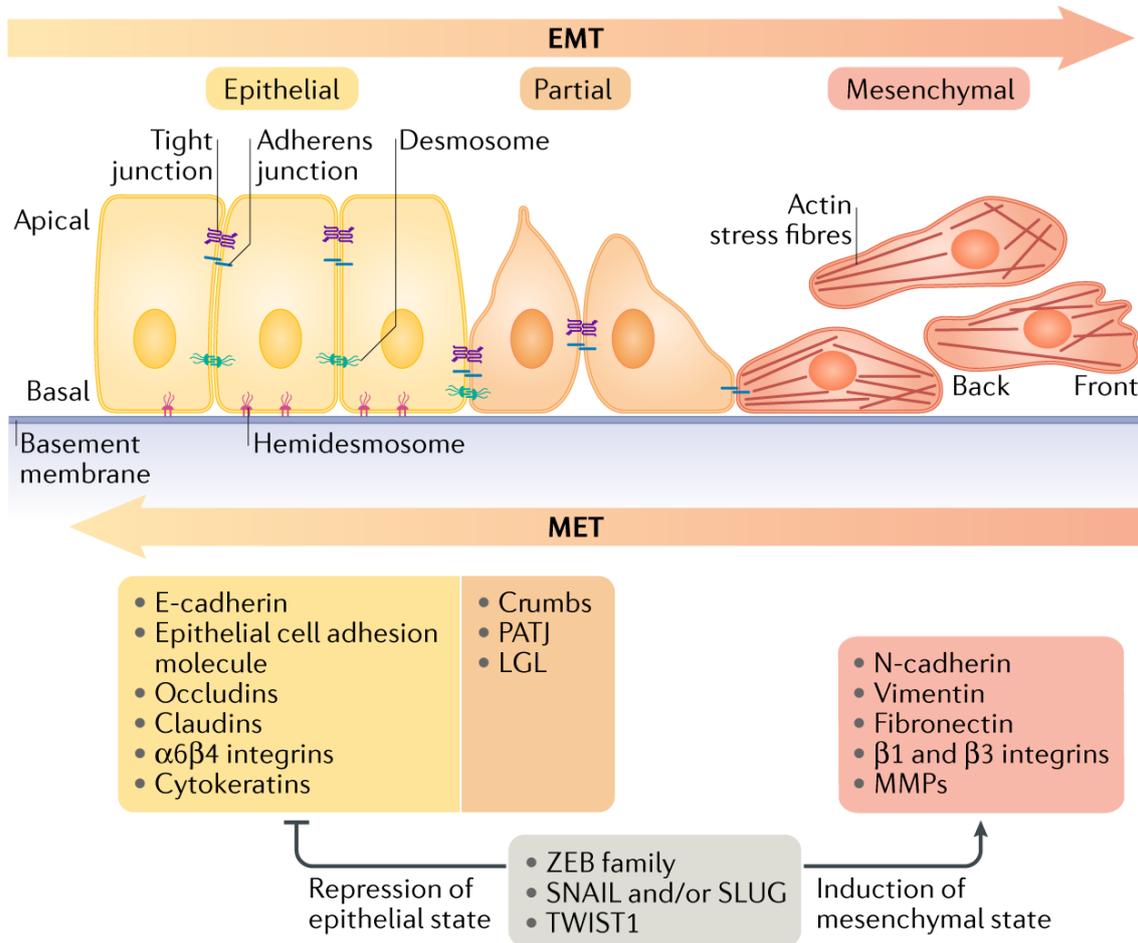


Figure 28. Caractéristiques de l'EMT partielle et sa réciproque la MET. Figure issue de (A. Dongre et RA. Weinberg, 2018). Dans ce schéma on observe le changement de polarité entre la cellule épithéliale (apico-basale) et mésenchymateuse (avant-arrière). Les cellules épithéliales sont maintenues cohésives par un ensemble de jonctions, qui sont progressivement dissoutes, au profit d'une réorganisation massive du cytosquelette d'actine chez les cellules mésenchymateuses. On remarque les différents facteurs de transcription ZEB/SNAIL/TWIST, chargés de réguler l'état d'avancement et le maintien de l'état mésenchymateux des cellules.

Résumé

Le cancer du sein est classifié par type **histologique** et sous-type **moléculaire**, afin de faciliter sa prise en charge **thérapeutique**.

Les métastases du cancer du sein peuvent se déclarer à partir de tous les types et sous-types de cancer. **Les fenêtres thérapeutiques** sont aujourd'hui extrêmement limitées, rendant cette maladie très **difficile à traiter**, voire **incurable** dans le cas du triple-négatif.

Les métastases se forment à la suite d'un enchainement d'évènements cellulaires, appelé **cascade métastatique**. Les paramètres spatio-temporels **d'émergence** et de **sélection** des cellules métastatiques sont encore **débattus**, bien que certains **modèles** semblent émerger.

Le consensus permet cependant de définir certaines **caractéristiques des cellules métastatiques**, ces fameuses « **hallmarks** », impliquant en premier lieu des capacités **motiles et invasives**.

La **migration** cellulaire est un processus **multimodal**. On distingue notamment la migration **amiboïde**, rapide et contractile, de la migration **mésenchymateuse**, lente et adhérente.

La **migration mésenchymateuse** repose sur une coordination des phénomènes de **protrusion**, **d'adhérence** et de **contraction**. Chacune de ces étapes est finement régulée par différents acteurs moléculaires, tels que les **Rho-GTPases**.

Les cellules cancéreuses présentent une incroyable **plasticité**, notamment lorsqu'il s'agit de migrer au cours de la **cascade métastatique**. Elles peuvent **intervertir leurs mode** de migration afin de s'adapter au mieux à leurs conditions **environnementales**.

Au cours du **processus métastatique mammaire**, on retrouve cette plasticité. De plus en plus de preuves démontrent que les cellules tumorales mammaires s'illustrent à travers des phénomènes de **migration collective**, avec des cellules dans des **états d'EMT partielle**.

IV. BCAR3, un adaptateur moléculaire

La surface des cellules est parsemée de récepteurs transmembranaires chargés d'accueillir différents signaux aussi bien chimiques que physiques. Des intégrines véhiculant des signaux mécaniques aux récepteurs à tyrosine kinase transmettant différents signaux trophiques, ces récepteurs sont à l'origine de cascades de signalisation intracellulaires participant à une pléiade de fonctions, nécessaires à l'homéostasie cellulaire. Le système dendritique sous-jacent à ces récepteurs, nécessite la présence de protéines adaptatrices et de protéine d'échafaudage afin de transmettre ces signaux. Ces protéines n'ont généralement pas d'activité catalytique intrinsèque mais sont capables, via leurs nombreux domaines, d'assembler les différentes protéines effectrices de ces voies de signalisation afin de former des macro-complexes multifonctionnels.

La protéine BCAR3 fait partie d'une famille de protéines possédant cette fonction adaptatrice. Nous nous intéresserons particulièrement à cette protéine compte tenu que nous l'identifierons en tant que nouveau substrat de SMYD2. Et une grande partie de cette thèse sera liée à l'étude du rôle de la méthylation de BCAR3. Nous allons donc voir comment cette fonction adaptatrice se décline dans le cas de BCAR3, quels sont les voies intracellulaires impliquées et comment les fonctions de BCAR3 sont détournées par les cellules cancéreuses afin de promouvoir la tumorigénèse mammaire.

1. Le complexe BCAR3/BCAR1

1.1. La famille des BCARs

En 1998, alors que l'équipe de Ton van Agthoven est à la recherche aléatoire de gènes pouvant être impliqués dans la résistance au 4-OH-Tamoxifène, un anti-œstrogène, ils découvrent un locus génétique particulièrement important. Ils appellent ce gène BCAR3 (« Breast Cancer Antiestrogen Resistance 3 »), et démontrent qu'il permet aux cellules cancéreuses hormono-dépendantes de survivre et d'échapper à la cytostase et la mort induites par le traitement aux anti-œstrogènes (van Agthoven et al. 1998a). Cette découverte vient compléter la famille des BCARs, déjà composée de deux autres gènes, BCAR1 et BCAR2, que cette équipe a pu également mettre en évidence avec des méthodes similaires (L. C. Dorssers et al. 1993; L. C. J. Dorssers and Veldscholte 1997) et plus tard BCAR4 (Meijer et al. 2006).

Si ces gènes partagent fonctionnellement cette importance dans la résistance aux anti-œstrogènes, leur structure, leurs domaines protéiques, et parfois même leur nature moléculaire s'avèrent être très différentes. Par exemple, l'exemple le plus flagrant est celui de BCAR4. Contrairement aux autres membres qui sont des gènes codant pour des protéines, BCAR4 code pour un long ARN non-codant (Meijer et al. 2006). BCAR2, a changé de nom, et code désormais pour un facteur de transcription à doigts de zinc nommé TRERF1 (« Transcriptional Regulating Factor 1 »). BCAR1 est devenu une des figures emblématiques dans l'étude des adhésions et de la mécano-transduction, où il est connu sous le nom de p130Cas (« protein of 130 kDa – Crk-Associated Substrate) (Defilippi, Di Stefano, and Cabodi 2006; Sawada et al. 2006). Si cette nomenclature basée sur une convergence fonctionnelle a donc été perdue, l'appellation de BCAR3, également appelé AND-34 chez la souris, reste néanmoins conservée (van Agthoven et al. 1998a; D. Cai et al. 1999; Meng et al. 2019).

Aucune étude n'est venue substantivement alimenter les connaissances dans le cas de BCAR2 (TRERF1), qui donc reste à ce jour totalement méconnu. BCAR4 a fait l'objet d'investigations plus poussées, notamment dans les cancers. Ainsi, il est démontré par exemple que BCAR4 joue un rôle crucial dans l'agressivité des cancer du sein, et plus particulièrement dans la dissémination métastatique des cancers du sein triple-négatif (Godinho et al. 2010; Xing et al. 2014). Mécanistiquement, BCAR4 se lierait physiquement aux deux facteurs de transcription SNIP1 et PNUMS, pour activer les fonctions de l'histone

acétyltransférase p300, relâcher localement la contrainte épigénétique et engager l'ARN polymérase II. Ce mécanisme induirait alors un programme transcriptionnel de migration cellulaire dépendant de Hedgehog favorisant la dissémination métastatique (Xing et al. 2014). Cependant, je présenterais plus particulièrement BCAR1 dans cette partie, puisque, comme nous allons le voir par la suite, il joue un rôle remarquablement complémentaire à celui de BCAR3.

1.2. BCAR1, un échafaudage élastique

BCAR1 fait partie de la famille des protéine CAS, regroupant également NEDD9 (« Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 »), CASS4 (« Cas scaffolding protein family member 4») et EFS (« Embryonal Fyn-associated substrate »). Toutes ces protéines possèdent une structure similaire, organisée en 3 domaines principaux (Tikhmyanova, Little, and Golemis 2010). Le domaine SH3 (« Src Homology 3 »), une plateforme d'interaction pouvant accommoder les motifs poly-prolines de différentes protéines. Le domaine SH3 de BCAR1 est responsable de son interaction avec notamment la protéine centrale des adhérences focales FAK (« Focal Adhesion Kinase ») ou encore la protéine GEF RAPGEF1 (« Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 1 ») (Polte and Hanks 1995). Adjacent, on retrouve le domaine substrat (SD), qui contient un grand nombre de motifs YxxP, qui, lorsqu'ils sont phosphorylés au niveau de la tyrosine (Y), peuvent interagir avec différentes protéines contenant des domaines SH2 (« Src Homology 2 »), telles que l'oncogène CRK (Sakai et al. 1994). Ce domaine est d'une importance capitale dans la fonction mécano-sensible de BCAR1 (**Figure 29**). En effet, prédite comme intrinsèquement désordonnée (« Intrinsically Disordered Region », ou IDRs), l'étirement de cette région permet d'exposer ces motifs YxxP cryptiques, et ainsi permettre leur phosphorylation et l'interaction avec différents partenaires assurant la transmission de la signalisation cellulaire (Sawada et al. 2006). Cet étirement pouvant être, par exemple, la résultante des forces exercées par l'éloignement de deux *clusters* d'intégrine, lors de la maturation des adhérences (Janoštiak et al. 2014). Enfin, le domaine C-terminal, extrêmement conservé entre les membres de la famille CAS, est un domaine permettant l'homo- et l'hétéro-dimérisation avec d'autre membres de la famille CAS. Il est également le siège de nombreuses interactions avec différents membres de la famille Src, ou encore de BCAR3, comme nous le verrons plus tard (D. Cai et al. 1999).

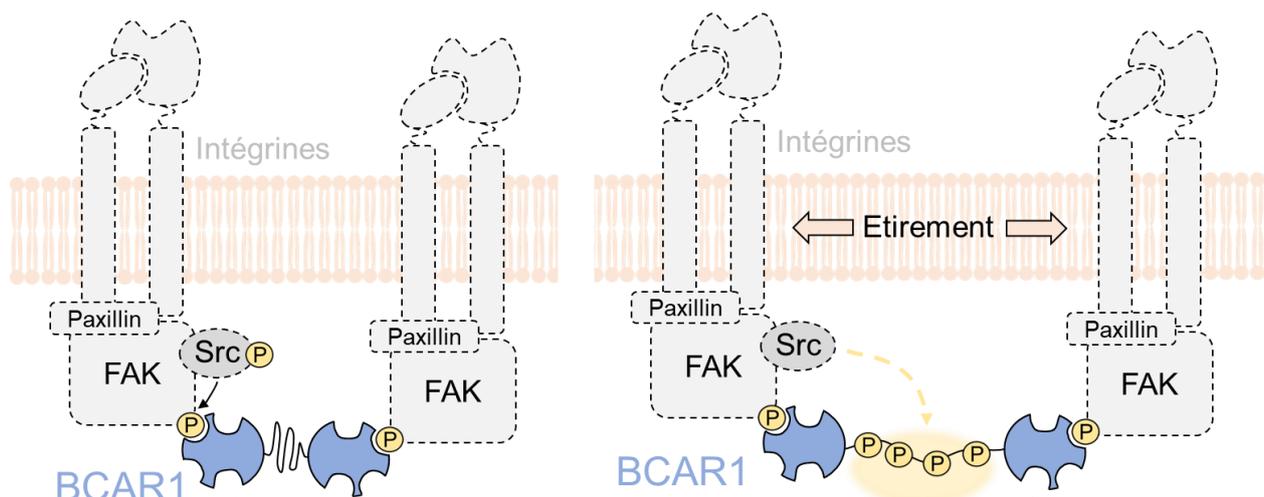


Figure 29. Mécanisme d'étirement et d'activation de BCAR1. Dans ce schéma on constate que la région désordonnée de BCAR1 est inaccessible à la phosphorylation par Src notamment. En cas d'engagement des intégrines et de leur éloignement lors d'étirement locaux inhérents à la migration, BCAR1 est également étiré afin de faire apparaître ces tyrosines cryptiques, pouvant alors être phosphorylé et déclencher les voies de signalisation en aval.

BCAR1 est donc une protéine d'armature, d'échafaudage, assurant une fonction cruciale de senseur du stress mécanique au niveau des points d'adhérences, et donc fondamentalement impliqué dans les phénomènes de migration cellulaire. Récemment, l'équipe du Dr. Jacquemet a d'ailleurs élégamment montré que ces fonctions de mécano-senseur s'exerçaient également au niveau des filopodes (Jacquemet et al. 2019). Il est intéressant de noter que les fonctions mécano-sensibles de BCAR1 sont encore largement inexplorées dans les cancers, alors que la matrice extracellulaire des tissus tumoraux possède des propriétés mécaniques extrêmes, affectant profondément les propriétés d'adhérence et de contractilité des cellules cancéreuses (Levental et al. 2009).

Ses étroites relations avec l'oncogène Src fait également de BCAR1 un relais essentiel des différentes voies de prolifération cellulaire impliquant les récepteurs à tyrosine kinase. Il n'est donc pas étonnant de constater que des niveaux anormalement élevés de BCAR1 sont fréquemment retrouvés dans différents types de cancer, comme le cancer du sein (Tornillo, Defilippi, and Cabodi 2014). Les fonctions de BCAR1 sont essentielles à la maturation de la glande mammaire, et sont largement détournées au cours de la transformation cancéreuse. Un grand nombre d'étude démontrent en effet le rôle pro-tumoral de BCAR1 via des phénomènes de prolifération et d'invasion des cellules cancéreuses mammaires. Par exemple, l'invalidation de l'interaction entre BCAR1 et la protéine FAK mène à un arrêt de la croissance tumorale *in vivo* (Pylayeva et al. 2009). En particulier, les fonctions de BCAR1

ont également été reportées dans les cancers du sein hormono-dépendants. Outre sa surexpression liée au phénomène de résistance aux anti-estrogènes (Flier et al. 2000), BCAR1 est directement impliqué dans le relais des signaux de survie et de résistance au tamoxifène initiés par l'activation de Src et culminant par l'expression de la Cycline D1 (Cabodi et al. 2004). Ainsi, BCAR1 semble jouer différents rôles participant à la progression tumorale mammaire.

1.3. BCAR3, un adaptateur

BCAR3, ultime membre connu des BCARs, fait partie de la famille des NSPs (pour « Novel SH2-containing Proteins»). Cette famille regroupe 3 membres, NSP1, NSP2 (aliases BCAR3, ou AND-34) et NSP3 (aliases SHEP1 ou CHAT), tous fonctionnant comme des adaptateurs moléculaires cytoplasmiques (Wallez et al. 2012a). Structurellement, BCAR3 est une protéine de 826 acides aminés composée d'un domaine N-terminal SH2 et d'un domaine C-terminal GEF-like. Ces deux domaines sont entrecoupés par une région P/S (« Proline-Serine rich) contenant notamment notre nouvel évènement de méthylation (**Figure 30**).

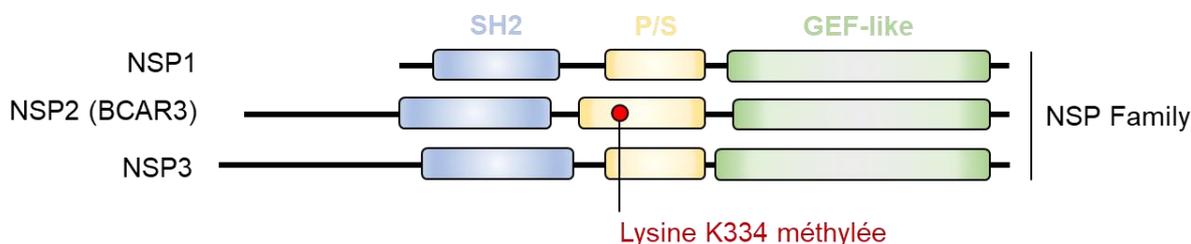


Figure 30. Famille de protéines NSPs. Dans ce schéma on retrouve les 3 membres de la famille NSP, organisés en 3 grands domaines. Ces domaines sont détaillés dans le paragraphe suivant. On notera la position de la lysine 334, siège du nouvel évènement de méthylation catalysé par SMYD2, sur le domaine P/S.

A l'extrémité N-terminale de BCAR3 on retrouve le domaine SH2. Ce domaine possède le motif consensus FLVR, chargé de reconnaître les tyrosines phosphorylées, l'arginine R177 y jouant un rôle critique (Pawson 2004). Différentes expériences de perte de fonction du domaine SH2 ont pu ainsi mettre en évidence que la mutation de cette arginine en lysine (R177K) empêche l'interaction avec la phosphatase PTP α (« Protein Tyrosine Phosphatase α »). Ainsi la phosphotyrosine Y789 de PTP α devient le premier substrat reconnu par le domaine SH2 de BCAR3 (G. Sun et al. 2012). Une élégante étude démontre par la suite l'interaction entre BCAR3 et la phosphotyrosine Y1307 du récepteur à tyrosine kinase HER3

(« Human Epidermal growth factor Receptor 3 ») via son domaine SH2 (C. Li et al. 2017). Néanmoins, il n'y a pas eu à ce jour d'analyse à grande échelle de l'interactome du domaine SH2 de BCAR3. Il est donc probable que ce domaine soit au carrefour de nombreux partenaires encore inconnus. Notons enfin que le second isoforme de BCAR3 est totalement dépourvu de ce domaine SH2 et commence quelques acides aminés en amont de la lysine K334, siège d'un nouvel événement de méthylation catalysé par SMYD2, et objet de ma thèse. Il n'existe aucune caractérisation de cet isoforme à ce jour, bien qu'exprimé dans la plupart des tissus humains (Vervoort et al. 2007).

La région S/R de BCAR3 est remarquable par son absence totale de caractérisation. Prédite comme étant largement désordonnée, elle semble néanmoins importante pour maintenir la phosphorylation de BCAR1 (Makkinje et al. 2009a) et contient la lysine K334, le site de méthylation étudié au cours de ma thèse. Ces régions sont généralement exposées et connues pour promouvoir les interactions entre les protéines.

Une particularité notable de BCAR3, et des protéines NSP en général, est leur domaine GEF-like (**Figure 31**). Ce domaine GEF-like est homologue au domaine CDC25, un domaine GEF connu, chargé d'échanger le GDP en GTP sur les petites protéines à activité GTPase de la famille RAS. Ainsi, différents rapports ont fait état d'une activation des GTPases Ral ou encore Rap1 dans des cellules surexprimant BCAR3 (Gotoh et al. 2000; Bos, de Rooij, and Reedquist 2001; Rufanova et al. 2009). Cependant d'autres rapports ont également contesté cette activité (Yu and Feig 2002). Face à ces résultats irréconciliables, la structure, résolue il y a une dizaine d'années, implacable, trancha (Mace et al. 2011). A l'instar des autres membres de la famille NSP, la partie du domaine GEF-like de BCAR3 sensée lier la GTPase est stériquement occultée, rendant BCAR3 incapable de se lier aux GTPases et d'assurer l'échange de GDP en GTP. Fruit d'une convergence évolutive forte des protéines NSPs, cette conformation, que certains qualifieraient de « fermée », est en fait une ouverture structurée de la protéine de sorte à épouser parfaitement le domaine C-terminal de BCAR1 et des autres membres de la famille CAS, tel que NEDD9 (Mace et al. 2011).

Il est désormais clair que BCAR3 ne possède pas d'activité catalytique intrinsèque, mais servirait plutôt de protéine adaptatrice permettant des signalisations entre les partenaires du domaine SH2 (multiples en puissance), et les membres de la famille CAS, notamment BCAR1. Une protéine adaptatrice accomplie. Cette liaison avec BCAR1, extrêmement forte, stable, de l'ordre du nanomolaire (30 nM), connecte donc adaptateur et échafaudage, afin de former un module macromoléculaire chargé de réguler en profondeur différentes voies de signalisations.

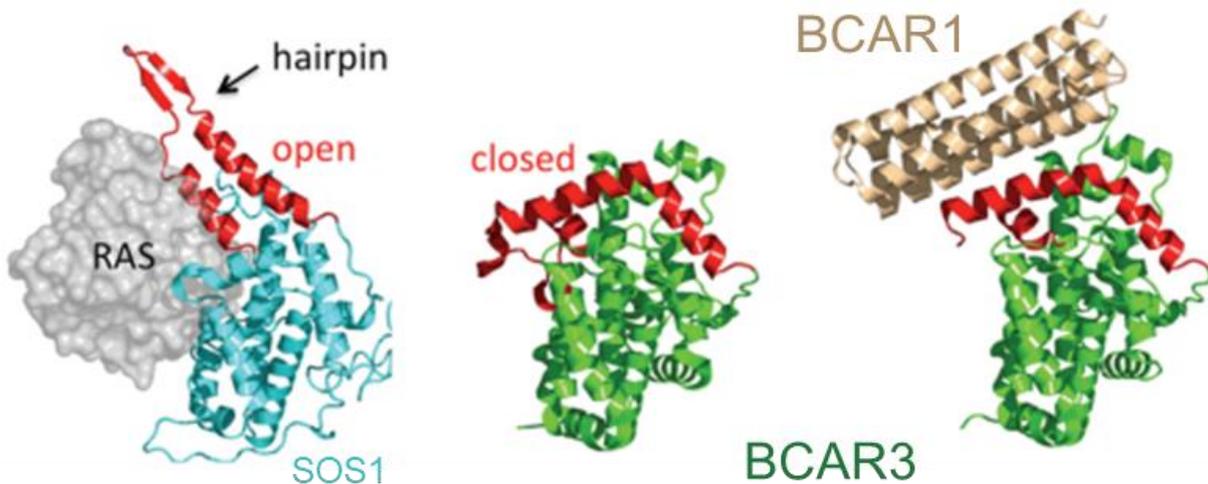


Figure 31. Représentation des structures de BCAR3 en complexe avec BCAR1. Dans ce schéma tiré de la revue de (Wallez et al, 2012), nous comparons une RAS-GEF active, SOS1, avec le domaine GEF (en rouge), en conformation ouverte, avec le domaine GEF-like de BCAR3 en conformation fermée. Enfin, nous constatons que ce domaine fermé permet une association avec la protéine BCAR1.

2. BCAR3, au carrefour de signalisations multiples

2.1. Contexte physio-pathologique

Avant d'argumenter sur les fonctions de BCAR3, il est important de rappeler un fait notable : l'inactivation de BCAR3 serait totalement viable chez la souris. En ciblant un site cryptique au niveau de l'exon 4, les auteurs parviennent à éliminer le domaine SH2 de BCAR3 par recombinaison homologe en générant une protéine tronquée, non fonctionnelle. Le seul phénotype observé est une rupture du cristallin, observable systématiquement 3 mois après la naissance des souris (Near et al. 2009). Néanmoins, il est important de noter que la méthode d'inactivation employée par les auteurs n'exclue pas l'hypothèse d'allèles hypomorphes de BCAR3. En effet, leur modèle n'exclut en rien une expression de l'isoforme 2, débutant autour de l'exon 6, en amont de la lysine K334. Bien que ne contenant pas le domaine SH2, le domaine GEF-like est notamment présent dans cet isoforme 2 qui, rappelons-le, est exprimé dans la plupart des tissus humains, et donc pourrait assurer

certaines fonctions de BCAR3, tout en le privant de ses fonctions d'adaptateur moléculaire (Vervoort et al. 2007).

Selon « The Human Protein Atlas », à l'exception de certaines cellules hématopoïétiques et lymphoïdes, l'ensemble des tissus semblent exprimer plus ou moins fortement BCAR3 au niveau protéique (Uhlén et al. 2015). Pour autant, mise à part l'analyse phénotypique citée précédemment, aucune étude n'a tenté d'explorer les fonctions physiologiques de BCAR3. En réalité, l'ensemble des fonctions moléculaires de BCAR3 ont été jusqu'à présent décrites dans des lignées cancéreuses mammaires.

Dans les cancers, BCAR3 est exprimé à des niveaux relativement similaires aux tissus normaux, et ainsi ne démontre que peu de corrélation avec les données de survie, voire même a été considéré dans certains cancers comme un gène de bon pronostic (W. Zhang et al. 2018). Cela contraste cependant avec les analyses protéiques, qui montrent des niveaux élevés de BCAR3, avec fréquemment des corrélations de mauvais pronostic, laissant donc suggérer une importance des processus post-transcriptionnel et traductionnelles dans la régulation de BCAR3 (Cross et al. 2016a). Par exemple, une récente étude a montré que la protéine BCAR3 était massivement dégradé par l'ubiquitine ligase Cullin-5 dans les cellules mammaires non transformées MCF10-A (Steenkiste et al. 2021a). Les niveaux de Cullin-5 étant généralement bas dans les cancers, il est donc possible que ce mécanisme de dégradation soit moins efficace dans les cancers, et permette une stabilisation de BCAR3 au niveau protéique.

2.2. BCAR3 : la résistance aux anti-œstrogènes

Comme brièvement évoqué dans la partie consacrée aux traitements du cancer du sein, la grande majorité des tumeurs mammaires présentent des propriétés hormono-dépendantes, et sont donc positives à ER. C'est-à-dire que la prolifération et la survie des cellules cancéreuses est initialement dépendante de l'activation de ER par une hormone stéroïdienne appelée œstrogène. Mécanistiquement, après la liaison à l'œstrogène, ER dimérise et transloque dans le noyau, où il pourra se fixer à différents co-activateurs pour former un complexe transcriptionnel compétent. Ce complexe va ensuite orchestrer un programme mitogène extrêmement actif impliquant notamment la cycline D1 (Prall et al. 1997). Ainsi, ces tumeurs sont généralement prises en charge par un ensemble de thérapies endocrines, des « anti-œstrogènes » visant à bloquer cette activation de ER. Notamment, on retrouve les modulateurs de ER (e.g., Tamoxifène) qui entrent en compétition avec

l'œstrogène pour la liaison à ER, les supprimeurs de ER (e.g., Fulvestrant) qui sont des antagonistes pures, bloquant l'activité transcriptionnelle de ER et enfin les inhibiteurs de l'Aromatase (e.g., Letrozole), qui bloquent la conversion des androgènes en œstrogène (Hanker, Sudhan, and Arteaga 2020). Face à ces traitements il n'est pas rare de voir la tumeur évoluer et développer des mécanismes de résistance généralement basés sur une réactivation de ER indépendante à la fixation de son ligand, ou, plus rarement à la délétion de ER (T. W. Miller et al. 2011; Hanker, Sudhan, and Arteaga 2020).

L'expérience qui a découvert BCAR3 avait bien comme objectif de trouver des gènes impliqués dans des mécanismes de résistance à ces anti-œstrogènes, en particulier du Tamoxifène (van Agthoven et al. 1998a). Ainsi de nombreux rapports font état du rôle mitogène de BCAR3 lorsque celui-ci est surexprimé dans des cellules cancéreuses mammaire traitées chroniquement avec différents anti-œstrogènes (van Agthoven et al. 1998a; Dongpo Cai, Iyer, et al. 2003a; L. C. J. Dorssers et al. 2005; K. N. Felekis et al. 2005; Wallez, Riedl, and Pasquale 2014a). Un premier mécanisme de résistance impliquera par exemple une induction de la cycline-D1 via l'activation de la voie Rac1/PAK1 (Dongpo Cai, Iyer, et al. 2003a). Tandis que la voie PI3K/Akt a été écartée, un autre mécanisme suggère que BCAR3 puisse promouvoir une robuste activation et phosphorylation de ERK, responsable de l'expression de la cycline D1 (Wallez, Riedl, and Pasquale 2014a), possiblement par modulation de l'activité kinase de PAK1, dont ERK est un substrat. Un autre point mécanistique essentiel est l'absolue nécessité de former le complexe avec BCAR1. En effet, les différents mutants de BCAR3, et en particulier celui bloquant l'interaction avec BCAR1, empêchent strictement toute activation de ces voies mitogènes (Dongpo Cai, Iyer, et al. 2003a; K. Felekis, Quilliam, and Lerner 2006; Wallez, Riedl, and Pasquale 2014a). Différents mécanismes ont donc été évoqués, mais tous se rejoignent autour de voies MAPK-dépendantes impliquant la complexation de BCAR3 avec BCAR1 et l'induction de la cycline-D1, un oncogène central, responsable du maintien de la prolifération, en absence de la signalisation normalement véhiculée par ER.

2.3. BCAR3 dans la migration cellulaire

Si l'induction de la prolifération par BCAR3 a bien été démontrée, certaines études corroborent surtout le rôle de BCAR3 dans la régulation du cytosquelette d'actine et de la migration des cellules tumorales mammaires. En effet, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la migration implique nécessairement une dynamique du cytosquelette

d'actomyosine. Cette dynamique est à l'origine de forces, qui sont transmises sur le substrat *via* des systèmes d'adhérences, permettant *in fine* la migration.

La localisation de BCAR3 au niveau de divers renflements membranaires riches en actine est démontrée dès 2003 par Amy Bouton et son équipe. Conjointement, ils observent que BCAR3 est capable d'accélérer la migration des cellules cancéreuses (Riggins, Quilliam, and Bouton 2003). Puis de nombreux rapports vont tenter d'expliquer le mécanisme de cette synergie. En 2007, la même équipe démontre qu'en aval de Src, BCAR3 va fortement intensifier la phosphorylation de BCAR1 et activer les voies de signalisations dépendantes de BCAR1 (Schrecengost et al. 2007a). Ce résultat décrit un des phénotypes moléculaires les plus prégnant et les mieux caractérisés de BCAR3 ; c'est à dire sa propension à induire la phosphorylation de BCAR1 et à activer les voies sous-jacentes. Cette activité est majeure puisqu'il a été récemment démontré que l'ensemble du pool de BCAR3 est en complexe avec BCAR1, indiquant un niveau extrême d'interconnexion entre ces deux protéines (Cross et al. 2016a).

Cette activation de BCAR1 par BCAR3 s'est rapidement retrouvée jointe à un mécanisme d'adhérence. Lors des premières étapes d'étalement des cellules sur une matrice de fibronectine, la présence de BCAR3 favorise la phosphorylation de BCAR1 et l'adhérence des cellules (N. R. Schuh et al. 2010). En effet, la formation de ce complexe BCAR3/BCAR1 est essentielle afin d'accélérer la dissociation des adhérences et ainsi permettre l'étalement rapide des cellules.

Ce désassemblage des adhérences est également crucial lors des phénomènes de migration, puisqu'il s'inscrit dans ce que l'on appelle le renouvellement (« turnover ») des adhérences. Ce renouvellement concerne les adhérences à tous les stades de maturation, de l'adhérence naissante du lamellipode à l'adhérence focale, située à l'interface avec la lamelle. Les adhérences naissantes situées dans le lamellipode présentent un renouvellement extrêmement rapide (< 60sec.), et si elles ne mûrissent pas en point d'adhérence focal, elles viennent se désassembler à l'interface lamellipode et lamelle (Vicente-Manzanares and Horwitz 2011). Il est encore inconnu si BCAR3 régule le désassemblage des adhérences naissantes ou focales, cependant une partie du mécanisme a été élucidé.

Mécanistiquement, en réponse à l'engagement des adhérences avec la fibronectine de la matrice, Src va phosphoryler PTP α . Cette phosphotyrosine Y789 de PTP α va servir de point d'ancrage pour le domaine SH2 de BCAR3. Également lié à BCAR1 via le domaine GEF-like, cela va permettre d'étirer BCAR1, exhiber ses sites tyrosines cryptiques et induire une vague de phosphorylation par Src, notamment sur la tyrosine Y410 (G. Sun et al. 2012).

Cette phosphorylation de BCAR1 est absolument dépendante des fonctions adaptatrices de BCAR3, puisque les délétions de son domaine GEF-like ou du domaine SH2 sont toutes deux responsables d'une perte de cette phosphorylation (G. Sun et al. 2012; Wallez, Riedl, and Pasquale 2014a). En réponse à cette phosphorylation, différentes protéines adaptatrices importantes pour la migration cellulaire, tels que Crk, vont se lier à BCAR1 (Schrecengost et al. 2007a). En plus de cette induction de Crk, l'induction de la phosphorylation de BCAR1 en aval de BCAR3 va également activer la voie PI3K/Akt (K. N. Felekkis et al. 2005). L'activation de ces différents modules de signalisation va enfin être responsable d'une robuste activation des Rho-GTPases Rac1 et Cdc42, qui est totalement perdue en cas de mutation de BCAR3 sur son site d'interaction avec BCAR1 (Dongpo Cai, Felekkis, et al. 2003; Dongpo Cai, Iyer, et al. 2003a; K. N. Felekkis et al. 2005; Near et al. 2007; Wilson et al. 2013a; Cross et al. 2016a). Ainsi BCAR3, via la phosphorylation de BCAR1, va permettre de stimuler les protrusions cellulaires, accélérer la dissociation des adhérences et favoriser les phénomènes de migration mésenchymateuse (Wilson et al. 2013a; Cross et al. 2016a) (**Figure 32**).

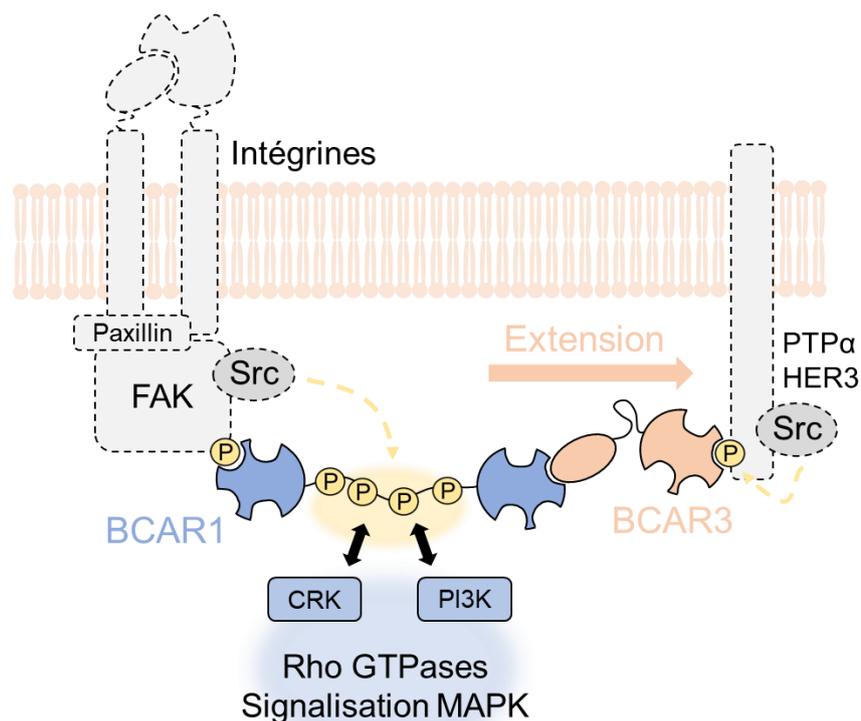


Figure 32. Schéma de synthèse des fonctions moléculaires de BCAR3. Dans ce schéma, l'activation des intégrines ou de différents récepteurs va permettre la phosphorylation de certaines protéines comme FAK ou les récepteurs eux même par Src. Ces phosphorylations vont être reconnues par les domaines SH3 de BCAR1 d'un côté et SH2 de BCAR3 de l'autre, permettant une extension moléculaire de BCAR1 et une exposition de ses sites de phosphorylation cryptiques. Ces différentes phosphorylation vont ensuite permettre l'activation de différentes voies moléculaires en aval, tels que CRK ou PI3K, culminant dans l'activation de Rho GTPases ou la voie MAPK.

Résumé

BCAR3, à l'instar de sa partenaire **BCAR1**, a été initialement décrite comme une protéine favorisant la **résistance aux anti-œstrogènes**, utilisés comme traitement des cancers du sein hormono-dépendants.

BCAR3 est une protéine adaptatrice, reliant différentes signalisations à la **protéine d'armature BCAR1** *via* un domaine GEF-like, **dénuée d'activité catalytique**. L'interaction entre BCAR3 et BCAR1 est extrêmement **robuste**, de l'ordre du **nanomolaire**.

La **totalité de BCAR3** semble être **en complexe** avec BCAR1. Le principal trait fonctionnel de cette association est **l'augmentation** drastique de la **phosphorylation de BCAR1** et de **l'activation des voies** de signalisation en aval.

La **résistance aux anti-œstrogènes** dépendante de BCAR3 a pu ainsi être liée à la formation de ce **complexe** avec BCAR1, et à l'activation en aval des **signalisation MAPK et cyline-D1**.

Les protéines BCAR3 et BCAR1 sont présentes au niveau des **adhérences cellulaires**, notamment au sein des adhérences naissantes retrouvées dans les protrusions cellulaires. La formation de ce **complexe** n'est **pas nécessaire à leur localisation** au niveau de ces adhérences, en revanche elle l'est pour **assurer le « turnover » des adhérences**, requis pendant les processus de **migration**.

BCAR3 a donc été impliquée dans des mécanismes de **migration cellulaire** dans des lignées **cancéreuses mammaires**. Ses fonctions au cours de la **progression tumorale, *in vivo*** sont néanmoins **inconnues**.

V. Les formines FMNLs, des polymérase d'actine au cours de la migration

Au cours de la migration, nous avons vu qu'une principale composante est la polymérisation d'actine. Cette polymérisation a été incroyablement bien caractérisé au cours des dernières décennies, si bien que l'on capable aujourd'hui de reconstituer des architectures *in vitro*. Parmi les facteurs impliqués dans la régulation de cette polymérisation, on retrouve les FMNLs (« Formin Like protein »), des protéines de la famille des formines, chargées de polymériser l'actine notamment dans le cadre des phénomènes de protrusion du lamellipode.

Au cours de ce travail, les FMNLs ont été particulièrement étudiées puisqu'elles ont été identifiées comme étant les lecteurs quasi-exclusifs de la méthylation de BCAR3, catalysée par SMYD2. Dans ce chapitre, nous allons détailler les mécanismes sous-jacent à la polymérisation d'actine et ce notamment dans le cadre du lamellipode. Nous présenterons ensuite de façon générale la famille des formines, et plus particulièrement les FMNLs. Notamment nous nous pencherons sur le rôle des FMNLs dans le lamellipode. Enfin nous évoquerons le rôle des FMNLs dans les cancers, largement associé à la dissémination métastatique.

1. La polymérisation d'actine dans la migration

1.1. De l'actine globulaire au filament

L'année de la mort de son fameux homonyme littéraire, Hugh Huxley découvre une propriété singulière du filament d'actine à travers l'objectif de son microscope électronique : le filament d'actine est polarisé. Il possède une extrémité « moins », appelée extrémité pointue, et une extrémité « plus », que l'on appelle extrémité barbée (Huxley 1963). Cette polarité structurale illustre une importance fonctionnelle majeure, puisqu'une dizaine d'années plus tard le Pr. Thomas Pollard et ses collègues démontrent que l'extrémité barbée polymérise bien plus rapidement que l'extrémité pointue (Woodrum, Rich, and Pollard 1975) (**Figure 33**).

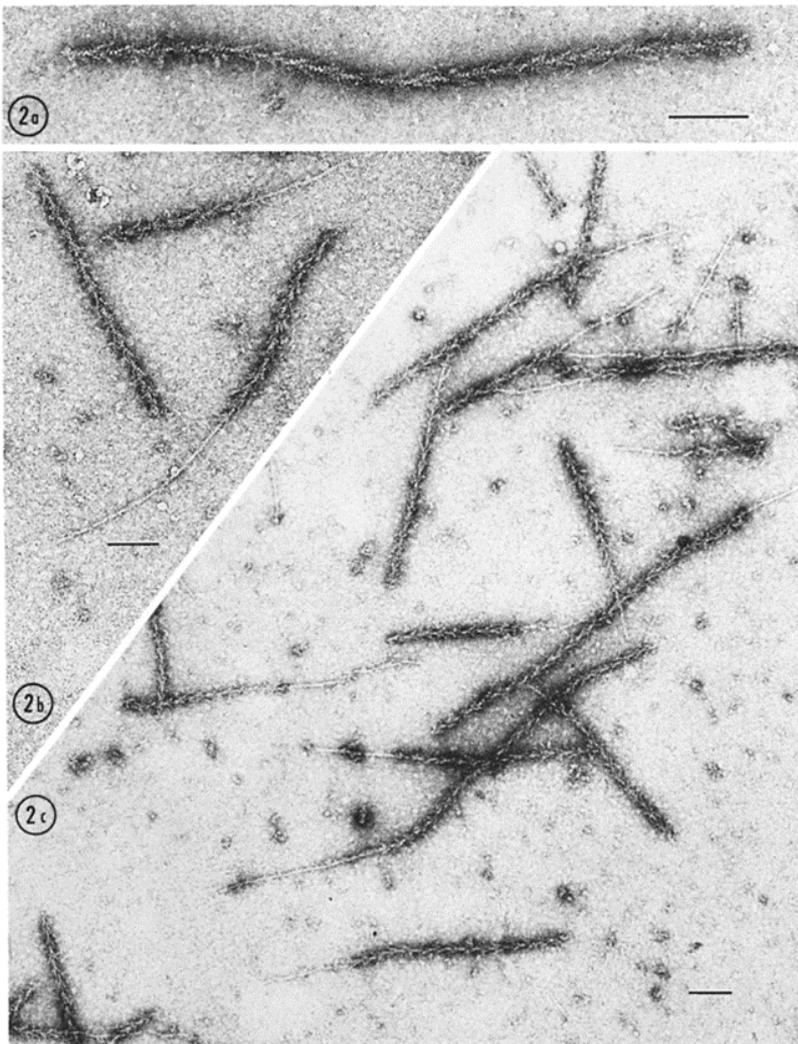


Figure 33. Cliché de microscopie électronique d'un filament d'actine. Ce cliché de « *negative staining* » est issu des travaux de (Woodrum, Rich and Pollard, 1975). On distingue nettement les extrémités barbées des filaments, dénudées.

A la base de ce filament, l'actine monomérique, ou actine globulaire (actine-G), une protéine de 42 kDa exprimée de façon ubiquitaire et extrêmement conservée au cours de l'évolution. C'est cette actine-G qui va servir d'unité structurale élémentaire et polymériser en actine filamenteuse (actine-F). Les filaments d'actine sont de fines fibres semi-flexibles de 7 nm de diamètre, qui s'assemblent en microfilaments hélicoïdaux à deux brins pouvant persister à des longueurs de plusieurs micromètres de long. Le processus de polymérisation est étroitement régulé par les conditions ionique et énergétique de l'environnement. Le monomère d'actine-G possède une poche pouvant accommoder à la fois un cation, de type Mg^{2+} ou Ca^{2+} , et un nucléotide, l'ADP ou l'ATP (Adénosine Di- ou Tri-Phosphate). Schématiquement, la liaison du Mg^{2+} et de l'ATP va favoriser la polymérisation du monomère, à l'inverse, la fixation du Ca^{2+} et de l'ADP y sera très défavorable. Les raisons, probablement structurales, sont néanmoins méconnues. Dans les conditions physiologiques, ce Mg^{2+} est en large excès et l'ATP est en concentration saturante, les monomères d'actine, médiocres hydrolyseurs d'ATP, sont donc liés à ces molécules et prêt pour la polymérisation. Lorsque les monomères liés à l'ATP polymérisent, ils s'aplatissent, adoptant alors une conformation bien plus favorable à cette activité ATPase. Ainsi, au bout de quelques minutes, les monomères ayant hydrolysés leur ATP en ADP, les « vieux », vont dépolymériser spontanément (Thomas D. Pollard 2016). Cette notion est à la base de la dynamique du filament d'actine, en permanence contraint dans un cycle net d'ajout, à l'extrémité barbée, et de perte, à l'extrémité pointue, de monomère d'actine selon un mécanisme décrit comme un tapis-roulant (« treadmilling ») d'actine (T. D. Pollard 1986) (Figure 34).

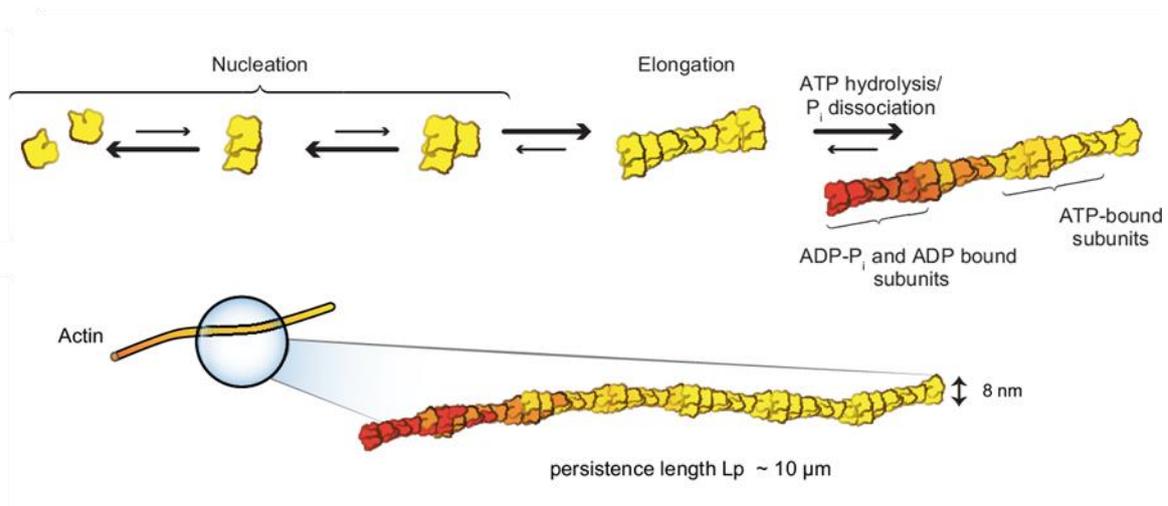


Figure 34. Schéma de la génération du filament d'actine. La figure est tirée de (Blanchoin et al., 2014). D'un point de vue cinétique, la polymérisation d'actine se déroule en deux phases : la nucléation, l'étape limitante avec la formation de dimères et de trimères d'actine, puis l'élongation rapide au niveau de l'extrémité barbée. Est représenté également le schéma d'un filament d'actine et sa métrique.

A l'échelle du temps de la cellule, la dépolymérisation dû à ce tapis roulant est cependant négligeable, car beaucoup, beaucoup, trop lente. Si cette cinétique était conservée, avec les concentrations d'actine monomérique et d'ATP retrouvées dans la cellule, le cytosquelette des cellules ressemblerait à un ensemble totalement fixe et figé, incapable de cette incroyable plasticité que l'on observe dans une cellule en mouvement. En réalité, la dynamique de ce filament, sa polymérisation et sa dépolymérisation, est étroitement contrôlée par de nombreuses protéines. Ce sont ces protéines qui vont générer des réseaux plus ou moins complexes, aux architectures diverses et variées. Parmi ces architectures, j'ai eu l'occasion au cours de ma thèse de m'intéresser à l'une d'entre elle, le lamellipode. Une structure que nous avons déjà abordée, présente sur le front des cellules se déplaçant selon une modalité mésenchymateuse.

1.2. Exemple : le lamellipode

C'est au Dr. Abercrombie et ses collègues à qui l'on doit la première description des lamellipodes dans les années 70. Il observa des « projections lamellaires, apparaissant à la tête des cellules migrant en culture ». Il donnera un nom à ces protrusions, les lamellipodes (Abercrombie et al. 1970). Rapidement identifiée comme étant une structure riche en actine filamenteuse (Abercrombie, Heaysman, and Pegrum 1971), nous savons désormais que la force projetant cette surface membranaire incombe à la polymérisation d'actine (Theriot and Mitchison 1991).

La polymérisation d'actine au sein du lamellipode est tout à fait remarquable. Les travaux pionniers de Svitkina et Borisy décrivent le lamellipode comme un réseau arborescent d'actine branchée, principalement nucléé par le complexe ARP2/3 (Svitkina and Borisy 1999). Cette actine branchée correspond à des filaments bourgeonnants à partir de filaments pré-existants. Ce mode de polymérisation peut être didactiquement approchée selon un modèle dit de « nucléation dendritique » (Blanchoin et al. 2000). Dans ce modèle, différents stimuli vont orchestrer l'activation de Rho-GTPases, notamment Rac1 ou Cdc42, responsables du recrutement à la membrane plasmique et à l'activation de toute une famille de promoteur de la nucléation d'actine, tels que le complexe WAVE en 2D ou N-WASP en 3D (H. Tang et al. 2013). Les différentes étapes sont explicitées dans la légende de la **(Figure 35)**.

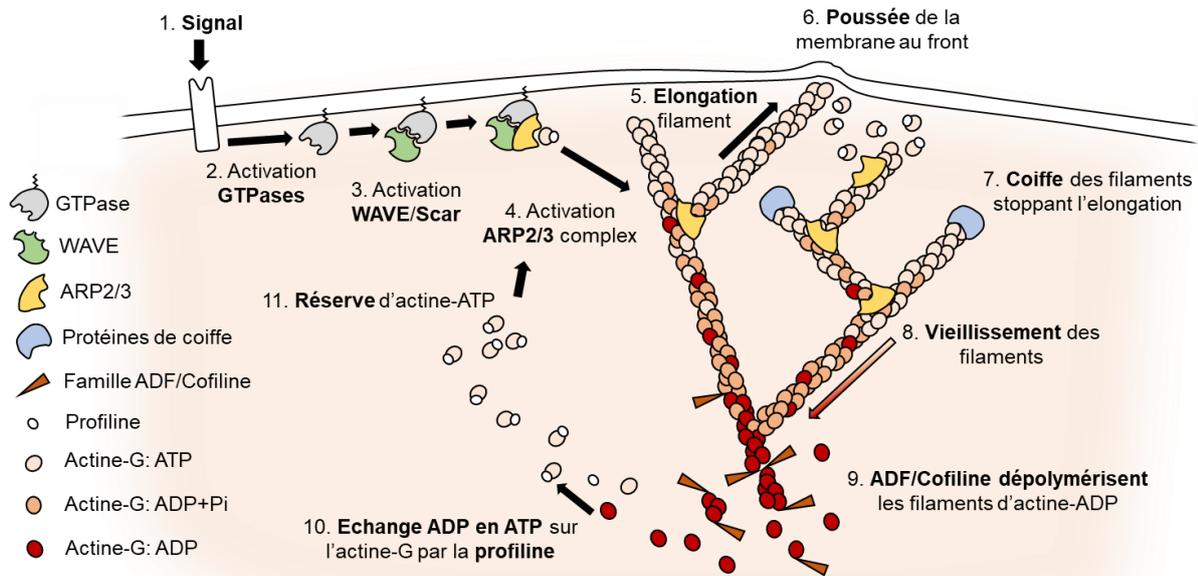


Figure 35. Modèle de nucléation dendritique du lamellipode. Cette figure a été dessinée à partir du modèle de nucléation dendritique de (Pollard, 2003). (1) Des signaux extracellulaires viennent activer des récepteurs membranaires, qui vont alors (2) activer certaines GTPases telles que Rac1 ou CDC42 (gris). (3) Les protéines de la famille WASP (Wave/Scar, vert) vont alors (4) activer le complexe ARP2/3 (jaune). (5) Le complexe ARP2/3 actif va alors se lier latéralement sur les filaments d'actine existants et initier une branche d'actine qui va croître rapidement dans la direction de l'extrémité barbée. (6) Ces filaments vont alors pousser la membrane vers l'avant. (7) Afin de terminer l'élongation des filaments, des protéines de coiffe (bleue) vont venir se lier sur les extrémités barbées. (8) Au fil de l'élongation, les monomères d'actine polymérisés vieillissent (gradient beige, jeune - rouge, vieux) et finissent par hydrolyser leur ATP en ADP. (9) Ces filaments sont rompus naturellement mais surtout vont être coupés par les protéines de coupes, notamment les protéines ADF et les cofilines. (10) La profiline va ensuite se lier aux monomères d'actine afin de catalyser l'échange de l'ADP en ATP, qui vont alors (11) former la nouvelle population de monomères prête à être utilisée pour les nouveaux filaments.

Le lamellipode est absolument essentiel dans le processus de migration, notamment en jouant sur deux paramètres : la vitesse de migration et sa persistance. Ainsi, c'est l'équilibre entre le branchage et l'élongation des filaments d'actine qui va déterminer cette vitesse et cette persistance. Le modèle actuel prévoit qu'une prépondérance de branchage va réduire la vitesse de protrusion, mais va accroître sa persistance, tandis que l'élongation des filaments, à l'inverse va favoriser la vitesse, et diminuer la persistance. Ainsi, plus le réseau d'actine branché sera dense, et moins la protrusion sera rapide (Krause and Gautreau 2014a). Cependant, comme nous allons le voir dans la partie suivante, certaines formines, comme les FMNLs, remettent ce modèle en perspective.

2. Les formines, des polymérase d'actines

2.1. La famille des formines

L'appellation « Formine » a été évoquée la première fois en 1990. Il s'agissait alors d'un locus codant pour des protéines impliquées dans la formation des membres pendant le développement (Woychik et al. 1990). Quelques années plus tard, la protéine de drosophile « Diaphanous » est identifiée, par homologie de séquence avec une des protéines codée par ce locus Formine (Castrillon and Wasserman 1994). Ces deux protéines sont désormais mieux connues sous les noms respectifs de FMN1 et DIAPH1, et font partie d'une famille de 15 protéines chez l'Homme, les formines (Schönichen and Geyer 2010).

Les formines sont de longues protéines dépassant généralement les 1000 acides aminés. Leur haut niveau d'homologie structurale laisse transparaitre leur forte conservation à travers l'évolution. Les analyses phylogénétiques ont démontré que les formines pouvaient être classées en 6 catégories : Diaphanous (DIAPH1, DIAPH2 et DIAPH3), Dishevelled-Associated Activator of Morphogenesis (DAAM1 et DAAM2), Formin-Like Protein (FMNL1, FMNL2 et FMNL3), Formin Homology Domain containing (FHOD1 et FHOD2), Inverted Formin (INF1 et INF2), Formin (FMN1 et FMN2) et Delphinin (Higgs and Peterson 2005; Schönichen and Geyer 2010).

Les fonctions des formines sont extrêmement variées. Néanmoins, elles s'organisent toutes autour d'une activité d'assemblage de structures d'actine ayant des rôles majeurs dans la réorganisation du cytosquelette. On retrouve les formines dans l'assemblage des filopodes (Schirenbeck et al. 2005; C. Yang et al. 2007; E. S. Harris et al. 2010), des lamellipodes (C. Yang et al. 2007; Block et al. 2012a; Kage, Winterhoff, et al. 2017a), des fibres de stress (Ishizaki et al. 2001; Takeya et al. 2008), de l'anneau cytokinique d'actine (Severson, Baillie, and Bowerman 2002; Ingouff et al. 2005; A. Chen et al. 2017) ou encore des réseaux d'actine nécessaires au transport vésiculaire (M. Schuh 2011; Kage, Steffen, et al. 2017) (**Figure 36**).

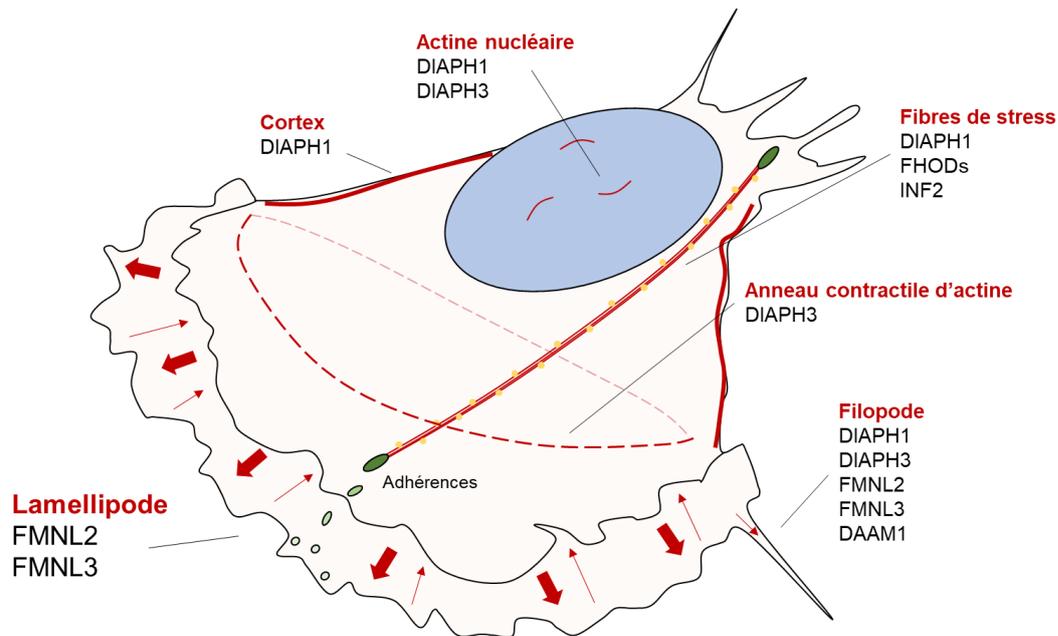


Figure 36. Fonctions cellulaires de certaines formines. Dans ce schéma est représenté différentes structures riches en actine, telles que le lamellipode, le filopode ou encore le cortex cellulaire (rouge). Les différentes formines (noire) qui ont été associées à la génération de ces structures sont énumérées en dessous. On notera en particulier le rôle des FMNL2/3 dans le lamellipode, exemple largement argumenté dans les parties suivantes.

2.2. Structure des formines et régulation

L'activité commune de polymérisation d'actine s'explique par l'existence d'un domaine commun, le domaine FH2 (« Formin Homology 2 »). Ce domaine est capable de se dimériser pour former une structure en anneau et ainsi assurer la polymérisation du filament d'actine *de novo* (nucléation) où à partir de son extrémité barbée (élongation). Il est très souvent précédé d'un domaine FH1 (« Formin Homology 2 »), riche en proline, qui permet d'attirer les dimères de profiline-actine, afin d'accélérer la polymérisation par le domaine FH2 (Courtemanche 2018).

La plupart des formines métazoaires sont des formines « diaphanous », à cause de la présence N-terminal d'un domaine FH3 (« Formin Homology 3 »), parfois accolé à un pseudo-domaine GBD (« GTPase Binding Domain »). Partie la moins conservée entre les formines, ces domaines GBD et FH3 sont impliqués dans la régulation de l'activité et la localisation des formines. Notamment, cette partie est le siège du mécanisme d'auto-inhibition des formines. Le domaine FH3 est capable d'accommoder l'extrémité la plus distale, en C-terminal, appelée le domaine DAD (« Diaphanous Autoinhibitory Domain »), afin de refermer la formine et rendre le domaine FH2 inaccessible à l'actine. C'est la liaison des formines

avec certaines GTPases au niveau du domaine GBD qui permet de repousser le domaine DAD par compétition et ainsi déclencher l'ouverture activatrice de la formine (Schönichen and Geyer 2010). Il est à noter que chaque formine a néanmoins d'importantes spécificités, et que ce schéma général d'activation, bien que didactique, ne saurait représenter fidèlement leur complexité d'activation, encore largement sous-évaluée (**Figure 37**).

Les formines non-diaphanous possèdent également différents domaines alternatifs, tels que les domaines PDZ (« Postsynaptic density protein 95/Drosophila disc large tumor suppressor 1/Zonula occludens-1 protein »), PTEN (« Phosphatase and TENsin ») ou encore PH (« Pleckstrin Homology »), qui vont réguler leur localisation ou leur activité (Pruyne 2016).

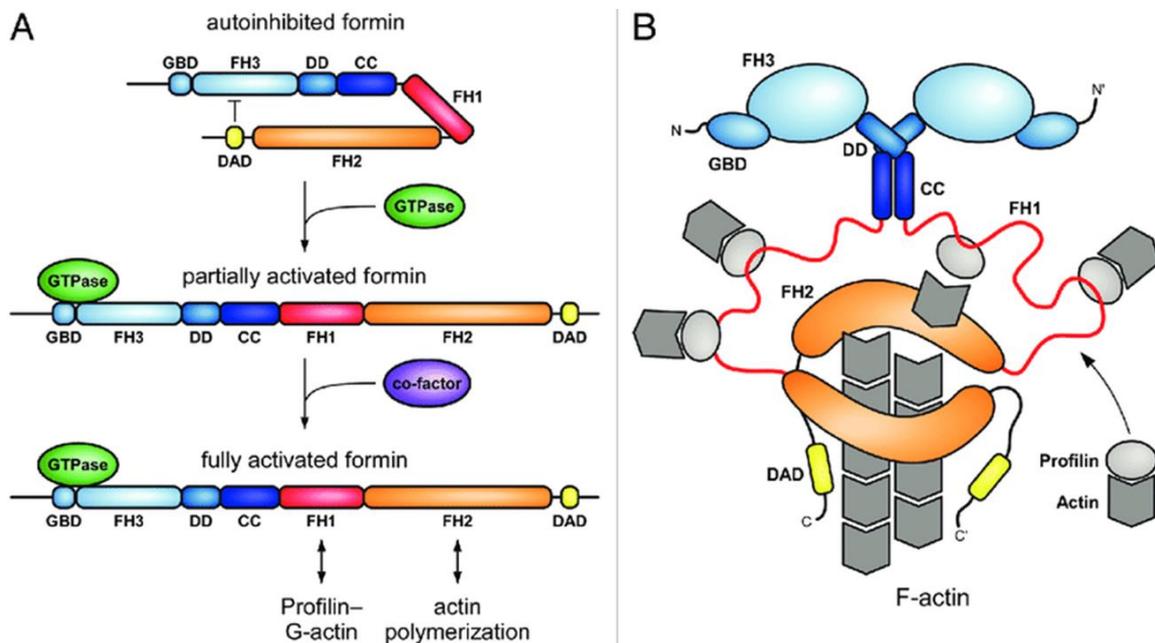


Figure 37. Schéma d'activation des formines. Cette figure est tirée de (Kuhn et Geyer, 2014). (A) Dans la conformation auto-inhibée, le domaine C-terminal DAD interagit avec le FH3. La liaison d'une Rho-GTPase liée au GTP entraîne le détachement de ce DAD par compétition et l'ouverture de la formine. (B) Schéma d'un dimère de formines actif. Le domaine FH1 recrute les complexes d'actine-profiline à proximité du FH2, afin de permettre la polymérisation en F-actine par ce domaine FH2.

2.3. Mécanismes de la polymérisation d'actine par les formines

Lorsqu'elles sont activées par les GTPases, les formines peuvent se dimériser afin de former un anneau avec leurs domaines FH2, véritable assemblage moléculaire permettant la polymérisation d'actine. Les formines peuvent jouer d'une part le rôle de « nucléateur »,

initiant les filaments (Pring et al. 2003), et d'autre part « d'élongateur », en se fixant à l'extrémité barbée du filament d'actine pour moduler en la vitesse de polymérisation (Romero et al. 2004).

Les modalités de nucléation et d'élongation par les formines sont des processus très complexes. De manière générale, la nucléation par les formines est due aux phénomènes de stabilisation des dimères d'actine. En effet, en condition physiologiques, la formation de ces dimères et trimères est extrêmement défavorable. Ainsi, le domaine FH2, avec l'aide du domaine FH1, va stabiliser ces dimères, en attendant l'adjonction d'un troisième monomère, synonyme du début de l'élongation (Sagot et al. 2002; Pring et al. 2003; A. Paul and Pollard 2008; Baker et al. 2015).

De son côté, l'élongation processive des filaments par les formines se fait selon une remarquable dynamique. Tout d'abord, il est important de noter que les domaines FH2 vont, à eux seuls, ralentir l'assemblage du filament d'actine (Thomas D. Pollard 2016). Les domaines FH2 de chaque formine se verront donc attribuer un score (« gating factor »), proportionnel à leur capacité à ralentir l'élongation du filament par rapport à sa polymérisation spontanée. Par exemple, le FH2 de la formine DIAPH1 ne diminue que de 5% la vitesse d'élongation, quand d'autres FH2, comme celui de DIAPH2, iront jusqu'à 90% de ralentissement. C'est au domaine FH1 que l'on doit la rapidité de l'élongation. Les répétitions poly-prolines du FH1 vont recruter des dimères d'actine/profiline (à l'image des pièges à mouche collant) afin d'en accroître la concentration locale autour du FH2 et de l'extrémité barbée du filament. Cette concentration locale va supplanter celle observée dans le cas d'une polymérisation spontanée du filament, et ainsi augmenter la vitesse d'élongation (Kovar et al. 2006; A. Paul and Pollard 2008).

En réalité, c'est le domaine FH2 qui va être responsable de la processivité de cette élongation et faire des formines de véritables polymérase. Les formines sont en effet fixées à l'extrémité barbée du filament qu'elles polymérisent via ce domaine FH2, et persistent parfois sur de très longues distances. Par ailleurs, le fait de rester à l'extrémité de ce filament permet d'empêcher la fixation des protéines de coiffe, qui arrêteraient toute polymérisation subséquente (Higashida et al. 2004; Breitsprecher et al. 2012; Shekhar et al. 2015). Les mécanismes inhérents à cette processivité ont été décrit selon deux modèles séquentiels. Ces modèles reposent sur la dynamique conformationnelle de l'anneau formé par les domaines FH2 : cet anneau, va « glisser » vers l'extrémité barbée, à chaque ajout d'un nouveau monomère (Courtemanche 2018). Les paramètres mécanistiques de ce mouvement moléculaire, bien que passionnants, dépassent le cadre de cette thèse et ne seront donc pas abordés dans ce manuscrit.

3. Les FMNLs, des acteurs de la plasticité migratoire

3.1. Structure et activité polymérase des FMNLs

La sous-famille des FMNLs (« Formin Like proteins ») est répertoriée en 2000 avec l'identification de FMNL1, alors nommé FRL (« *Formin*-Related gene in Leukocytes ») en rapport avec son rôle régulateur de la motilité des macrophages (Yayoshi-Yamamoto, Taniuchi, and Watanabe 2000). L'existence de FMNL2 et FMNL3 est par la suite inférée par homologie de séquence avec FMNL1 (Katoh and Katoh 2003a). Si ces protéines présentent en effet une importante homologie, elles possèdent pour autant clairement des fonctions propres. Par exemple, l'inactivation génétique de FMNL1 est létale et non compensée par les autres FMNLs chez la souris, au même titre que FMNL chez la drosophile, seul homologue de l'espèce (M. R. Miller, Miller, and Blystone 2017; Dehapiot et al. 2020). On note cependant une plus grande redondance fonctionnelle entre FMNL2 et FMNL3 qu'avec FMNL1 (Kage, Winterhoff, et al. 2017a), comme en atteste la plus grande distance évolutive entre FMNL2/3 et FMNL1 qu'entre FMNL2 et FMNL3 (Schönichen and Geyer 2010).

Les domaines des FMNLs sont typiques de la famille des formines « Diaphanous », comme présentées dans la partie précédente. La conformation de ces domaines est bien déterminée puisque les structures des domaines GBD-FH3 ont été résolues pour FMNL1 et FMNL2, et celle du domaine FH2 a été résolue pour FMNL3. Ainsi, différentes modélisations ont permis de reconstituer la structure globale de ces FMNLs, notamment au cours de leur activité de polymérisation d'actine (Thompson et al. 2013; Kühn et al. 2015a). En annexe, vous trouverez un travail impliquant les premières tentatives de cristallographie du domaine régulateur FMNL3, non résolu à ce jour, en complexe avec la protéine BCAR3 méthylé (un nouveau substrat de SMYD2), qui a été effectué au cours de ma thèse.

Le domaine N-terminal régulateur, ou domaine GBD-FH3, est constitué de 5 répétitions de type Armadillo (« Armadillo-repeats ») qui vont s'organiser en 5 longues hélices pour former une large surface concave. Ce domaine GBD-FH3 est suivi d'une région en solénoïde (« coiled-coil »), particulièrement importante dans les processus de dimérisation des formines. Elle est également importante pour assurer la flexibilité topologique entre les parties N-terminales, régulatrices, et les régions C-terminales, à la fois responsables de la polymérisation d'actine et de l'auto-inhibition par repliement conformationnel (Kühn et al. 2015a) (**Figure 38**).

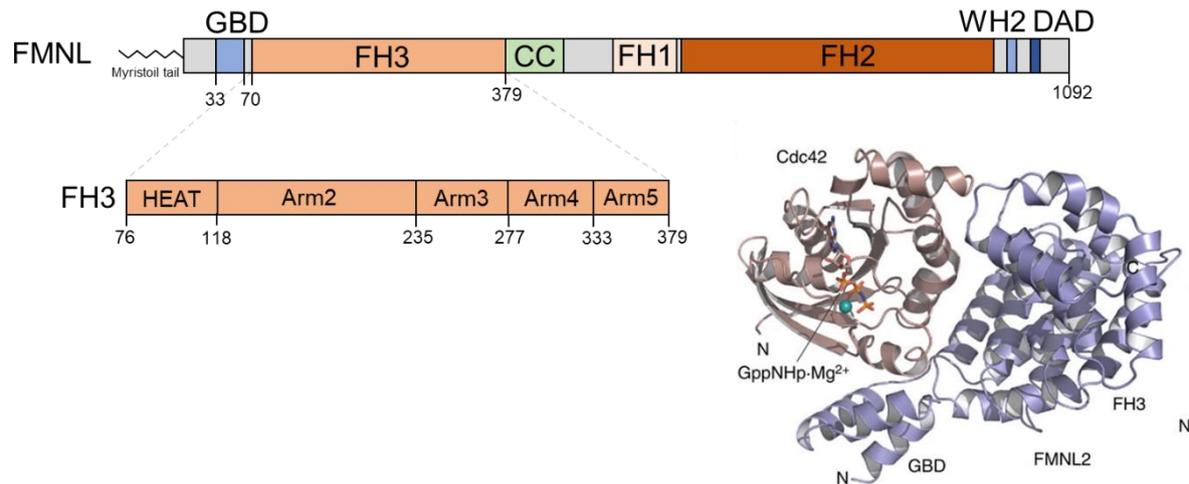


Figure 38. Schéma des domaines des FMNLs, et structure du GBD-FH3 de FMNL2. Ici est représenté les différents domaines composant les formines FMNLs. En particulier, on retrouve l'organisation du domaine FH3 en répétition Armadillo, initiée par une répétition HEAT, structurellement semblable au répétition Armadillo. Enfin, la structure du complexe FMNL2/CDC42-GTP, issue de (Kage et al. 2015), est représentée.

Vient ensuite les domaines de régulation de la polymérisation d'actine, FH1-FH2. Les modalités de polymérisation d'actine engagées par les FMNLs sont sensiblement différentes. Tandis que FMNL2 serait plus processive dans l'élongation des filaments d'actine, FMNL3 serait davantage efficace dans les processus de nucléation, bien qu'il soit reconnu que le domaine FH2 des FMNLs est en lui-même peu nucléateur (Kage, Winterhoff, et al. 2017a). Cette différence pourrait notamment s'expliquer par les propriétés du petit motif WH2 de FMNL3, qui favoriserait la liaison avec l'actine monomérique, et donc la nucléation (Thompson et al. 2013). D'autre part, le nombre important de régions poly-proline du domaine FH1 de FMNL2 nous renseigne sur sa forte avidité pour les dimères de profiline-actine, expliquant potentiellement sa plus grande vitesse à allonger les filaments d'actine. Dans le cas de FMNL1, aucune analyse comparative avec ces homologues n'a été effectuée, mais son activité polymérase aussi bien nucléatrice qu'élongatrice a été formellement démontrée (Seth, Otomo, and Rosen 2006).

Enfin, le domaine C-terminal DAD va être essentiel pour réguler la conformation fermée, inactive, ou bien ouverte, active, des FMNLs. La séquence consensus de ce DAD est connue, mais peu conservée chez les FMNLs. Pourtant, toutes sont capables d'auto-inhibition (Seth, Otomo, and Rosen 2006; Block et al. 2012a; Kühn et al. 2015a; Kage, Winterhoff, et al. 2017a).

3.2. Localisation et activation des FMNLs

La localisation des FMNLs a été bien décrite et semble diverger, entre d'une part FMNL1, enrichie dans les podosomes des macrophages, et récemment à la surface de gouttelettes lipidiques cellulaires (Mersich et al. 2010; Pfisterer et al. 2017), et FMNL2/FMNL3, présentes notamment au niveau des filopodes et lamellipodes (Kage, Winterhoff, et al. 2017a). Ces différentes localisations expliquent en partie la diversité fonctionnelle des FMNLs. Par exemple, à l'inverse de FMNL2 et FMNL3 (Kage, Winterhoff, et al. 2017a), la protéine FMNL1 est incapable de générer des filopodes (E. S. Harris et al. 2010)

Le premier argument topologique de la localisation des FMNLs est leur présence au niveau des membranes cellulaires. De façon co-translationnelle, les FMNLs vont être modifiées par myristoylation N-terminale, au niveau d'une glycine strictement conservée (Han et al. 2009; Block et al. 2012a). Cette glycine est d'ailleurs exclusive aux FMNLs, indiquant que ce niveau de régulation est probablement une spécificité de cette sous-famille de formine. Le second argument topologique est ensuite leur affinité pour des GTPases activées, également situées à la membrane plasmique par acylation. Ces GTPases pourraient ainsi guider la localisation des FMNLs vers des structures subcellulaires précises, à l'instar des filopodes, des lamellipodes, du Golgi ou encore de podosomes, pour les ouvrir et ainsi les activer (Seth, Otomo, and Rosen 2006; Kitzing et al. 2010; Block et al. 2012a; Kühn et al. 2015a; Ying Wang et al. 2015; Kage, Winterhoff, et al. 2017a; Grobe et al. 2018; Y.-F. Zeng et al. 2018).

Initialement mise en doute pour FMNL2 (Vaillant et al. 2008), les preuves indiquant que l'activation des FMNLs soient régulées par des mécanismes d'auto-inhibition s'accumulent. De plus, il semblerait que ces mécanismes soient similaires entre les FMNLs. En effet, toutes les FMNLs peuvent interagir avec la Rho-GTPase Cdc42-GTP, activée, afin de promouvoir leur conformation ouverte, active au niveau de la membrane plasmique des protrusions (Seth, Otomo, and Rosen 2006; Block et al. 2012a; Wakayama et al. 2015; Kage, Winterhoff, et al. 2017a). Certaines signalétiques ont même été décrites de façon plus complète. Dans le cas de FMNL3, la GEF ARGEF9b peut venir échanger le GDP en GTP sur Cdc42, et induire l'activation subséquente de la formine (Wakayama et al. 2015).

3.3. Les FMNLs dans le lamellipode et la migration

Le rôle des FMNLs dans le lamellipode, et plus particulièrement de FMNL2 et FMNL3, a fait l'objet d'une attention toute particulière au cours de ma thèse. Cette attention est venue notamment de l'analyse phénotypique et moléculaire des fonctions de la méthylation de BCAR3, liant clairement cette modification post-traductionnelle à une altération des propriétés du lamellipode. L'idée sera ici d'apporter une brève introduction à la question suivante, précise j'en conviens : quel rôle joue les FMNLs dans le lamellipode ?

Tout d'abord, les structures des complexes entre FMNL1 et CDC42-GTP ainsi que FMNL2 et Cdc42-GTP ont été résolues par cristallographie et ont permis de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents. Excluant catégoriquement une interaction avec Rac1, une autre GTPase, les équipes de Klemens Rottner et Matthias Geyer démontrent que l'interaction avec CDC42 mobilise l'ensemble des répétitions Armadillo qui composent le domaine GBD-FH3. Par ailleurs, ils attribuent la sélectivité des FMNLs à CDC42 à une petite hélice, située à la surface de CDC42, mais absente des autres Rho-GTPases. Ces complexes s'assembleraient alors à la membrane plasmique en larges plateformes multimériques capables de générer une force basée sur la polymérisation d'actine, participant à la protrusion membranaire (Block et al. 2012a; Kühn et al. 2015a).

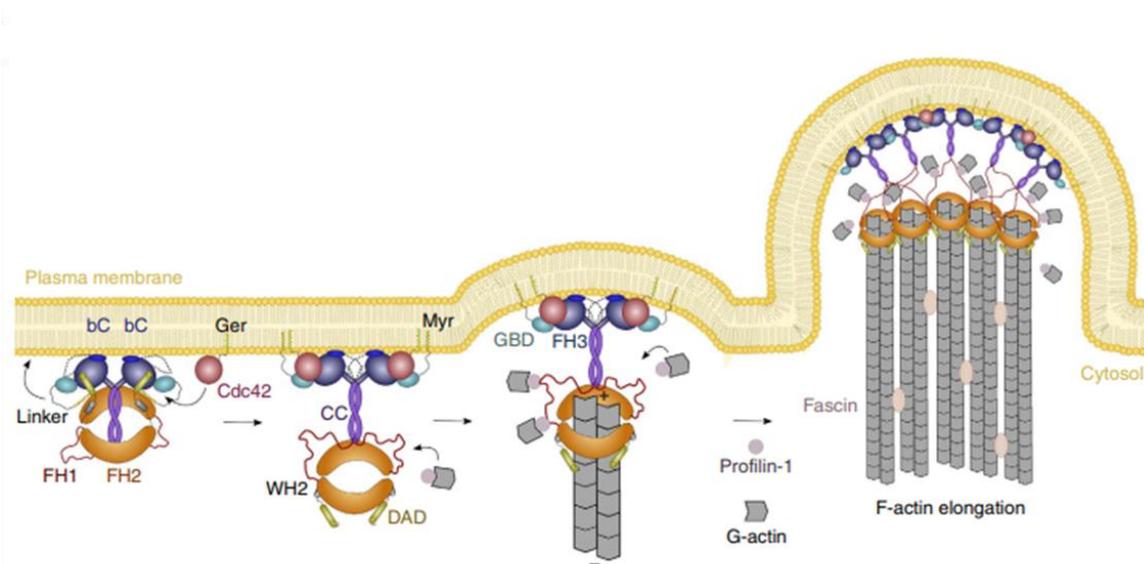


Figure 39. Modèle de la fonction de FMNL2/3 dans le lamellipode. Figure tirée de (Kühn et al., 2015). Est représenté l'activation séquentielle des FMNLs par CDC42-GTP à la membrane. Dans ce modèle, les FMNLs activées sont capables de s'accumuler aux extrémités des lamellipodes (et filopodes) afin de soutenir la protrusion membranaire par polymérisation d'actine.

A la suite de cela, les auteurs publient un élégant modèle décrivant les fonctions de FMNL2 et FMNL3 dans le lamellipode. Ils démontrent que FMNL2/3 sont capables de polymériser une population de filaments d'actine additionnels, distribués de façon orthogonale à la membrane plasmique. Ces filaments seraient ainsi capables de générer une force supplémentaire, venant contrer les forces de pression appliquées par le microenvironnement cellulaire. Ainsi, il en découle une protrusion et une migration plus rapide, et ce notamment dans des environnement plus rigides (Kage, Winterhoff, et al. 2017a). Cette génération de force au front de migration pourrait s'avérer grandement utile lors des processus de migration à travers les matrice tumorales, fréquemment p lus rigides (**Figure 39**).

3.4. Les FMNLs dans les cancers : des agents pro-métastatiques

Au cours des cinq dernières années, un nombre importants d'études ont observé que les FMNLs, et plus particulièrement FMNL2, étaient régulés par des micro-ARN (miRNA, abr. MiR) dans différents cancers. Dans tous les cas, l'extinction de ces miRNA était retrouvée dans les cancers et aboutissait à une surexpression des FMNLs. Notamment l'extinction des MiR-137 (L. Liang et al. 2013), MiR-34a (G. Lu et al. 2015), MiR-206 (Ren et al. 2016; Shao et al. 2019), MiR-22 (L. Shi et al. 2019), MiR-1207 (Yan, Su, and Qin 2020) sont impliqués dans la surexpression de FMNL2 dans les cancer colorectaux et le mélanome. La perte des MiR-127 (X. Gao et al. 2016) et MiR-6795 (W. Wang et al. 2021) est responsable de la surexpression de FMNL3 dans les cancer de l'œsophage malpighien et le carcinome hépatocellulaire respectivement. Enfin, l'augmentation de FMNL1 a été liée à l'extinction du MiR-143 dans le cancer nasopharyngé (Cui et al. 2019).

Ainsi, l'expression des FMNLs est souvent fortement augmentée dans les cancers, et plus particulièrement associée à des phénomènes de dissémination métastatique. Notamment, des niveaux élevés de FMNL2 ont été largement impliqués à des phénomènes de migration et d'invasion cellulaire, et à la formation de métastases des cancer colorectaux et des mélanomes (X.-L. Zhu, Liang, and Ding 2008; Y. Li et al. 2010; X.-L. Zhu et al. 2011; G. Lu et al. 2015; Gardberg et al. 2016; S. S. Yang et al. 2017; Yan, Su, and Qin 2020). FMNL3 a été également impliqué dans des processus de migration et de prolifération menant aux métastases de mélanome, de carcinomes malpighiens oraux et de carcinomes hépatocellulaires (Gardberg et al. 2016; Y. Wu et al. 2017; Jiameng Liu et al. 2019). FMNL1 a été lié à la migration et à la prolifération des cellules leucémiques et de glioblastome, ainsi qu'aux métastases des cancers nasopharyngé, des cancers du poumon non à petites cellules et des carcinomes rénaux (Favaro et al. 2013; W.-H. Chen et al. 2018; X.-Y. Yang,

Liao, and Xue 2019; M.-F. Zhang et al. 2020). Par ailleurs, FMNL3 a également été impliqué dans des phénomènes d'angiogenèse, et donc pouvant potentiellement jouer un rôle au cours de la tumorigénèse (Hetheridge et al. 2012).

Les FMNLs semblent donc largement impliquées dans des processus pro-métastatiques. Il est particulièrement intéressant de noter que les FMNLs sont capables de promouvoir différents types de protrusions, différents modes de migration, et également capable de coupler ces facultés motiles à des processus invasifs complets. En effet, comme décrit dans la partie précédente, FMNL2 et FMNL3 participent à la formation des filopodes et des lamellipodes (E. S. Harris et al. 2010; Block et al. 2012a; Kage, Winterhoff, et al. 2017a; Dimchev et al. 2021), et FMNL1 a été également lié à la formation de blebs (Han et al. 2009). Des formations d'actine liées à l'invasion cellulaire, de type podosomes et invadopodes ont également été décrites comme étant largement stimulées par respectivement FMNL1 et FMNL2 (Mersich et al. 2010; Ren et al. 2018). Enfin, le rôle des FMNLs a été lié à de modes de migration de types mésenchymateux, notamment via une promotion de l'EMT (Kitzing et al. 2010; Y. Li et al. 2010; Y. Wu et al. 2017; L. Shi et al. 2019), ou encore amiboïde, en aval de l'activation de FMNL2 par PKC ou RhoC et de l'internalisation des intégrines (Kitzing et al. 2010; Ying Wang et al. 2015). Enfin de récents travaux montrent l'implication des FMNLs dans des processus de migration collective via sa relocalisation corticale, au niveau des protrusions (Katsuno-Kambe et al. 2021). Les FMNLs joueraient donc un rôle prépondérant dans cette plasticité de la migration observée au cours de la cascade métastatique. Ainsi, si l'absence de rôle direct dans la stimulation du cycle cellulaire empêche de les qualifier d'oncogènes stricts, un nombre grandissant de preuves les assimileraient à des gènes pro-métastatiques.

Résumé

La diversité des **architectures** façonnées par le **cytosquelette d'actine** des cellules est remarquable. A la base de ce cytosquelette se trouve le **monomère d'actine**, qui se polymérise en **filament**, selon des cinétiques extrêmement bien caractérisées.

Le **lamellipode** fait partie de ces édifices. Situé **au front** des cellules en migration, il est constitué d'un réseau d'actine **arborescent**. Il est régulé selon un **modèle dendritique**, ou le complexe **ARP2/3** joue un rôle pivot dans le **branchage** des filaments d'actine.

Au sein du lamellipode, une autre famille de protéines joue un rôle essentiel dans la dynamique du cytosquelette d'actine : les **formines**. Les formines sont capables de processus de **nucléation**, c'est-à-dire la génération de nouveaux filaments d'actine, et **d'élongation processive**, c'est-à-dire l'élongation de filaments préexistants, en restant à leurs extrémités.

Parmi les formines **Diaphanous**, on retrouve une sous-famille, les FMNLs : **FMNL1, FMNL2 et FMNL3**. Ces différentes formines possèdent des **fonctions propres** et sont toutes capables de **polymériser des filaments d'actine**.

Les FMNLs sont toutes **ancrées aux membranes** cellulaires *via* des processus de **myristoylation** co-translationnels. Elles sont toutes **régulées par des GTPases**, en particulier **Cdc42**, afin d'activer leur fonction **polymérase d'actine**.

Plus spécifiquement dans le **lamellipode**, **FMNL2** et **FMNL3** sont capables d'actions **synergiques** afin de polymériser des filaments d'actine participant à la **vitesse de protrusion** et à la **résistance mécanique** du lamellipode. Cela participe directement à **l'augmentation de la vitesse de migration mésenchymateuse**.

Dans les **cancers** les FMNLs sont fréquemment **surexprimées**, notamment par déplétion de micro-ARN régulateurs. Leurs fonctions semblent converger vers une **promotion de la plasticité de la migration**, afin d'alimenter des phénomènes de **dissémination métastatique**.

VI. Objectifs de thèse

L'objectif principal de ma thèse fut de comprendre quel rôle SMYD2 pouvait avoir au cours de la tumorigénèse mammaire. Comme évoqué au cours de l'introduction, la signalisation par méthylation des lysines représente un ensemble d'événement moléculaire modifiant profondément la fonction des protéines. Ces modifications, lorsqu' anormalement orchestrées, sont à l'origine de nombreuses pathologies, dont les cancers. En tant que méthyltransférase, SMYD2 est un acteur de premier rang de cette signalisation, et bien que semblant dispensable à l'homéostasie cellulaire, il est retrouvé amplifié dans près de 30% des cancers du sein. De plus, certaines études ont évoqué un rôle potentiel de SMYD2 dans les cellules tumorales mammaires. Ces arguments font donc de SMYD2 une cible potentielle particulièrement attractive dans cette pathologie.

Au cours de cette thèse, les objectifs spécifiques ont été :

- (1) Evaluer l'implication oncogénique de SMYD2 dans le cancer du sein et comprendre au cours de quelles **étapes de la tumorigénèse mammaire** SMYD2 pourrait participer.
- (2) Identifier des **substrats** susceptibles d'être méthylés par SMYD2 et cibler le substrat le plus prometteur pour expliquer le rôle oncogénique de SMYD2 dans le cancer du sein.
- (3) Elucider le **phénotype cellulaire** et le **mécanisme moléculaire** sous-jacent à cet événement de méthylation.
- (4) Si un rôle est identifié, proposer une preuve de concept de l'intérêt de **l'inhibition pharmacologique de SMYD2** dans le traitement et/ou la prévention du cancer du sein.

VII. Résultats

Les résultats présentés dans cette partie sont ceux relatifs à la publication en cours de soumission. Vous trouverez un résumé en français, afin de synthétiser les principales découvertes de ce travail. D'autres résultats sont disponibles également en Annexe 1, mais viendront plutôt alimenter les perspectives de ce travail. En annexe 2, 3 et 4 vous est présenté les différents travaux collaboratifs auxquels j'ai pu participer, toujours en lien avec la méthylation des lysines des protéines non-histones.

SMYD2 drives breast cancer metastasis through BCAR3 methylation

Alexandre G. Casanova¹, Simone Hausmann², Gael S. Roth^{1,3}, Ana Morales Benitez², Ekaterina Bourova-Flin¹, Lucid Belmudes⁴, Marcello Caporicci², Jessica Vayr¹, Natasha M. Flores², Francesco Ielasi¹, Xiaojie Yang², Jibo Wu², Sophie Rousseaux¹, Pierre Hainaut¹, Or Gozani⁵, Yohann Couté⁴, Andres Palencia¹, Pawel K. Mazur². * and Nicolas Reynoird¹. *, #

¹ Institute for Advanced Biosciences, Grenoble Alpes University, CNRS UMR 5309, INSERM U1209, Grenoble, France

² Department of Experimental Radiation Oncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA

³ Clinique universitaire d'Hépatogastroentérologie et Oncologie digestive, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France

⁴ Grenoble Alpes University, CEA, INSERM, UMR BioSanté U1292, CNRS CEA FR2048, Grenoble, France

⁵ Department of Biology, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA

* Corresponding authors: Nicolas Reynoird (Nicolas.reynoird@univ-grenoble-alpes.fr); Pawel K. Mazur (PKMazur@mdanderson.org)

Lead contact: Nicolas Reynoird (Nicolas.reynoird@univ-grenoble-alpes.fr)

SUMMARY

Improved therapy has greatly ameliorated breast cancer patient's survival, but malignant breast cancer refractory or becoming resistant to existing therapies remains a major issue due to metastatic spreading. Here, we show that the lysine methyltransferase SMYD2 drives breast cancer metastases, and that its repression in transgenic mouse models prevents metastases formation. We identify BCAR3 as a genuine substrate of SMYD2 in breast cancer cells, and show that loss of BCAR3 methylation impairs aggressive breast cancer cells' migration and invasiveness. Mechanistically, we find that methylated BCAR3 interacts with the actin cytoskeleton regulators FMNLs proteins. Notably, BCAR3 methylation recruits FMNLs to lamellipodia and is required for proper lamellipodia fitness. Breast cancer cells in which BCAR3 methylation is impeded fail to spread or to promote tumors in mouse. Finally, we demonstrate the therapeutic value of targeting SMYD2-BCAR3 lysine methylation signaling in breast cancer, by showing that SMYD2 genetic and pharmacologic inhibition alters lamellipodia strength, impairs breast cancer cells invasiveness, and limits xenografts development.

KEYWORDS

SMYD2, Breast cancer, metastasis, BCAR3, FMNL3, Lamellipodia

INTRODUCTION

Breast cancer is the most commonly occurring cancer in women and the second most common cancer overall. Most breast cancers are heterogenous and invasive, with different subtypes existing bearing different prognosis values, such as Luminal-like A & B (ER⁺ +/- PR⁺, for estrogen receptors positive and plus or minus progesterone receptors positive), HER2+ (overexpression of Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) and the highly aggressive basal-like and claudin-low subtypes, frequently assimilated to triple-negative breast cancers (TNBC) (negative for ER, PR and HER2) (Harbeck et al., 2019). In the past decade, a great preventive effort and hormone-based targeted therapy against steroid receptors significantly improved patients care and survival. However, initially responsive breast cancers frequently relapse. Moreover, aggressive breast cancer subtypes have limited treatment options and grow and spread faster than other breast cancers, with high susceptibility to recurrence and to distant metastases development (Bertucci et al., 2012). Ultimately, metastatic spreading is the leading cause of breast cancer-related deaths (Cao et al., 2021; Harbeck et al., 2019). The multi-step metastatic cascade involves a reprogramming of cancer cells to a motile phenotype for invading surrounding tissues (Lambert et al., 2017). However, molecular determinants of this reprogramming remain unclear and identifying key molecular targets is an urgent need toward the control of malignant breast cancer progression (Clark and Vignjevic, 2015; Paul et al., 2017). Therefore, it is extremely important to gain better insights on druggable molecular pathways regulating metastasis formation in breast cancer.

Development of many cancers is under the epigenetic control of gene expression and the modulation of cell signaling pathways through post-translational modifications (PTMs) of proteins such as histones (Hitosugi and Chen, 2014; McCabe et al., 2017). Indeed, actors of these PTMs are often altered in human pathologies, thereby leading to aberrant oncogenic signaling (Kudithipudi and Jeltsch, 2014). Among the vast list of PTMs, the covalent addition of a simple methyl moiety on lysine residues can have broad but highly specific regulatory effects on cellular processes. Protein lysine methylation signaling is a dynamic and

reversible PTM, catalyzed by lysine methyltransferases. The most studied and well-characterized function of lysine methylation to date is its contribution to chromatin regulation by participating to the PTM patterns on histones and the regulation of genes expression. However, histones are not the only substrates of lysine methyltransferases and there is growing evidence of non-histone proteins methylation events with clear impact in physiopathology (Mazur et al., 2014; Hamamoto et al., 2015; Lukinović et al., 2020). Despite the critical role of lysine methylation in biology, relatively few methylated proteins have been identified and the comprehensive functions of lysine methylation signaling rarely characterized.

Interestingly, PTMs, and more particularly lysine methylation signaling, have already been involved in breast cancer progression. For example, lysine methyltransferase NSD2 participates in angiogenesis through STAT3 methylation (Song et al., 2021) and SMYD3 promotes the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer (Fenizia et al., 2019). Several lysine demethylases (KDMs) have also been linked to breast cancer progression, and for example LSD1 and UTX inhibitions increase breast cancer sensitivity to anti-tumor drugs (Benedetti et al., 2019; Qin et al., 2019). Altogether, targeting lysine methylation signaling in breast cancer may prove to be an interesting therapeutic approach (Heo, 2019; Oh et al., 2017).

A particular effort has recently been made to develop KMTs and KDMs inhibitors with hope for future epigenetic therapy (McGrath and Trojer, 2015; Morera et al., 2016). Indeed, thanks to KMTs' specific and dynamic signaling, a better understanding of their functions in lysine methylation regulation will provide new therapeutic opportunities. Because of the multiple escape pathways that cancers develop to resist antitumoral treatments, combination of cytotoxic chemotherapies with one or several targeted therapies is often required and new combinations with lysine methylation signaling inhibitors might prove beneficial. For example, we previously observed in mouse xenografts of human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) that pharmacological inhibition of SMYD2 by the compound BAY-

598 significantly reduces cancer growth when combined with standard chemotherapy (Reynoird et al., 2016).

The lysine methyltransferase SMYD2 (SET and MYND Domain Containing 2) is overexpressed in various cancers, and several studies link SMYD2 to cancer cell proliferation and tumorigenesis (Li et al., 2018; Yi et al., 2019; Zeng et al., 2019). SMYD2 is notably overexpressed in breast cancer, particularly in TBNC, where it has been correlated with a poor prognosis and reduced short-term survival (Li et al., 2018). However, SMYD2 oncogenic functions in different biological contexts remain unclear. Its activity has been linked to the regulation of gene expression but evidence of physiologic histone methylation by SMYD2 is lacking, suggesting that SMYD2 may indirectly regulate genes expression or may alternatively act on specific non-translational cellular processes.

In this study, we show that SMYD2 signaling is a promising target for metastasis prevention in breast cancer. Using genetically engineered mouse model, we find that SMYD2 does not participate in breast cancer primary tumor progression, but rather affects metastatic spreading. While there is a growing number of identified substrates methylated by SMYD2, *in vivo* function of SMYD2 during tumorigenesis remains unclear. Moreover, none of the previously described SMYD2 substrates can explain the potential impact of SMYD2 in breast cancer metastasis (Li et al., 2018; Liu et al., 2015; Zeng et al., 2019), and it is likely that SMYD2 regulates several independent oncogenic signaling that still need to be identified (Yi et al., 2019). Here, we provide the first evidence of SMYD2 molecular signature that drives breast cancer metastasis, identifying BCAR3 (Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 3) as a genuine SMYD2 substrate. BCAR3 belongs to the NSP (novel SH2-containing protein) family, that acts as specific interactors and regulators of CAS (CRK-associated substrate) family of scaffold proteins (Wallez et al., 2012). Notably, BCAR3 is frequently associated with p130/Cas, also known as BCAR1 (Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 1), and the BCAR3-BCAR1 complex is linked to aggressive breast cancer cell lines, promoting survival, migration and invasiveness (Makkinje et al., 2009, 2012). Interestingly, BCAR3 has also

been linked to cell motility through actin cytoskeleton remodeling and adhesion turnover in invasive breast cancer cells (Cross et al., 2016; Vanden Borre et al., 2011; Wilson et al., 2013). In this study, we show that methylated BCAR3 acts as a docking site for a new family of methyl-binding proteins, the Formin-Like proteins (FMNLs; Breitsprecher and Goode, 2013). This interaction allows FMNLs to be recruited in lamellipodia, a crucial cell structure for cancer cell migration, where they elicit a synergic actin polymerization activity to boost cell migration and invasion (Block et al., 2012; Kage et al., 2017; Krause and Gautreau, 2014). Interestingly, FMNLs have already been linked to cancer metastatic progression (Zeng et al., 2015), but their mechanism of regulation remained elusive to date (Kühn and Geyer, 2014).

We therefore propose a direct implication of SMYD2 in breast cancer metastasis through a BCAR3-FMNLs signaling, and our discovery calls for further investigation to attest the clinical value to inhibit SMYD2 to prevent breast cancer metastatic burden.

RESULTS

SMYD2 is critical for breast cancer metastatic spreading.

SMYD2 is amplified in breast cancer and has been shown to be overexpressed in late tumor grades to promote breast cancer cell proliferation and migration (Li et al., 2018; Liu et al., 2015; Zeng et al., 2019). Because of SMYD2 implication in various cancer progression and studies linking the methyltransferase to breast cancer *in vitro*, we decided to explore SMYD2 potential oncogenic signaling in aggressive breast cancer *in vivo*. We developed a genetic MMTV-PyMT breast cancer mouse model with a conditional *Smyd2* knock-out. In the context of MMTV-PyMT (*PyMT*), *Smyd2* was specifically deleted in mouse mammary epithelium (*PyMT;Smyd2*) (**Figure 1A**). To our surprise, we only observed minor tumor progression differences upon SMYD2 ablation between *PyMT* and *PyMT;Smyd2* mice (**Figure 1B-C**). Furthermore, histological analyses confirmed the absence of proliferation and apoptosis variations between the two models (**Figures 1D-F** and **S1A**). However, while tumor initiation and progression were comparable as demonstrated by tumor-free survival analysis (**Figure S1B**), we found a significant difference in mouse survival, as mice lacking SMYD2 outlived their counterpart by 12.5% (**Figure 1G**).

One of the main etiologic factors for breast cancer lethality is the presence of metastases. Therefore, we reasoned that the survival differences observed in our mouse models without a clear primary tumor growth variation upon SMYD2 depletion may be due to metastatic development. Bioinformatic analyses of breast cancer samples from publicly available RNA-seq dataset TCGA-BRCA did not show a significant increase of SMYD2 expression based on aggressiveness of breast cancer (**Figure S1C**). Interestingly, while the expression of SMYD2 was not associated with disease-free survival in non-metastatic breast cancer (**Figure S1D**), SMYD2 high expression was significantly associated with a shorter disease-free survival probability in metastatic breast cancer (**Figure 1H**). Altogether, these observations suggested

that SMYD2 might regulates metastatic spreading rather than primary tumor progression, and we decided to seek for metastases in our genetic mouse models. We found that tumors without SMYD2 almost totally failed to metastasize, as *PyMT;Smyd2* mice developed significantly fewer and smaller lung metastatic nodules than *PyMT* mice (**Figure 1I-L**). This was a remarkable feature as *PyMT* mouse model is well known for its propensity to develop extensive lung metastasis (Attalla et al., 2021).

These results pointed out that SMYD2's contribution to breast cancer progression is related to the capacity of cancer cells to metastasize.

SMYD2 methylates BCAR3 in breast cancer cells.

While SMYD2 has already several substrates characterized to date, none can possibly be directly linked to SMYD2 pro-metastatic phenotypes observed during breast cancer progression. We sought to identify the relevant signaling that could explain SMYD2 activity in breast cancer metastasis, using SILAC 3xMBT pulldown (Carlson et al., 2014; Moore et al., 2013). Here, we performed a methylation assay by incubating labelled HeLa cell extracts with either recombinant active SMYD2 or catalytic dead SMYD2 F184A mutant and compared the differentially methylated proteins enriched within the two conditions by mass spectrometry (MS) -based quantitative proteomics. Among more than 400 potential methylated proteins identified, 25 were selectively enriched with active SMYD2 (**Figures 2A** and **S2A** and **Table S1**). Interestingly, 6 of these candidates were also identified in a complementary proteomic analysis of SMYD2-dependent methylated proteins in KYSE-150 cell line, using an immune-based enrichment: AHNAK, BCAR3, DBNL, DIAPH1, PRRC2C and RTF1 (Olsen et al., 2016). Because SMYD2 expression promotes breast cancer metastasis in our mouse model and is linked with poor survival in human metastatic breast cancer samples, we performed a bioinformatic analysis to seek for a potential correlation between SMYD2 expression and our list of SMYD2-candidate substrates. BCAR3 displayed the strongest positive correlation with SMYD2 expression in

metastatic breast cancer samples (**Figure 2B** and **Table S2**). Based on these observations and the fact that BCAR3 has already been involved in breast cancer pathogenesis and cell migration (van Agthoven et al., 1998; Schrecengost et al., 2007; Cross et al., 2016), we decided to focus our effort on this potential new SMYD2 substrate.

BCAR3 (Breast Cancer Anti-Estrogen Resistance 3) is named based on its participation to breast cancer resistance to the anti-estrogen receptor tamoxifen (van Agthoven et al., 1998). In collaboration to its binding partner BCAR1, it has been linked to various aspects of cell migration and proliferation (Wilson et al., 2013). However, despite these crucial downstream signaling functions, how BCAR3 is regulated remains elusive. Using *in vitro* radio-labeled methylation assay, we validated BCAR3 as a genuine substrate of SMYD2 (**Figure S2B**). MS-based proteomics analyses on methylated BCAR3 revealed a specific mono-methylation of lysine 334 (K334me1) (**Figure 2C**). Further mutagenesis assays confirmed the lysine 334 as the single site of methylation by SMYD2, since BCAR3 methylation was abolished with the K334R mutant (**Figure 2D**). Of note, we discarded the potential K5 methylation site suggested by Olsen and colleagues (Olsen et al., 2016), as the K5R mutant was still efficiently methylated by SMYD2. Interestingly, the BCAR3 K334 methylation mark has already been observed by other proteomic approaches in different cancer cell lines without further characterization (Guo et al., 2014; Olsen et al., 2016).

To demonstrate the capacity of SMYD2 to methylate BCAR3 in cells, we raised a BCAR3 K334me1 antibody. We confirmed its specificity towards BCAR3 K334 mono-methylation as the antibody successfully detected the BCAR3 peptide containing K334me1, but neither the unmethylated BCAR3 peptide nor the MAPKAPK3 K355me1 peptide, a previously characterized substrate of SMYD2 (**Figure S2C**) (Reynoird et al 2016). Further methylation assays showed that this specific antibody can recognize full length recombinant methylated BCAR3, but neither unmethylated nor K334R mutant BCAR3 (**Figure S2D**). We observed that the specific SMYD2

inhibitor BAY-598 (Eggert et al., 2016) efficiently repressed BCAR3 K334 methylation *in vitro* (**Figure S2E**). Remarkably, BCAR3 K334 methylation was immunodetected in crude extract of 293T cells expressing ectopic SMYD2 and BCAR3, supporting the physiological relevance of this methylation event (**Figure 2E**). This prompted us to screen BCAR3 methylation level in breast cancer cell lines. While SMYD2 expression was quite comparable between five different cell lines tested, BCAR3 was preferentially expressed in metastatic basal-like cell lines (MDA-MB-468, MDA-MB-157 and MDA-MB-231) compared to luminal (MCF-7) and HER2+ (MDA-MB-453) cell lines (**Figures 2F and S2F**). After enrichment of endogenous BCAR3 from metastatic basal cell lines, we observed a clear methylation signal using our BCAR3 K334me1 specific antibody. Remarkably, this methylation mark was strongly reduced upon genetic (inducible shRNA) or pharmacologic (BAY-598 inhibitor) repression of SMYD2 (**Figures 2G-H and S2G-H**). Interestingly, we did not observe BCAR3 methylation in non-basal breast cancer cell line MCF-7 (**Figure S2I**), suggesting that function of BCAR3 methylation might be related to aggressive features of cancer cells.

Therefore, we discovered a new substrate of SMYD2 and demonstrated that BCAR3 is monomethylated on its lysine 334. We showed that this methylation event is particularly enriched in aggressive breast cancer cell lines and that this new SMYD2-BCAR3 signaling is druggable using a specific SMYD2 inhibitor.

SMYD2-BCAR3 signaling promotes cell migration and invasiveness.

Several reports have linked SMYD2 to cell proliferation in different cancer types (Li et al., 2018; Ohtomo-Oda et al., 2016; Sun et al., 2019; Zeng et al., 2019). However, we did not observe such phenotypes related to SMYD2 in our *in vivo* breast cancer model, in which primary tumor growth was not particularly affected by SMYD2 ablation. To assess if BCAR3 methylation could impair cell proliferation *in vitro*, we engineered MDA-MB-231 cells to induce BCAR3 silencing upon doxycycline treatment, and stably rescued BCAR3 with either WT or K334A (K>A) methyl-

dead mutant BCAR3 GFP-HA tagged. Both rescued WT and K334A BCAR3 expressions were comparable to endogenous level of BCAR3 (**Figure 3A**). We confirmed that rescued WT BCAR3 is methylated by SMYD2 in these cells, and that its methylation is lost upon genetic or pharmacologic repression of SMYD2. Consistent with our *in vivo* observations, SMYD2 silencing did not alter MDA-MB-231 proliferation (**Figure 3B**). However, we found that BCAR3 depletion decreased cell proliferation, but independently of SMYD2 methylation, as the K334A mutant BCAR3 was able to rescue proliferation defects from BCAR3-depleted cells. In parallel, we noticed an increased proliferation of luminal cell line MCF-7 upon ectopic BCAR3 expression, albeit still not dependent to BCAR3 methylation status (**Figure S3A-B**).

While breast cancer cell proliferation is not likely regulated by SMYD2-BCAR3 methylation signaling, metastatic spreading was a prominent feature of SMYD2 in our mouse breast cancer model. Interestingly, SMYD2 has been recently linked to cell invasion *in vitro*, a crucial mechanism during metastasis cascade (Zeng et al., 2019). Consistently, BCAR3 has been shown to be involved in regulation of migration and invasion of cancer cells (Cross et al., 2016). We therefore asked whether BCAR3 methylation by SMYD2 could participate in cell migration and invasion regulation. We used our engineered cells to monitor SMYD2-BCAR3 dependent single-cell migration defects with time-lapse live microscopy. We observed that BCAR3 silencing significantly impaired individual cell velocity (**Figure 3C**). Remarkably, WT BCAR3, but not the methyl-dead K334A mutant, rescued cells motility capacity when SMYD2 was present and active in cells, indicating that methylation is a crucial parameter in MDA-MB-231 migration velocity. We hypothesized that if BCAR3 – and its methylation – is a key actor of cell motility, its ectopic expression in non-aggressive cells with low BCAR3 level such as MCF-7 cells may boost their migration capacity. Indeed, stable overexpression of WT BCAR3 significantly increased MCF-7 collective cell migration, while the BCAR3 K>A mutant failed to do so (**Figure S3C**).

Next, we assessed the importance of BCAR3 methylation during invasive cell migration in tridimensional matrix, an environment more relevant and similar to *in vivo* conditions faced by invasive tumor cells. We made compact and size-consistent spheroids of MDA-MB-231 cells using basement membrane Matrigel, embedded them in thick collagen I hydrogel, and monitored cell invasion over time. Strikingly, BCAR3 depletion strongly impaired MDA-MB-231 cells matrix invasion. Consistent with our previous migration phenotypes, rescue with the methyl dead mutant BCAR3 was not sufficient to re-establish the full invasive potential of cells compared to the WT counterpart. Additionally, genetic and pharmacologic repression of SMYD2 mimicked loss of spheroid invasiveness capacity upon BCAR3 depletion, suggesting that BCAR3 K334 methylation is a decisive post-translational signaling to regulate cell invasion downstream of SMYD2 (**Figure 3D**). Further analysis of cells escaping radially from spheroid mass with confocal adaptive optics microscopy showed that cells impaired for BCAR3 methylation frequently lack protrusions at leading edge compared to control cells. These protrusions are a constitutive feature of highly mesenchymal cells in tridimensional environment, notably proficient at degrading extracellular matrix and pulling cells forward (**Figure S3D**) (Clark and Vignjevic, 2015; Krause and Gautreau, 2014). Interestingly, cells depleted for BCAR3 methylation displayed a clear reduction of Vimentin expression, a key marker of mesenchymal cells (**Figure S3E**). Altogether, these findings demonstrate that methylation of BCAR3 positively regulates mesenchymal cell migration to allow breast cancer cell invasion, a crucial parameter during metastatic dissemination.

Lysine methylation of BCAR3 recruits FMNLS

Lysine methylation predominantly regulates protein-protein interactions, promoting a specific binding of methyl-binding proteins, also called readers (Musselman et al., 2012). Therefore, to identify methyl-sensitive proteins that are specifically repelled or attracted by BCAR3 K334me1, we performed a SILAC peptide pull-down using biotinylated peptides containing either

unmodified or mono-methylated versions of BCAR3 K334. We then analyzed isolated proteins using MS-based quantitative proteomics. Strikingly, we identified a subfamily of proteins that only interacted with methylated BCAR3, the Formin-Like proteins 1, 2 and 3 (FMNL1/2/3 or FMNLs) (**Figure 4A** and **Table S3**). FMNLs are part of the formin family, known to bundle and polymerize actin filaments (F-Actin). Notably, FMNLs participate in actin cytoskeleton remodeling during cell migration and metastatic progression, in adequation with our SMYD2-BCAR3 signaling phenotypic observations (Block et al., 2012; Kage et al., 2017; Katoh and Katoh, 2003; Zeng et al., 2015). We noticed that FMNL2 and FMNL3 expression, but not FMNL1, correlated with SMYD2 and BCAR3 expressions in breast cancer cell lines, being highly expressed in basal-like cancer cells MDA-MB-231 and MDA-MB-468 compared to luminal MCF-7 (**Figure S4A**). We confirmed the interaction between BCAR3 K334me1 peptides and endogenous FMNL2/3 in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 (**Figure 4B**). We showed that endogenous FMNL2 and FMNL3 co-immunoprecipitated with endogenous BCAR3 in MDA-MB-231 cells, and this interaction was lost upon SMYD2 genetic and pharmacologic inhibition (**Figure 4C**). Additionally, we made similar observations with the BCAR3-depleted MDA-MB-231 cells rescued with WT BCAR3, while no interaction was detectable with the methyl dead mutant K334A BCAR3 (**Figure S4B**). These data strongly suggested that methylated BCAR3 interacts with FMNL2 and FMNL3 in breast cancer cells.

Because there is no known methyl-binding domain reported in Formins, we aimed at confirming whether the interaction with methyl BCAR3 was direct and not mediated by an intermediate factor. After purifying full-length recombinant FMNLs, we performed a peptide pull-down and found that all FMNLs directly bound to methylated but not to unmethylated BCAR3 peptides (**Figure 4D**). This suggested that FMNLs probably share a common binding pocket accommodating the methylated lysine. While analyzing the domains shared by formin proteins with available structural information, we observed that their N-terminal regulatory domain, also

called GBD-FH3 domain, is organized as an Armadillo-repeats fold (**Figure S4C**). These repeats display a high structural redundancy with another kind of repeats called HEAT repeats, already known to accommodate mono-methylated lysine 20 of H4 in a hydrophobic pocket including the presence of aromatic residues (Liu et al., 2010). Notably, we found that the GBD-FH3 domain of FMNL3 was sufficient to bind to methylated BCAR3 (**Figures 4E-F**). These data suggested that the Armadillo repeats fold from the GBD-FH3 domain of FMNL1, 2 and 3 is a potential new methyl-binding domain, and we sought to investigate the structural basis of the interaction of methylated BCAR3 with FMNL3. The molecular structure of the GBD-FH3 domain of FMNL1 and FMNL2 in complex with the Rho-GTPase Cdc42 were previously determined (Kühn et al., 2015). We performed a structural homology modeling of the BCAR3-FMNL3 interaction based on the high structural similarity between FMNL2 and FMNL3, and between the Cdc42 helix a3 responsible for its interaction to the GBD-FH3 domain and the sequence of the methylated BCAR3 peptide, which is predicted to fold into a helix (**Figure 4G**). Remarkably, the monomethylated lysine K334 of BCAR3 locates within a well-defined hydrophobic pocket of FMNL3 containing two aromatic residues, Trp124 and Tyr237, surrounded by aliphatic residues (Leu117, Ile122, Val125, Ala233). Importantly, residues Trp124 and Tyr237 at the bottom of the pocket, as well as the aliphatic residues, delineate an optimal protein core environment to accommodate methylated K334. Notably, these six critical amino acids defining the hydrophobic pocket of FMNL3 are strictly conserved in FMNL1 and FMNL2 (**Figures S4D-E**). Of note, other aromatic residues present in the GBD-FH3 domain did not form a pocket enable to accommodate the methylated lysine of BCAR3. Collectively, our data demonstrate that FMNLs are specific binders of methylated BCAR3 and possess a methyl-reader capacity mediated by an aliphatic pocket within their GBD-FH3 domain.

BCAR3 methylation recruits FMNLs to lamellipodia and regulate cytoskeleton protrusions.

The GBD-FH3 domain is essential for FMNLs function as it is known to regulate their plasma membrane localization, either directly through N-terminal myristoylation anchoring, or indirectly by binding to Rho-GTPases such as Cdc42 (Block et al., 2012; Kühn et al., 2015). When Rho-GTPases bind to the GBD-FH3 domain of FMNLs, they promote an open conformation of FMNLs enabling their actin assembly activity. Interestingly, BCAR3 harbors a putative GTP-exchange factor (GEF) activity that could participate in Rho-GTPase's regulation of FMNLs. However, the GEF domain of BCAR3 has been shown to adopt a closed conformation impeding any catalytic activity, rather allowing its interaction with BCAR1 (Mace et al., 2011). We therefore reasoned in favor of an adapter role of BCAR3 methylation, gathering FMNLs at a particular localization to participate in their local activation and further cytoskeleton reorganization.

We and others observed that BCAR3 located to specific cell protrusions called lamellipodia (**Figure S5A**, (Steenkiste et al., 2021)). Additionally, we observed that SMYD2 is largely cytosolic in MDA-MB-231 cells and also particularly enriched in lamellipodia (**Figure S5B**). Lamellipodia are broad actin-based protrusions at the leading edge of cells moving on a flat surface (Krause and Gautreau, 2014). Remarkably, FMNLs are known to be recruited at the lamellipodium tip of migrating cells, to strengthen this structure and enhance cell motility capacity (Kage et al., 2017). We specifically probed methylated BCAR3 in MDA-MB-231 by Proximity Ligation Assay (PLA) using BCAR3 HA tag and BCAR3 K334me1 specific antibodies. We found that methylated BCAR3 broadly localizes in the cytoplasm with a diffuse enrichment at the cell edges resembling lamellipodia (**Figure 5A**). We then stably expressed in previously engineered MDA-MB-231 cells an additional N-terminal FLAG-tagged FMNL3 construct. Using these cells, we observed by PLA that WT BCAR3, but not the K334A mutant, interacted *in situ* with FMNL3, once again specifically at cell protrusions likely being lamellipodia (**Figure 5B**).

The localization of this interaction corresponds to the site where FMNL2/3 are activated in migrating cells. We therefore sought to detect any potential change in FMNL3 recruitment to lamellipodia upon SMYD2-BCAR3 signaling. We noted that a population of FMNL3 was still able to reach lamellipodia in control cells, while cells silenced for BCAR3 retained FMNL3 essentially in the cytosol (**Figure 5C**). Remarkably, cells rescued with WT BCAR3, but not with the methyl dead mutant BCAR3 nor upon SMYD2 inhibition, regained a strong accumulation of FMNL3 in lamellipodia. We therefore show that BCAR3 methylation is a decisive anchoring point to attract or retain FMNLs in lamellipodia.

BCAR3-dependent motility and cytoskeleton remodeling has been linked to its interaction with the major mechanosensor BCAR1 (Cross et al., 2016; Makkinje et al., 2009; Schrecengost et al., 2007). Using engineered MDA-MB-231 cells, we observed that neither BCAR3 methylation nor loss of methylation altered BCAR3-BCAR1 complex formation (**Figure S5C**). We further demonstrated that FMNL3 is present in BCAR1/BCAR3 complex and FMNL3-FMNL3-BCAR1 interaction was impeded upon loss of BCAR3 methylation or loss of BCAR1-BCAR3 interaction (BCAR3 L744E mutant, L>E) (Wallez et al., 2014) (**Figure S5D**). It is therefore highly probable that BCAR3 methylation acts as a molecular adaptor between BCAR1 and FMNLs to allow specific activation of FMNLs in lamellipodia.

These different observations strongly indicated that BCAR3 methylation promotes FMNL3 gathering in lamellipodia, where FMNLs are known to boost force generation required for cell motility. Indeed, when located at plasma membrane of lamellipodia, FMNL2/3 have been shown to elicit complementary F-Actin nucleation and elongation, and to contribute to mass and ultrastructure of lamellipodial actin network (Kage et al., 2017). Therefore, we hypothesized that the decreased cell motility observed upon loss of BCAR3 methylation may relate to improper FMNLs activation and impaired lamellipodia fitness. We found that MDA-MB-231 silenced for BCAR3 have a reduced number of lamellipodia (**Figure S5E**). Furthermore, rescuing BCAR3

expression with the K334A methyl-dead mutation led to smaller reminiscent lamellipodia, similar to the ones resisting to the depletion of BCAR3 (**Figure S5F**). We quantified the density of lamellipodial F-actin cytoskeleton network and observed that cells unable to recruit efficiently FMNL2/3 in lamellipodia displayed significantly weaker F-actin network than cells rescued with WT BCAR3 (**Figure 5D**). Remarkably, we found similar results on actin protrusions in MCF-7 stably overexpressing BCAR3 WT or K334A, confirming that BCAR3 methylation boosts actin polymerization through FMNL2/3 recruitment at the front edge of migrating cells (**Figure S5G**). Finally, we monitored lamellipodia fitness by studying their dynamics with live microscopy. We found that densification of F-Actin network in lamellipodia was correlated with increased dynamics, as lamellipodia protrusion rate was significantly decreased when BCAR3 methylation was impaired (**Figure 5E**). Altogether, we showed that BCAR3 methylation specifically recruit FMNLs to lamellipodia, where they are activated to promote lamellipodia protrusion and fuel cell velocity.

SMYD2-BCAR3 signaling drive breast cancer metastasis

To study the potential impact of this newly characterized SMYD2-BCAR3 signaling in breast cancer metastasis, we performed xenograft analyses in immuno-compromised mice with previously engineered breast cancer cells. As expected, aggressive MDA-MB-231 cells efficiently invaded and developed into tumors within mice lungs (**Figures 6A-B**). However, neither SMYD2 repressed nor BCAR3 repressed MDA-MB-231 cells formed lung metastases. Remarkably, WT BCAR3 but not BCAR3 K334A mutant was able to rescued capacity of BCAR3-repressed MDA-MB-231 to form metastases in our assay. Additionally, we performed similar analyses with engineered non-aggressive MCF-7 cells. As previously documented, MCF-7 xenografts rarely developed into tumors and ectopic SMYD2 overexpression modestly increases their capacity to initiate metastatic nodules in mice lungs (**Figures 6C-D**). However, dual ectopic overexpression of SMYD2 and WT BCAR3 significantly increased MCF-7 capacity

to develop nodules, an observation abrogated by BCAR3K334A mutation. Therefore, BCAR3 methylation by SMYD2 is a potent signaling required and sufficient to drive breast cancer metastases *in vivo*.

SMYD2 pharmacologic inhibition prevents breast cancer metastasis

Finally, we aimed to assess the druggability of the SMYD2-BCAR3 signaling *in vivo*, to demonstrate the preventive therapeutic relevance and potential on breast cancer metastatic spreading. Immuno-compromised mice were treated with SMYD2 inhibitor daily prior and after xenografts with either aggressive MDA-MB-231 cells or metastatic patient-derived cancer cells (PDX) (**Figures 1A** and **1D**). Remarkably in both cases, SMYD2 pharmacologic inhibition drastically decreases metastatic nodules in mice lungs compared to vehicle-treated mice (**Figures 1B-C** and **1E-F**). Finally, to differentiate between the potential implication of SMYD2 in either tumor development and metastatic spreading, we initiated vehicle or SMYD2 inhibitor treatment in PyMT mouse model at the time where breast tumors were palpable (approximately 7 weeks after birth). We observed a clear decreases of metastases foci in lungs of mice treated with SMYD2 inhibitor after primary breast tumor development, suggesting that SMYD2 is driving metastatic spreading. Given the non-consequences of SMYD2 repression in constitutive knock-out mouse and the importance of breast cancer metastases in patients morbidity, SMYD2 pharmacologic inhibition could serve as an efficient preventive therapeutic in clinic for breast cancer patients prior to potential metastases development.

DISCUSSION

Breast cancer remains the most frequent cancer in women and still accounts for more than 650,000 deaths annually. The root cause of most breast cancer deaths is metastasis and effective therapies to inhibit cancerous spread have yet to be identified (Cao and Niu, 2020; Harbeck et al., 2019). Here, we identify the lysine methyltransferase SMYD2 as a critical promoter of metastasis in breast cancer. SMYD2 oncogenic activity has been clearly established over the past years, and few studies previously described the potential role of SMYD2 in breast cancer (Li et al., 2018; Zeng et al., 2019). However, a comprehensive deciphering of SMYD2 oncogenic signaling remained missing in this pathologic context. We observed that SMYD2 depletion has no impact on primary tumor growth in breast cancer mouse model, but has a clear consequence on metastases spreading. Our data suggest that SMYD2 acts as a metastatic driver in breast cancer, and our work yields substantial new biological insights at molecular, cellular and *in vivo* levels on oncogenic SMYD2 signaling in breast cancer malignancy.

Lysine methylation of non-histone proteins is emerging as an essential signaling mechanism regulating physiological and pathological processes. Until recently, the study of protein lysine methylation beyond histones was limited to candidate-based approaches due to several technical limitations. With recent advances in proteomic and genome-wide techniques, the stage is now set to decode the “methyl-proteome” of each methyltransferase and define its functions in health and disease. Because of its clear link to cancer, a strong effort has been made to identify substrates of the lysine methyltransferase SMYD2, either by computational motif-based searches (Lanouette et al., 2015), peptide library screen (Cornett et al., 2019; Weirich et al., 2020) or MS-based analyses (Olsen et al., 2016). While informative, *in silico* and *in vitro* approaches may be inappropriate for some robust KMTs such as SMYD2, capable to methylate various degenerated sequence motifs under non-physiological conditions. Therefore, MS-based SILAC quantitative proteomics are more likely to identify physiologic substrates. For example, lysine-oriented peptide library from Cornett and

colleagues identified thousands of potential substrates of SMYD2, but none of the substrates identified in our MS-based assay ranked on their top 500 hits. Here, we identify new physiologic substrates of SMYD2, and show that BCAR3 is a genuine substrate of SMYD2 in breast cancer cells. Consistent with previous observations showing that SMYD2 and BCAR3 may contribute individually to cancer cell migration and invasiveness, we find that BCAR3 methylation is the molecular link responsible for these phenotypes. Our investigations revealed that the impact on migration ability is linked to a tight control of lamellipodia fitness.

A recent report suggested that BCAR3 phosphorylation at tyrosine Y117 maintains low level of BCAR3 in epithelial mammary cells through ubiquitin-dependent degradation and impede lamellipodia formation and collective epithelial migration. Importantly, the authors indicated that the phosphorylation does not control individual mesenchymal cell migration, and therefore is a feature of epithelial cells (Steenkiste et al., 2021). In our study, we demonstrate that lysine methylation is the modification promoting mesenchymal state, increasing cell velocity in breast cancer cells and triggering metastatic dissemination. It is therefore tempting to speculate that BCAR3 functions during breast cancer progression are tightly regulated by different PTMs patterns. While BCAR3 phosphorylation triggers its strong degradation in normal mammary epithelium, restraining collective migration and enabling tissue homeostasis, lysine methylation by SMYD2 occurs in aggressive breast cancer cells to promote mesenchymal cell migration and invasiveness, thereby fueling breast cancer metastatic dissemination.

As an adapter protein, it is not surprising that BCAR3 is modified by various PTMs that can in turn modulate its affinity for particular partner. We show that BCAR3 methylation is an exclusive docking site for FMNLs family and may function as an anchor to recruit them in lamellipodia. We demonstrate the importance of this connection as cancer cells maintaining this SMYD2/BCAR3/FMNLs axis displays broad and efficient lamellipodia, able to drive a fast mesenchymal migration. However, further work is required to decipher how FMNLs may be activated afterwards to regulate lamellipodia fitness. A similar mechanism is observed

with an active Cdc42-GTP, where its binding to the regulatory domain GBD-FH3 of FMNLs triggers their localization and activation to the lamellipodium tip. Cdc42-GTP is thought to open FMNLs, rendering the FH1 and FH2 domains accessible for actin filament polymerization, by displacing the autoregulatory DAD domain (Diaphanous-autoregulatory domain) from the GBD-FH3 domain, which otherwise leads to a closed conformation of FMNLs (Kage et al., 2017; Kühn et al., 2015). Interestingly, our structural model suggests that methylated BCAR3 binds to a similar region within the GBD-FH3 and BCAR3 may lead to an open and active conformation of FMNLs in addition to their recruitment to lamellipodia. Alternatively, it is possible that BCAR3 methylation only affects FMNLs localization while their subsequent activation is indirectly orchestrated by BCAR3. Indeed, while GEF activity of BCAR3 has been clearly ruled out, several lines of evidence have shown that the interaction of BCAR3 with BCAR1 triggers several downstream pathways, culminating in the activation of Cdc42-GTP (Cai et al., 2003). This would provide a crucial feed-forward mechanism, where BCAR3 methylation controls both localization and activation of FMNLs in breast cancer cells.

More generally, the finding that FMNLs, and in some extent other GBD-FH3-containing formins, have the capacity to bind methylated lysine, is of particular interest. Further work is required to fully characterize the new methyl-binding domain within formins, but our work suggests that formins may be regulated in part by recognizing methylated proteins such as BCAR3, either by recruiting them at specific cellular localization or by activating them within specific cellular contexts. Interestingly, the discovery of cytoplasmic methyl-readers blurs even more the line between epigenetic signaling and a more global view of lysine methylation mechanism in cell.

An intriguing question resulting from our study is the possibility that BCAR3 methylation can be time- and context- specific. What triggers SMYD2 methylation of BCAR3? SMYD2 and BCAR3 expression is not restricted to breast tissue and as we noticed, SMYD2 expression does not differ during breast cancer progression or during metastases development. It is

possible that the tumor microenvironment control SMYD2 activity in an unknown fashion. A specific signal may relocate SMYD2 to lamellipodia, or SMYD2 activity may be stimulated by an unknown mechanism during EMT prior to metastases spreading. Additionally, BCAR3 level increases in metastatic breast cancer cells, possibly leading to more methylated BCAR3. Interestingly, a recent report suggested that SMYD2 also participates in lung cancer metastases and among major pathways deregulated upon SMYD2 inhibition, they identified different processes such as focal adhesion, ECM-receptor interaction and PI3K/Akt signaling (Wu et al., 2021). As SMYD2 activity on histones or direct evidence of SMYD2 function in gene expression regulation remain controversial, it is likely that these processes all linked to BCAR3 are indirectly resulting from SMYD2 methylation of BCAR3.

A better understanding of the molecular mechanism of SMYD2 signaling provides valuable insights into potential ways to modulate its oncogenic capacity. Notably, our molecular characterization of the functional consequences of BCAR3 methylation will allow to focus future clinical efforts to target this pathway and to prevent metastasis spreading. We strongly believe that targeting SMYD2-BCAR3 signaling could prove extremely valuable for combinatory treatments against malignant subtypes of breast cancer, arresting their propensity to develop metastasis. Indeed, we show that genetic loss of SMYD2 significantly decreases breast cancer capacity to develop metastases, and SMYD2 inhibitor BAY-598 dramatically reduces the invasion capacity of breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Additionally, SMYD2 KO mice are viable and do not harbour noticeable impairments, suggesting that inhibition of SMYD2 in patients with breast cancer diagnosed at early stages may have minimal side effect combined with great preventive effect against metastases development. Finally, BCAR3 has also been linked to anti-estrogen resistance. It is possible that BCAR3 methylation may participate in such mechanism of breast cancer resistance, and further experiments are required to tackle the importance of SMYD2 in breast cancer resistance. An appealing possibility would then be that SMYD2 inhibition to prevent BCAR3 methylation may have beneficial impact in both anti-estrogen acquired resistance and

DISCUSSION

metastases development. Altogether, our study demonstrates that the SMYD2-BCAR3 signaling axis is a key metastatic driver in breast cancer and an intriguing new therapeutic target in breast cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors would like to thank Alexei Grichine, Mylène Pezet and Jacques Mazzega from the Optical Microscopy - Cell Imaging facility at the Institute for Advanced Biosciences for their help in imagery analyses. N.R. was supported by the French National Research Agency in the framework of the "Investissements d'avenir" program (ANR-15-IDEX-02), the French National Cancer Institute (INCa PLBIO21-010) and Gefluc Isère 2020. P.K.M. was supported by NIH (R01CA236118, R01CA23694), DoD PRCRP Career Development Award (CA181486), CPRIT Scholar in Cancer Research (RR160078). The proteomic experiments were partially supported by Agence Nationale de la Recherche under projects ProFI (Proteomics French Infrastructure, ANR-10-INBS-08) and GRAL, a program from the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003). S.H. was supported by NIH (K99 CA255936). A.C. is a recipient of a doctoral fellowship from FRM (Fondation pour la Recherche Medicale, ECO20170637491) and a 4th year PhD fellowship from ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer). We thank members of the Reynoird and Mazur labs for critical reading of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

N.R., A.G.C., and P.K.M. were responsible for the experimental design, execution and data analysis. A.G.C., G.S.R., L.B, Y.C., and N.R. performed and analyzed mass spectrometry experiments. A.G.C., G.S.R., J.V. and N.R. performed and analyzed biochemical and cell assays. E.F. and S.R performed bioinformatics analyses. A.G.C., F.I., A.P. and N.R. performed structural modeling. S.H., P.K.M., A.M.B., N.M.F., M.C., X.Y., J.W performed and analyzed animal experiments, treatments and histological studies. N.R., P.K.M., S.R., Y.C., O.G. and P.H. supervised all aspects of the study. A.G.C. and N.R. drafted the manuscript. N.R. and P.K.M. were responsible for funding acquisition, supervision of research, data interpretation and manuscript preparation.

DECLARATION OF INTERESTS

DECLARATION OF INTERESTS

Pawel K. Mazur is a scientific co-founder, consultant and stockholder of Amplified Medicines, Inc. and Ikena Oncology, Inc.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. SMYD2 promotes breast cancer metastasis

- (A) Schematic representation of *PyMT* and *PyMT;Smyd2* breast cancer mouse models.
- (B) Representative images of breast cancer primary tumor progression in *PyMT* and *PyMT;Smyd2* mice.
- (C) Representative HE and IHC staining for cell proliferation marker Ki67 and apoptosis maker cleaved Caspase 3 (cl. Caspase 3) of mammary tissue from *PyMT* and *PyMT;Smyd2* mutant mice at 12 weeks of age (representative of n = 6 mice for each group). Scale bars: 100 μ m.
- (D-G) Quantification of mammary tumor weight (D), mammary tumor number (E), proliferation (Ki67 positive cells) (F) and apoptosis (cl. Caspase 3 positive cells) (G) in samples as in (C). Data are represented as mean \pm s.e.m. *P* values were determined by two-tailed unpaired t-test. n.s. not significant. Box plots, the line indicates the median, the box marks the 75th and 25th percentiles and the whiskers indicate the minimum and maximum values.
- (H) Kaplan-Meier survival curves of *PyMT* (n = 13, median survival = 155 days) and *PyMT;Smyd2* (n = 13, median survival = 155 days) mutant mice. *P* values determined by logrank test.
- (I) Western blots with the indicated antibodies of tumor biopsy lysate from *PyMT* and *PyMT;Smyd2* mutant mice. Two independent samples are shown for each genotype. Tubulin is shown as a loading control.
- (A) Bioinformatic analysis of SMYD2 expression prognostic survival value in metastatic breast cancer (TCGA-BRCA dataset, M1 subgroup).
- (B) Representative HE staining of lung tissue sections at 14 weeks after tumor induction (representative of n = 6 mice for each group). Scale bars: 1 cm.

(C-G) Quantification of total number of tumor nodules (C), tumor burden (tumor area per lung) (D), tumor grade (E), proliferation (Ki67 positive cells per tumor area) (F) and apoptotic cells (cleaved Caspase 3 positive cells per tumor area) (G) in samples as in (B). Data are represented as mean \pm s.e.m. *P* values were determined by two-tailed unpaired t-test. **** *P* < 0.0001. Box plots, the line indicates the median, the box marks the 75th and 25th percentiles and the whiskers indicate the minimum and maximum values.

Figure 2. SMYD2 methylates BCAR3 in breast cancer cells

(A) Experimental workflow (left) and scatter plot representation (right) of SMYD2 SILAC 3xMBT pulldown. The X-axis shows the Log₂ ratio of methylated proteins in presence of active vs inactive SMYD2 (Forward). The Y-axis shows the Log₂ ratio of a label-swap replicate experiment (Reverse). Only potential substrates identified in swapped replicates with a Log₂ ratio >0.5 are presented.

(B) Spearman correlation coefficient between SMYD2 and identified substrates in non-metastatic and metastatic breast cancer samples.

(C) Tandem mass spectrometry (MS/MS) spectrum identifying monomethylated K334 present on BCAR3 after *in vitro* SMYD2 methylation. Deuterated S-adenosyl-L-methionine was used as a methyl donor.

(D) Autoradiogram of a radiolabeled methylation assay using recombinant SMYD2 on full-length recombinant BCAR3 and point mutants K5R and K334R (Top panel), and Coomassie stain of proteins in the reaction (bottom panel).

(E) Immunodetection of BCAR3 K334me1 in HEK-293T cells after ectopic expression of SMYD2 and BCAR3 WT or K334R (K>R).

(F) Immunodetection of BCAR3 and SMYD2 expression in different breast cancer cell lines.

(G-H) Immunodetection of endogenous BCAR3 K334me1 and its loss upon SMYD2 genetic and pharmacologic repression in MDA-MB-157 **(G)** and MDA-MB-231 **(H)** cell lines.

Figure 3. SMYD2-BCAR3 signaling promotes cell migration and invasiveness.

(A) Immunoblot analysis with indicated antibodies of engineered MDA-MB-231 cells with inducible repression of BCAR3, WT or K334A (K>A) BCAR3 GFP-HA rescue and genetic or pharmacologic repression of SMYD2.

(B) Proliferation index of engineered MDA-MB-231 cells presented in (A).

(C) Representative examples of single cell track monitoring (left) and related single cell velocity quantification (right) of engineered MDA-MB-231 cells. Boxes represent 25th to 75th percentile, whiskers: 10% to 90%, center line: median; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ by one-way ANOVA with Tukey's testing for multiple comparisons.

(D) Representative matrix invasion (left) and spreading quantification (right) of engineered MDA-MB-231 cells during spheroid growth assays. ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$ by two-way ANOVA with Tukey's testing for multiple comparisons, error bars represent mean \pm SD.

Figure 4. Lysine methylation of BCAR3 recruits FMNLs

(A) Scatter plot representation after quantitative proteomics analysis of BCAR3 SILAC peptide pulldown. The X-axis shows the Log_2 ratio of proteins binding to BCAR3 K334me1 versus BCAR3 K334me0 (Forward). The Y-axis shows the Log_2 ratio of a label-swap replicate experiment (Reverse). Specific interactors of methylated BCAR3 reside in the upper right quadrant and methyl-sensitive binders identified in swapped replicates with a Log_2 ratio $> \pm 0.5$ are presented.

(B-C) Immunoblot analysis with indicated antibodies following pulldowns with BCAR3 peptides using either MDA-MB-231 or MDA-MB-468 cell extracts with endogenous FMNLs **(B)** or recombinant GST-FMNLs proteins **(C)**.

FIGURE LEGENDS

(D) Co-immunoprecipitation of endogenous BCAR3 after endogenous FMNL2/3 enrichment in MDA-MB-231 cells either expressing SMYD2 or upon genetic or pharmacologic inhibition of SMYD2.

(E) BCAR3 peptide pulldowns using 293T cells extract with either ectopic full-length, GBD-FH3 of FH1-FH2-DAD domains of FMNL3.

(F) Silver staining following pulldowns with BCAR3 peptides using recombinant GBD-FH3 domain of FMNL3.

(G) Structural homology model of FMNL3 GBD-FH3 domain in complex with BCAR3 peptide containing methylated K334. The FMNL3 GBD-FH3 domain involved in the interaction with BCAR3 is shown as chartreuse surface representation, with the hydrophobic putative methyl-lysine binding pocket in yellow. BCAR3 region containing methylated K334 is shown as white cartoon, and K334me1 is shown as red sticks over transparent surface representation.

Figure 5. BCAR3 methylation recruits FMNLs to lamellipodia and regulate cytoskeleton protrusions.

(A) Representative images (left) and signal quantification (right) of Proximity Ligation Assay (PLA, green) to specifically monitor methylated BCAR3 by coupling HA-BCAR3 and BCAR3K334me1 antibodies in engineered MDA-MB-231 cells. A zoom of BCAR3me1 enrichment in lamellipodia is provided. Boxes represent 25th to 75th percentile, whiskers: 10% to 90%, center line: median; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ by Welch ANOVA with Games-Howell's testing for multiple comparisons.

(B) Representative images of PLA (green) to monitor BCAR3-FMNL3 interaction *in situ*, coupling HA-BCAR3 and Flag-FMNL3 antibodies in engineered MDA-MB-231 cells. A zoom of BCAR3-FMNL3 enrichment in lamellipodia is provided.

FIGURE LEGENDS

(C) Representative immunofluorescence images (left) and signal quantification (right) of F-Actin (phalloidin, red) and Flag-FMNL3 (green) in engineered MDA-MB-231 cells. Zooms of FMNL3 lamellipodia enrichment within different cellular conditions are provided. Boxes represent 25th to 75th percentile, whiskers: 10% to 90%, center line: median; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$ by Welch ANOVA with Games-Howell's testing for multiple comparisons.

(D) Representative images of lamellipodia (left) visualized by Z-projection staining of F-Actin (phalloidin, red) and lamellipodia F-Actin density quantification (right) in engineered MDA-MB-231 cells.

(E) Representative kymographs of lamellipodia protrusion rate (left) and quantification of lamellipodia protrusion velocity (right) in engineered MDA-MB-231 cells. Boxes represent 25th to 75th percentile, whiskers: 10% to 90%, center line: median; ** $P < 0.01$ by Kruskal-Wallis with Dunn's testing for multiple comparisons.

Figure 6. SMYD2-BCAR3 signaling drive breast cancer metastasis

(A) Schematic of xenografts schedule of engineered MDA-MB-231 cells.

(B-C) Representative visualization (B) and quantification (C) of xenografts tumor development using engineered MDA-MB-231 cells.

(D-E) Representative visualization (D) and quantification (E) of breast cancer patient derived xenografts (PDX) development with SMYD2 pharmacologic repression when indicated.

Figure 7. SMYD2 pharmacologic inhibition prevents breast cancer metastasis

(A) Schematic of xenografts schedule of engineered MDA-MB-231 cells.

(B-C) Representative visualization (B) and quantification (C) of xenografts tumor development using engineered MDA-MB-231 cells.

FIGURE LEGENDS

(D-E) Representative visualization (D) and quantification (E) of breast cancer patient derived xenografts (PDX) development with SMYD2 pharmacologic repression when indicated.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1. SMYD2 ablation in mice does not affect mammary tumor onset, growth, or histology. Related to Figure 1

(A) Schematic of the *Smyd2* conditional allele. In the presence of Cre recombinase, exon 3 is deleted to disrupt SMYD2 expression.

(B) Deletion of *LoxP*-flanked *Smyd2* exon 3 of the conditional allele determined by PCR.

(C) Overall survival of *PyMT* (n = 14, median survival = 155 days) and *PyMT;Smyd2* (n = 14, median survival = 155 days) mutant mice. *P* values were determined by log-rank test.

(D) Mammary tumor-free survival (determined by palpation performed three times a week) of *PyMT* (n = 14, median survival = 155 days) and *PyMT;Smyd2* (n = 14, median survival = 155 days). *P* values were determined by log-rank test.

(E) Histopathological examination of the mammary tissues of *PyMT* and *PyMT;Smyd2* mutant mice at 6 and 12 weeks of age (n = 6 for each genotype and timepoint) indicate presence of low-grade cystic lesions (at 6 weeks) and high-grade carcinoma (at 12 weeks). Images are representative of three random fields per group. Scale bars: 100 μ m.

Supplementary Figure 2. SMYD2 promotes breast cancer metastasis. Related to Figure 2

(A) Boxplots showing SMYD2 expression levels in different groups of breast cancers based on their TNM status (TCGA BRCA samples). The considered groups are: non-tumor samples ("Normal"), all tumor samples of the dataset ("Total tumoral"), localized non aggressive tumors < 2 cm, not including ductal carcinoma ("T1N0", 150 samples), all tumors except aggressive ones ("Non-aggressive", 1054 samples), tumors with distant metastasis and/or invasion of the regional lymph node N3, ("Aggressive ", 111 samples), tumors with distant metastases at diagnosis or later ("Distant metastases", 51 samples), and metastatic

FIGURE LEGENDS

tumors at diagnostic (M1, 20 samples). The expression levels of SMYD2 are shown in units of log-transformed FPKM (see Materials and Methods). n.s., not significant (ANOVA p-value = 0.983).

(B) Bioinformatic analysis of SMYD2 expression prognostic survival value in non-aggressive breast cancers of the TCGA-BRCA cohort (939 samples of non-aggressive tumors with available survival data). The threshold between low and high SMYD2 expression groups was set to the median expression of SMYD2. (logrank p-value = 0.793).

(C) Representative images of xenografts tumor development using BT20 and MDA-MB-231 breast cancer cells repressed or not for SMYD2.

Supplementary Figure 3. SMYD2 methylates BCAR3 in breast cancer cells. Related to Figure 3

(A) Full scatter plot representation of SMYD2 SILAC 3xMBT pulldown related to Figure 3A.

(B) Autoradiogram of a radiolabeled methylation assay using recombinant SMYD2 on recombinant BCAR3 and p53 (Top panel), and Coomassie stain of proteins in the reaction (Bottom panel).

(C) Specific recognition of BCAR3 K334me1 peptides by the anti-BCAR3 K334me1 antibody by dot blot analysis using the indicated biotinylated peptides. Blot probed with anti-streptavidin antibody shown as loading control.

(D) Immunodetection of BCAR3 methylation by SMYD2 after non radiolabeled methylation assay using recombinant SMYD2 on recombinant WT or K334A (K>A) BCAR3 (Top panel), and Coomassie stain of proteins in the reaction (Bottom panel).

(E) Immunodetection of BCAR3 methylation as in (D), with pharmacologic inhibition of SMYD2 using BAY-598 at different concentration.

FIGURE LEGENDS

(F) Quantification of BCAR3 and SMYD2 expression in different breast cancer cell lines, related to Fig 3F. Error bars represent mean \pm SD.

(G-H) Immunodetection of endogenous BCAR3 K334me1 and its loss upon SMYD2 genetic repression in MDA-MB-468 (G) and MDA-MB-231 (H) cell lines.

(I) Absence of BCAR3 K334me1 immunodetection in MCF7 cell line.

Supplementary Figure 4. SMYD2-BCAR3 signaling promotes cell migration and invasiveness. Related to Figure 4

(A) Immunoblot analysis with indicated antibodies of engineered MCF7 cells with WT or K334A (K>A) BCAR3 GFP-HA stable expression.

(B) Proliferation index of engineered MCF-7 cells presented in (A).

(C) Representative examples of collective migration assay (wound healing assay, left) and related wound area quantification (right) of engineered MCF-7 cells. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, n.s. not significant, by two-way ANOVA with Tukey's testing for multiple comparisons, error bars represent mean \pm SD.

(D) 3D reconstruction of spheroid edge depicting engineered MDA-MB-231 cells protrusions, related to Figure 4D.

(E) Immunoblot analysis (left) and quantification (right) of EMT markers expressions in engineered MDA-MB-231 cells. Error bars represent mean \pm SD.

Supplementary Figure 5. Lysine methylation of BCAR3 recruits FMNLs. Related to Figure 5

(A) Immunoblot analysis with indicated antibodies in different breast cancer cell lines.

(B) Immunodetection of FMNL2/3 and BCAR3 co-immunoprecipitation after GFP-BCAR3 enrichment in different engineered MDA-MB-231 cells.

FIGURE LEGENDS

(C) Ribbon model superposition of the different FH3 armadillo-repeats domains of FMNL1, FMNL2, FHOD1 and DIAPH1 formins, based on available deposited structures (PDBe of FMNL1: 4ydh; FMNL2: 4yc7; FHOD1: 3dad; DIAPH1: 3eg5).

(D) Sequence alignment of FMNL1, 2 and 3 showing a strict conservation of all aromatic and aliphatic residues identified in Figure 5G.

(E) Structural homology of the FMNL1 and 2 hydrophobic pockets depicted around key residues identified in Figures 5G and Supplementary Figure S5D for BCAR3me recognition.

Supplementary Figure 6. BCAR3 methylation recruits FMNLs to lamellipodia and regulate cytoskeleton protrusions. Related to Figure 6

(A) Representative images of BCAR3 localization with lamellipodia visualized by F-Actin (phalloidin, red) in MDA-MB-231 cells. A zoom of BCAR3 enrichment in lamellipodia is provided.

(B) Representative images of SMYD2 localization with lamellipodia visualized by F-Actin (phalloidin, red) in MDA-MB-231 cells. A zoom of SMYD2 enrichment in lamellipodia is provided.

(C) Immunodetection of BCAR1 and BCAR3 co-immunoprecipitation after BCAR3-GFP enrichment in different engineered MDA-MB-231 cells.

(D) Immunodetection of BCAR1, BCAR3 and FMNL3 co-immunoprecipitation after Flag-FMNL3 enrichment in different engineered MDA-MB-231 cells.

(E) Quantification of lamellipodia number in engineered MDA-MB-231 cells. Boxes represent 25th to 75th percentile, whiskers: 10% to 90%, center line: median; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ by Welch ANOVA with Games-Howell's testing for multiple comparisons.

FIGURE LEGENDS

(F) Quantification of lamellipodia area in engineered MDA-MB-231 cells. Boxes represent 25th to 75th percentile, whiskers: 10% to 90%, center line: median; **** $P < 0.0001$; n.s. not significant by Welch ANOVA with Games-Howell's testing for multiple comparisons.

(G) Representative immunofluorescence images (left) and signal quantification (right) of F-Actin protrusion (phalloidin, red) in engineered MCF-7 cells. Boxes represent 25th to 75th percentile, whiskers: 10% to 90%, center line: median; **** $P < 0.0001$ by Welch ANOVA with Games-Howell's testing for multiple comparisons.

Supplemental Figure 7. SMYD2-BCAR3-FMNLs axis drive breast cancer metastasis.
Related to Figure 7

(A) Schematic of experimental metastasis induction by intravenous injection of MDA-MB-231 cells with indicated treatment and analysis timepoints.

(B) HE staining of lungs from NSG mice with intravenous injection of control, SMYD2 knockdown (shSMYD2), BCAR3 knockdown (shBCAR3) or BCAR3 wildtype or mutant restored MDA-MB-231 cells, $n = 6$ for each treatment group.

(C) Quantification of lung metastasis as in (A). Data are represented as mean \pm s.e.m. P -values were determined by two-way ANOVA with Tukey's testing for multiple comparisons. Box plots, the line indicates the median, the box marks the 75th and 25th percentiles and the whiskers indicate the minimum and maximum values. **** $P < 0.0001$.

(D) Schematic of experimental metastasis induction by intravenous injection of MDA-MB-231 cells with SMYD2i treatment as indicated.

(E) HE staining of lungs from NSG mice with intravenous injection of MDA-MB-231 cells treated with SMYD2i or control (vehicle), $n = 6$ for each treatment group.

(F) Quantification of lung metastasis as in (A). Data are represented as mean \pm s.e.m. P values were determined by two-tailed unpaired t-test. Box plots, the line indicates the

FIGURE LEGENDS

median, the box marks the 75th and 25th percentiles and the whiskers indicate the minimum and maximum values.

FIGURE LEGENDS

STAR★ METHODS

Key resources table

REAGENT OR RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
BCAR3	Cell Signaling Technologies	Cat# 24032
BCAR3	Bethyl	Cat# A301-671A
BCAR3 (mouse specific)	Proteintech	Cat# 13628-1-AP
BCAR3 K334me1	This paper	N/A
Biotin	Jackson ImmunoResearch	Cat# 200-032-211
Cleaved Caspase 3	Cell Signaling Technologies	Cat# 9664
E-Cadherin	Cell Signaling Technologies	Cat# 3195
FMNL1	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-390466
FMNL2	Abcam	Cat# ab57963
FLAG	Sigma-Aldrich	Cat# F1804
GST	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-138
HA	Cell Signaling Technologies	Cat# 3724
Ki67	BD Bioscience	Cat# 550609
N-Cadherin	Abcam	Cat# ab98952
P130/Cas	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-20029
Tubulin	Millipore	Cat# 05-661
Vimentin	Abcam	Cat# ab137321
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch	Cat# 715-035-151
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch	Cat# 711-035-152
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11034
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-21244
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-32723
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-21236
Bacterial and Virus Strains		
<i>E. coli</i> Top10	Thermo Fisher Scientific	Cat# C404010
<i>E. coli</i> BL21	Thermo Fisher Scientific	Cat# C6070-03
<i>E. coli</i> BL21-Rosetta 2	Millipore	Cat# 71402
<i>E. coli</i> BL21-Arctic	Agilent	Cat# 230191
Biological Samples		
Human Cancer Tissue Array	This Paper	N/A
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
DMEM Medium	Corning	Cat# MT10017CV
Penicillin-Streptomycin	Corning	Cat# MT30002CI

FIGURE LEGENDS

Fetal bovine serum	Thermo Fisher Scientific	Cat# 10500056
PBS	Corning	Cat# MT21031CV
Trypsin-EDTA 0.25%	Corning	Cat# MT25053CI
Blasticidin S	Thermo Fisher Scientific	Cat# A1113903
Hygromycin B	Corning	Cat# 30240CR
Doxycycline	Sigma-Aldrich	Cat# D9891
G418 Sulfate	Corning	Cat# MT30234CI
Puromycin	Thermo Fisher Scientific	Cat# A1113802
Texas Red™-X Phalloidin	Thermo Fisher Scientific	Cat# T7471
DAPI	Thermo Fisher Scientific	Cat# D1306
Hoescht 33341	Thermo Fisher Scientific	Cat# H3570
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	Cat# 4693159001
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific	Cat# 78420
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich	Cat# P7626
Glutathione Sepharose 4B	Sigma-Aldrich	Cat# GE17-0756-01
Ni-sepharose Fast flow	GE Healthcare	Cat# 17-8318-06
Anti-HA magnetic beads	Pierce	Cat# 88836
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Thermo Fisher Scientific	Cat# 65601
Dynabeads protein-A	Thermo Fisher Scientific	Cat# 10002D
Coomassie Plus Assay	Thermo Fisher Scientific	Cat# 23236
Coomassie GelCode Blue	Thermo Fisher Scientific	Cat# 24590
Matrigel	Corning	Cat# 354248
Collagen I rat tail	Corning	Cat# 354236
Fibronectin Bovine plasma	Sigma-Aldrich	Cat# F1141
L-Reduced glutathione	Sigma-Aldrich	Cat# G4251-25G
S-adenosyl-methionine	New England Biolabs	Cat# B9003S
S-Adenosyl-L-[methyl-3H] methionine	American Radiolabeled Chemicals	Cat# ART0288
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific	Cat# 11668019
NP-40	Sigma-Aldrich	Cat# I8896
DMSO	Sigma-Aldrich	Cat# D5879
16% Formaldehyde (w/v)	Sigma-Aldrich	Cat# F8775
PVDF membrane (0.2 µm)	BioRad	Cat# 1620177
PVDF membrane (0.45 µm)	Millipore	Cat# IPVH00010
Bovine Serum Albumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific	Cat# BP9703100
Polybrene	Sigma-Aldrich	Cat# TR-1003-G
Hydroxypropyl methylcellulose	Sigma-Aldrich	Cat# 09963
Doxycycline hyclate diet	Envigo Teklad	Cat# TD.01306
BAY598	MedChemExpress	Cat# HY-19546
BCAR3 peptide me0 Biotin-DRRALSL{K}AHQSESY	Covalab	N/A
BCAR3 peptide me1 Biotin-DRRALSL{LYS(me1)}AHQSESY	Covalab	N/A
GST-SMYD2	This paper	N/A
GST-SMYD2 F184A	This paper	N/A
GST-BCAR3	This paper	N/A
GST-BCAR3 K334R	This paper	N/A

FIGURE LEGENDS

GST-BCAR3 K5R	This paper	N/A
GST-FMNL1	This paper	N/A
GST-FMNL2	This paper	N/A
GST-FMNL3	This paper	N/A
GST-FMNL3 (1-382) -Hisx6	This paper	N/A
Critical Commercial Assays		
ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit	Zymo	Cat# D4211
ZymoPURE II Plasmid Maxiprep Kit	Zymo	Cat# D4203
DAB Substrate Kit	Abcam	Cat# ab64238
Vectastain ABC kit	Vector Laboratories	Cat# PK-6100
Duolink® In Situ Detection Reagents Orange	Sigma-Aldrich	Cat# DUO92007
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Rabbit PLUS	Sigma-Aldrich	Cat# DUO92002
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Mouse MINUS	Sigma-Aldrich	Cat# DUO92004
BCA Protein Assay Kit	Pierce	Cat# 23227
ECL Substrate	Amersham	Cat# RPN2106
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	PromoKine	Cat# PK-CA91-1096
Site-directed mutagenesis kit	Agilent	Cat# 200523
µ-Slide 4 Well Ph+	Ibidi	Cat# 80446
Culture-Insert 4 Well in µ-Dish 35 mm, high	Ibidi	Cat# 80466
MACS tumor cell dissociation kit	Miltenyi Biotec	Cat# 130-095-929
MACS mouse cell depletion kit	Miltenyi Biotec	Cat# 130-104-694
Deposited Data		
Original Blot Images Data	This paper	Mendeley Data
Experimental Models: Cell Lines		
Human: 293T	ATCC	Cat# CVCL_0063
Human: MCF7	ATCC	Cat# CVCL_0031
Human: MDA-MB-157	ATCC	Cat# CVCL_0618
Human: MDA-MB-231	ATCC	Cat# CVCL_0062
Human: MDA-MB-453	ATCC	Cat# CVCL_0418
Human: MDA-MB-468	ATCC	Cat# CVCL_0419
Human: SUM159-M1a	PMID: 33723425	N/A
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: <i>MMTV-PyTM</i>	The Jackson Laboratories	Strain# JAX 002374
Mouse: <i>MMTV-Cre/Line D</i>	The Jackson Laboratories	Strain# JAX 003553
Mouse: <i>Smyd2^{LoxP/LoxP}</i>	MMRRC	Strain# 049783-UCD
Mouse: <i>NOD.SCID-IL2Rg^{-/-}</i> (NSG)	The Jackson Laboratories	Strain# 005557
Oligonucleotides		
shRNA non-targeting (control) 5'-CTTCGAAATGTCCGTTCCGGT-3'	This paper	N/A
shRNA BCAR3 UTR3' human 5'-CAGAGAACCCTTTAGAATAT-3'	This paper	N/A
shRNA SMYD2 UTR3' human 5'-GTCTGAATCTTGAACCTTA 3'	This paper	N/A
Recombinant DNA		

FIGURE LEGENDS

pCMV-VSV-G	Addgene	Cat#8454
pCMV-dR8.2 dvpr	Addgene	Cat#8455
pUMVC	Addgene	Cat#8449
pGEX-6.1 GST-BCAR3	This paper	N/A
pGEX-6.1 GST-BCAR3 K5R	This paper	N/A
pGEX-6.1 GST-BCAR3 K334R	This paper	N/A
pGEX-6.1 GST-BCAR3 K334A	This paper	N/A
pGEX-6.1 GST-SMYD2	This paper	N/A
pGEX-6.1 GST-FMNL1	This paper	N/A
pGEX-6.1 GST-FMNL2	This paper	N/A
pGEX-6.1 GST-FMNL3	This paper	N/A
pGEX-6.1 GST-FMNL3 (1-382)	This paper	N/A
pCDNA HA-BCAR3	This paper	N/A
pCDNA HA-BCAR3 K334R	This paper	N/A
pCDNA HA-FMNL3	This paper	N/A
pCDNA HA-FMNL3 (1-382)	This paper	N/A
pCDNA HA-FMNL3 (382-end)	This paper	N/A
pEZY FLAG-SMYD2	This paper	N/A
pMSCV Flag-FMNL3	This paper	N/A
pSICOR BCAR3 WT -HA/GFP	This paper	N/A
pSICOR BCAR3 K334A -HA/GFP	This paper	N/A
pLKO Tet-On shBCAR3 UTR 3'	This paper	N/A
pLKO Tet-On shSMYD2 UTR 3'	This paper	N/A
pLKO.1 shSMYD2 UTR 3'	This paper	N/A
Software and Algorithms		
Prism 8	GraphPad	https://www.graphpad.com/ ; RRID:SCR_002798
Excel for Mac 2016	Microsoft	https://www.microsoft.com/en-us/ ; RRID:SCR_016137
PreciPoint M8 ViewPoint	PreciPoint	http://www.precipoint.com/microscopy-software/viewpoint/
ImageJ – Fiji package	Freeware	http://fiji.sc/ ; RRID:SCR_002285
DiPer (analysis velocity)	Freeware	
Metamorph (microscopy)		
FEI (microscopy)		
Nikon software AO (microscopy)		
Microsoft office professional plus 2019 for PC		
Affinity designer		
Affinity photo		
GraphPad		

Resources availability

Lead Contact

- Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Nicolas Reynoird (nicolas.reynoird@univ-grenoble-alpes.fr).

Materials Availability

- Plasmids, antibody and cell lines generated in this study will be available from the lead contact upon request with a completed material transfer agreement.

Data and Code Availability

- All gene expression data utilized in the study are publicly available. Accession numbers are listed in the key resources table. Original western blot images have been deposited at Mendeley and are publicly available as of the date of publication. The DOI is listed in the key resources table.
- This study did not generate any unpublished code, software, or algorithm. All utilized codes are publicly available as of the date of publication. DOIs are listed in the key resources table.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

Experimental model and subject details

Animal models

MMTV-PyMT, *MMTV-Cre*, *Smyd2*^{LoxP/LoxP} mice have been described before (PMID: 1312220, 9336464, 21677750, 26988419). *Smyd2*^{LoxP/LoxP} mice were backcrossed to FVB/N strain for 6 generations. *MMTV-PyMT*, *MMTV-Cre* mice were maintained on an FVB/N strain background. and we systematically used littermates as controls in all the experiments. Immunocompromised female NSG mice (*NOD.SCID-IL2Rg*^{-/-}) mice were utilized for transplantation studies. All experiments were performed on 6 to 10-week-old female animals.

All animals were numbered and experiments were conducted in a blinded fashion. After data collection, genotypes were revealed and animals assigned to groups for analysis. For treatment experiments mice were randomized. None of the mice with the appropriate genotype were excluded from this study or used in any other experiments. All mice were co-housed with littermates (2–5 per cage) in pathogen-free facility with standard controlled temperature of 72 °F, with a humidity of 30–70%, and a light cycle of 12 h on/12 h off set from 7am to 7pm and with unrestricted access to standard food and water under the supervision of veterinarians, in an AALAC-accredited animal facility at the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center (MDACC). Mouse handling and care followed the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals. All animal procedures followed the guidelines of and were approved by the MDACC Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC protocol 00001636, PI: Mazur). Tumor size was measured using a digital caliper and tumor volume was calculated using the formula: $\text{Volume} = (\text{width})^2 \times \text{length} / 2$ where *length* represents the largest tumor diameter and *width* represents the perpendicular tumor diameter. The endpoint was defined as the time at which a progressively growing tumor reached 20 mm in its longest dimension as approved by the MDACC IACUC protocol (00001636, PI: Mazur) and in no experiments was this limit exceeded.

Cell lines and patient-derived cancer xenografts

All cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin-streptomycin. All cells were cultured at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. All cell lines were authenticated by short tandem repeat profiling and tested negative for mycoplasma. Metastatic PDX was obtained from the NCI Patient-Derived Models Repository (PDMR), NCI-Frederick, Frederick National Laboratory for Cancer Research: patient (age 62) tumor specimen resected from lymph node metastasis with histologically confirmed TNBC, carrying mutation in *Tp53*^{G154*}, previously treated with cyclophosphamide, doxorubicin and paclitaxel. All tumor specimens were collected after

written patient consent and in accordance with the institutional review board-approved protocols of the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center (PA19-0435, PI: Mazur).

Method details

Tumor and metastasis studies in GEM models

MMTV-PyMT; MMTV-Cre; Smyd2^{LoxP/LoxP} and *MMTV-PyMT; MMTV-Cre* female mice were euthanized at indicated time and at the endpoint. Mammary tumor-free survival was determined by palpation. Whole mammary glands or tumors and lung tissues were collected, weighed and processed for histopathological analysis. Lung metastases were analyzed by gross examination of freshly dissected lungs and histopathological review of hematoxylin and eosin HE-stained lung sections. For therapy studies mice were treated as indicated with BAY598 (50 mg/kg daily, IP), or vehicle (0.5% hydroxypropyl methylcellulose).

Experimental metastasis assays in mouse xenograft

Cancer cells were injected into the tail vein of 8-week-old female NSG mice: 2×10^5 MDA-MB-231 cells or 1×10^6 MCF7 cells. Mice were euthanized when they met the institutional euthanasia criteria for overall health condition. The lungs were collected and processed for histopathological analysis. For PDX tumor metastasis resected tissues were propagated by orthotopically implanting small tumor fragments into the mammary fat pad of female NSG mice. Next, tumors were resected and dissociated into single cells using MACS tumor cell dissociation kit according to the manufacturer protocol. The dissociated human tumor cells were then isolated from the contaminating mouse cells using MACS mouse cell depletion kit following the manufacturer protocol. The cell viability and count were determined using Countess II automated cell counter and approximately 5×10^5 cells were injected in female NSG mice tail vein to facilitate experimental metastasis. Mice were euthanized when they met the institutional euthanasia criteria for overall health condition. For SMYD2 inhibitor therapy studies cells were pretreated with 5 μ M BAY598 for 5 days before injection. Mouse models were treated as indicated with BAY-598 (50 mg/kg daily, IP), or vehicle (0.5%

hydroxypropyl methylcellulose). For inducible expression models, cancer cells were pretreated with doxycycline (100ng/ml) for 5 days before injection and mice were fed with 625 mg/kg Doxycycline hyclate diet starting at 5 days before cancer cells injection and were maintained on this diet for the remainder of the experiment.

Histology and immunohistochemistry

Tissue specimens were fixed in 4% buffered formalin for 24 hours and stored in 70% ethanol until paraffin embedding. 3 μ m sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) or used for immunohistochemical studies. Immunohistochemistry (IHC) was performed on formalin-fixed, paraffin embedded mouse and human tissue sections using a biotin-avidin HRP conjugate (Vectastain ABC kit) method as described before (Mazur et al., 2014). The following antibodies were used (at the indicated dilutions): cleaved Caspase 3 (1:100), Ki67 (1:1,000). Sections were developed with DAB substrate and counterstained with hematoxylin. Pictures were taken using a PreciPoint M8 microscope equipped with the PointView software. Analysis of the tumor area and IHC analysis was done using ImageJ software.

Bioinformatic analyses

Gene expression study was performed using RNA-seq data of breast cancer samples available from the public repository of The Cancer Genome Atlas (TCGA-BRCA). We downloaded the RNA-seq values normalised by FPKM method directly provided by the TCGA data portal. The FRKM values were then log-transformed by taking $\log_2(1+FPKM)$. The TCGA-BRCA cohort contains 97 normal and 1186 tumour breast samples. Several bio-clinical data are also available, including TNM status, information about distant metastasis and disease-free survival data. The follow-up ranges from 0.9 to 285.2 months with median disease-free survival time at 122.3 months. The number of events (relapses or deaths) is 193, corresponding to 18% of the patients.

All statistical tests were performed with Python software. To compare distributions of expression levels in different groups of breast cancer, we used the analysis of variance (ANOVA) between the groups. To estimate correlations between the expression levels of SMYD2 and the other genes, we computed the Spearman's rank correlation coefficient. For survival analysis, we introduced an expression threshold for SMYD2 gene and considered two groups of patients, those for whom the expression level of the gene in the tumour was

below the threshold (group of “low” expression) and those for whom it was above the threshold (group of “high” expression). The threshold was set up to the median expression value of SMYD2. We then compared disease-free survival probabilities between the two groups of patients of “low” or “high” expression using the logrank statistical test. We considered the association with survival significant if the obtained logrank p-value was less than 0.05. The survival analysis was performed using “lifelines” package of Python.

Cell culture, transfections, and transductions

For transient expression cells were transfected with Lipofectamine 2000 transfection reagent and collected 36 h after transfection. For stable expression, 293T cells were transfected with lentiviral pSICOR (GFP/HA-tagged BCAR3 WT and K334A) using the packaging vectors pVSVg and pΔ8.2 and retroviral pMSCV (FLAG-tagged FMNL3) construct using packaging pVSVg and pUMCV vectors. Virus were then collected and filtrated and used for infection of relevant cells. For GFP-expressing cells, positive cells were sorted by Fluorescent Activating Cell Sorting (FACS). Cells expressing FMNL3 were selected with a treatment of 10 μg/ml blasticidin for two weeks. For constitutive or inducible knockdown, cells were transfected with pLKO.1 or pLKO-Tet-On vectors containing specific shRNA target sequences, using the packaging vectors pVSVg and pΔ8.2. Virus were then collected and filtrated and used for infection of relevant cells, followed by 2 μg/ml puromycin selection for one week. All cells were cultured at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂.

Identification of SMYD2 substrates.

The list of potential SMYD2 substrates was generated based on the SILAC-3xMBT pulldown method already described (Carlson et al. 2015b). Briefly, HeLa cells were cultured in either normal isotope amino acids culture condition (‘Light’, K0, R0) or using modified isotope amino acids culture condition (‘Heavy’, K6, R8) for a minimum of 2 weeks. Cells were harvested, and filtered cytoplasmic extracts from hypotonic lysis were then dialyzed against KMT reaction buffer (50 mm Tris (pH 8.0), 20 mm KCl, 5 mm MgCl₂, and 10% glycerol)

using Slide-A-Lyzer MINI dialysis devices with 3.5K molecular weight cutoff (Pierce) and cleared by centrifugation at $15,000 \times g$ for 5 min at 4 °C. 20 µg of recombinant SMYD2 or F184A mutant with N-terminal GST fusion was added to 1mg of light and heavy lysate supplemented with 100 µM AdoMet. Identical reactions were prepared in parallel, with light and heavy labels reversed. The reactions were incubated overnight 4 h at 37 °C and stopped by placing them on ice and adding 10 mM EDTA and 0.1% Triton-X. Each pair of light and heavy lysates was combined and incubated overnight on 30 µl of glutathione-Sepharose saturated with 3xMBT (Carlson et al. 2014b). Bound proteins were recovered, separated by SDS-PAGE, and processed by in-gel digestion with trypsin. Peptides were desalted using C18 stage tips (Thermo Scientific), separated by HPLC using an Eksport nanoLC 420 (AB Sciex) and analyzed with an Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Scientific). Acquisition used data-dependent selection of the top 10 ions with dynamic exclusion, followed by collision-induced dissociation or higher-energy collisional dissociation and analysis of fragment ions in the Orbitrap. Data were analyzed using MaxQuant version 1.3.0.5 (Cox and Mann 2008) with a 1% false discovery rate for proteins and peptides and allowing as variable modifications methionine oxidation; acetylation of protein N termini; and mono-, di-, and trimethylation of lysine. Candidate methylation sites were verified by manual inspection.

Identification of methylation sites

For LC-MS/MS analysis of recombinant RNF113A methylation, deuterated SAM was used to rule out possible artifactual chemical methylation *in vitro*, shifting the mass of one methyl group from 14.016 Da to 17.034 Da. After SDS-PAGE separation and Coomassie blue staining (GelCode Blue, Thermo) recombinant methylated BCAR3 (see methylation assay method) was sliced from gel and digested with modified trypsin (sequencing grade, Promega). Resulting peptides were analyzed by online nanoliquid chromatography (LC)-MS/MS (UltiMate 3000 RSLCnano and Q-Exactive HF, Thermo Scientific). For this, peptides were sampled on a 300 µm x 5 mm PepMap C18 precolumn (Thermo Scientific) and

separated on a 75 μm x 250 mm C18 columns (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 μm , Dr. Maisch). MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Scientific). Mascot Distiller (Matrix Science) was used to produce mgf files before identification of peptides and proteins using Mascot (version 2.7) through concomitant searches against database containing the sequences of proteins of interest (homemade), classical contaminants database (homemade) and the corresponding reversed databases. The Proline software (Bouyssié et al. 2020) was used to filter the results (conservation of rank 1 peptides, peptide length ≥ 7 amino acids, identity threshold of peptide-spectrum-match < 0.01 , minimum peptide-spectrum-match score of 25, and minimum of 1 specific peptide per identified protein group). Peptides of interest were subsequently targeted by LC-Parallel Reaction Monitoring using the same nanoLC-MS system. Candidate methylation sites were verified by manual inspection.

Identification of methyl-sensitive binders

BCAR3 peptides were generated by Covalab and based on the following sequence: Biotin-Ahx-DRRALSLKAHQSESY-CONH₂. For peptide pull-down, 10 μl of Streptavidin Sepharose beads (GE Healthcare) were saturated with 7.5 μg of specific biotinylated peptides in peptide buffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0.5 % NP40, 0.5 mM DTT, 10 % glycerol, complete protease inhibitors (Roche)) for 2 h at 4°C under rotation. Next, beads were washed in the peptide buffer and incubated for 4 h at 4°C under rotation with 1mg of HeLa cytoplasmic extract prepared from cells cultivated in either normal isotope amino acids culture condition ('Light', K0, R0) or using modified isotope amino acids culture condition ('Heavy', K6, R8). A 2-way experiments was performed, the 'forward' condition combining BCAR3-K334me0 peptide with light extract and BCAR3-K334me1 peptide with heavy extract, the 'reverse' condition combining BCAR3-K334me1 peptide with light extract and BCAR3-K334me0 peptide with heavy extract. Beads of each pair of peptide pulldown were then pooled together and extracts were resuspended in Laemmli buffer. Eluted proteins were stacked in the top of a 4-12% NuPAGE gel (Invitrogen). After staining with R-250 Coomassie Blue

(Biorad), proteins were digested in-gel using modified trypsin (sequencing grade, Promega), as previously described (Casabona et al. 2013). The resulting peptides were analyzed by online nanoliquid chromatography coupled to MS/MS (Ultimate 3000 RSLCnano and Q-Exactive Plus, Thermo Fisher Scientific) using a 120 min gradient. For this purpose, the peptides were sampled on a precolumn (300 μ m x 5 mm PepMap C18, Thermo Scientific) and separated in a 75 μ m x 250 mm C18 column (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 μ m, Dr. Maisch). The MS and MS/MS data were acquired by Xcalibur (Thermo Fisher Scientific).

Peptides and proteins were identified and quantified using MaxQuant (version 1.6.2.10, Tyanova, Temu, and Cox 2016) using the Uniprot database (*Homo sapiens* reference proteome, 20180526 version) and the frequently observed contaminant database embedded in MaxQuant. Trypsin was chosen as the enzyme and 2 missed cleavages were allowed. Peptide modifications allowed during the search were: carbamidomethylation (C, fixed), acetyl (Protein N-ter, variable) and oxidation (M, variable). Minimum peptide length and minimum number of unique peptides were respectively set to seven amino acids and one. Maximum false discovery rates - calculated by employing a reverse database strategy - were set to 0.01 at peptide and protein levels. Quantification of SILAC ratios was performed using default settings. Proteins identified as outlier in both experiments are assigned as significant interactors. Amino acid complements (L-lysine-2HC, L-arginine-HCl, 2H4-L-lysine-2HCl, 13C6-L-arginine-HCl, L-proline), media and serum used for SILAC were purchased from Silantes.

Methylation assay

In vitro methylation assays were performed by using 2 μ g of recombinant proteins which were incubated overnight with 2 μ g of SMYD2 and either 0.1 mM S-adenosyl-methionine (SAM) or 0.1 mM S-adenosyl-l-methionine-d3 tetra (p-toluenesulfonate) salt (deuterated SAM, CDN isotope) or 2 μ Ci SAM[³H] (IsoBio) in buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% glycerol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂ at 30°C overnight. In the case where SMYD2 inhibitor (BAY-598) was used, the enzyme was preincubated for 1h in the buffer at 4°C with

the inhibitor or the vehicle, prior to adding substrate. The reaction mixture was resolved by SDS-PAGE, followed by autoradiography, western blotting, Coomassie stain or mass spectrometry analysis.

Expression and purification of recombinant proteins

BCAR3 and SMYD2 recombinant proteins were purified from transformed BL21 bacteria cells, induced with 0.1 mM IPTG for 16 h at 16°C. Cells were resuspended in lysis buffer containing 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.25 mg/ml lysozyme, 0.5 mM PMSF and protease inhibitors, and additionally lysed by sonication. Full length FMNL1, 2 and 3 were purified from transformed BL21 Arctic strain bacteria cells, induced with 0.25 mM IPTG for 36 h at 10°C. Cells were resuspended in high salt lysis buffer containing 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 0.25 mg/ml lysozyme, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT and protease inhibitors, and additionally lysed by sonication. The fragment FMNL3 (1-382) was purified from transformed BL21 Rosetta-2, induced with 0.25mM IPTG for 16h at 16°C. Cells were resuspended in lysis buffer containing 100 mM Tricine pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 0.25 mg/ml lysozyme, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT and protease inhibitors, GST-tagged proteins were purified using Glutathione Sepharose 4B beads and eluted in 10 mM reduced L-glutathione in 100mM Tris pH 8.0, or 100mM Tricine pH 8.0 for FMNL3 (1-382).

Peptide pulldown

To prepare the resin, 5 µg of biotinylated peptide was incubated with 4 µl streptavidin resin by gently rocking for 30 minutes at 4°C in reaction buffer containing 20 mM Bis-Tris pH 6.5, 150 mM NaCl and 0.05% NP-40. Then the resin was washed 2 times in the same buffer. For peptide pulldown with recombinant proteins, 2 µg of protein was diluted in 200 µl of reaction buffer and directly added to the washed peptide-bound resin. This solution was incubated for 3 h rotating at 4°C. The supernatant was removed, and the beads were washed 5 times with 1 ml of reaction buffer. After removal of the final wash, the beads were resuspended in 50 µl of 2x SDS loading buffer (45 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol, 1% SDS, 50 mM DTT, 0.002%

bromophenol blue). The samples were incubated at 95°C for 10 min and 5-10 µl of the sample was resolved on an 8-12% polyacrylamide gel. For peptide pulldown with protein from mammalian protein extraction, cells were first disrupted by gently rocking for 20 minutes at 4°C in lysis buffer containing 50mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA and freshly supplemented with 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF and anti-proteases. Then cell debris were discarded by centrifugation and supernatant was collected. For each pulldown experiment 500 µg to 1 mg of total protein was loaded on the washed peptide-bound resin. This solution was incubated for 16 h rotating at 4°C. The supernatant was removed, and the beads were washed 4 times with 500 µl of reaction buffer. After removal of the final wash, the beads were resuspended in 50 µl of 2× SDS loading buffer. The samples were incubated at 95°C for 10 min and 10-15 µl of the sample was resolved on an 8-12% polyacrylamide gel.

Immunoprecipitation and co-immunoprecipitation

For immunoprecipitation and detection endogenous BCAR3 methylation, cells were cultivated 48h to 72 h with either 100 ng/ml of doxycycline or 5 µM of BAY-598 (SMYD2i) before harvesting. The cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA and freshly supplemented with 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF and anti-proteases. Lysate were then incubated with magnetic beads coupled to protein-A, containing either BCAR3 antibody or BCAR3 K334me1 antibody. After 16h rotating at 4°C, beads were washed 3 times and proteins were eluted in 2× SDS loading buffer.

For immunoprecipitation of ectopic proteins, immunoprecipitation of HA-tagged BCAR3 WT or K334A was completed after transient expression in 293T cells for 36 h. Cells were lysed as before and incubated in pre-washed anti-HA resin. After 16h rotating at 4°C, beads were washed 3 times and proteins were eluted in 2× SDS loading buffer. For the co-immunoprecipitation of FMNL2/3 with HA-GFP BCAR3 in engineered MDA-MB 231, Tris-HCl was replaced with 50mM Tricine pH 7.8. The cell lysate was cleared by centrifugation, the

buffer was adjusted to 150mM NaCl and 0.1% Triton and soluble proteins were added on pre-washed anti-HA resin. Similarly, for co-immunoprecipitation of FLAG-FMNL3 with HA-GFP BCAR3 in engineered MDA-MB 231, the lysate was added on prewashed anti-FLAG resin. For endogenous co-immunoprecipitation of FMNL2/3 and BCAR3, lysate was prepared as before and added on agarose resin coupled to protein A, incubated with FMNL2/3 antibody beforehand. After overnight incubation at 4 °C with rotation, HA-resin, FLAG resin or FMNL2/3-protein A resin with bound proteins were washed three times in the same adjusted buffer. Proteins were eluted from the beads with 2× SDS loading buffer and analyzed by western blot.

Immunoblot analysis

For western blot analysis, cells were lysed in RIPA buffer with 1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail. Protein concentration was determined using the Coomassie plus assay. Protein samples were resolved by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The following antibodies were used (at the indicated dilutions): BCAR3 (human, 1:1000), BCAR3 (mouse, 1:1000), BCAR3 K334me1 (1:1000), FMNL1 (1:1000), FMNL2 (1:1000), FLAG (1:1000), GST (1:1000), HA (1:1000), Tubulin (1:2000), Secondary antibodies were used at 1:5000 dilution. Protein bands were visualized using ECL detection reagent.

Homology modelling of FMNL3 GBD-FH3 domain

The structural model of the FMNL3 GBD-FH3 domain was built by using the SWISS-MODEL server (Waterhouse et al. 2018) by adding as templates the X-ray structures of human FMNL2 GBD-FH3 / Cdc42 GppNHp (PDB code: 4YC7); and the structure of human FMNL1 (PDB code: 4YDH). The sequence identities between FMNL3 GBD-FH3 (residues 33 to 419) and FMNL1 and FMNL2 were of 80.0 and 88.6% respectively. The calculated homology model of FMNL3 GBD-FH3 domain presented a Qmean Z scores of -2.86 and 3.14, indicating a very good global-quality model (Benkert, Biasini, and Schwede 2011). The root-mean square deviations calculated in Coot (Emsley and Cowtan 2004) over carbon-alpha

atoms of FMNL3 GBD-FH3 respect to FMNL1 and FMNL2 were of 0.18 and 0.74 Å respectively. The PyMOL Molecular Graphics System (v.2.5.1, Schrodinger, LLC) was used to prepare structural figures.

In silico docking of methylated K334-BCAR3 into FMNL3 GBD-FH3 domain

The secondary structure propensity of BCAR3 residues 319 to 397 was calculated by using the prediction server PSIPred (D. T. Jones 1999), indicating that the region with residues 321 to 342, bearing Lysine 334, is predicted to fold into an helix. The three-dimensional structure of this BCAR3 helix and its docking into FMNL3 were calculated in Coot (Emsley and Cowtan 2004) via mutagenesis and local energy refinements by using as a template model the structure of Cdc42 in complex with FMNL2 (PDB code : 4YC7). Specifically, the position of methylated K334 BCAR3 was modelled by using the guanidinium group of Arginine 65 within helix 3 of Cdc42. No steric clashes or violations of the interatomic Van der Waals radii were found after BCAR3 K334me1 was placed at the hydrophobic pocket of FMNL3 GBD-FH3.

Live microscopy analysis of migration and protrusions

For collective migration with wound healing analysis, cells were seeded on Ibidi culture inserts and allowed to grow for 48-72 h until cells form a homogenous monolayer. Then, the insert was carefully removed, and cell monolayers were washed 4 times with complete DMEM. Imaging was performed right away after selecting 1 or 2 area per condition, with 1 image every 15 minutes for 24 h. Wound closure was calculated as the ratio of the area covered by the cells over the remaining empty area at each time points. For random cell migration, cells were seeded on 4-well chamber Ibidi coated pH+ and allowed to grow for 48-72 h with or without doxycycline (100ng/ml). Brightfield images were acquired with 10x objective at 37 °C with 5% CO₂ for 15 h every 5 minutes. Only cells that did not underwent mitosis for 12h were taken in account. Velocity and migration pattern of individual cells were tracked manually employing the built-in Fiji plugin Manual Tracking. Analysis of migration

speed was conducted using the program developed by (Gorelik and Gautreau 2014). For protrusion analysis, cells were seeded on 4-well chamber Ibidi coated pH+ and allowed to grow for 48-72 h with or without doxycycline (100ng/ml). Brightfield images were acquired with 33× objective at 37 °C with 5% CO₂ for 15 minutes every 3 seconds. Kymograph were generated using the built-in Fiji plugin and protrusion speed was calculated using the slope manually drawn for each lamellipodia over 12 minutes.

Spheroid invasion assay and adaptive optics

To perform the analysis 2×10^3 cells were seeded in 96-well plate with ULA round bottom, centrifugated at 300 g and allowed to grow for 24 h. Then basement membrane Matrigel was added at a concentration of 250 µg/ml and cells were centrifugated at 300 g and let in culture for 36 h until they form compact spheroid. Each spheroid was then carefully transferred into a cold and liquid collagen I mixture at 1.6 mg/ml, casted in 4-well Ibidi. Gels containing spheroids were allowed to polymerize for 2-3 h at 37°C in humified incubator. First brightfield images (t = 0 h), and last ones (48 h) of each spheroid were taken with a 10× objective in a home-made microscope chamber maintaining cell culture condition. Those images were used to quantify spheroid radial area. To measure the area of invasion, total area covered by each spheroid at t = 48h was subtracted to the initial area captured by the images acquired 3 h after spheroid embedding and referred as t = 0 h. At 48 h, gels containing spheroid were fixed in 4% PFA with 7% sucrose for 2 h at 37°C. After extensive washing, spheroids were permeabilized with PBS containing 0.2 % Triton for 30 minutes, washed 5 times in PBS and incubated with Texas-Red Phalloidin (1: 250) and Hoescht (1: 200) for 16 h at 4°C. Gels were finally washed 5 times in PBS and imaged right away. Due to their volume and the divergence index of the gel, spheroids were challenging to image without loss of focus. To circumvent this issue, we employed adaptive optics to correct optical aberrations and then get image acquisition of the cells deeper within the gel. Those images are the one chosen to illustrate spheroid morphology upon different conditions tested.

Proximity Ligation Assay (PLA)

Cells were cultivated on coated coverslips with 20 µg/ml fibronectin, washed 2 times with PBS and fixed in cold methanol at -20 °C for 5 minutes. Fixed cells were blocked with Duolink Blocking Solution for 2 h. Primary antibodies (rabbit BCAR3 K334me1, mouse HA, rabbit FLAG) were added overnight at 4 °C. PLA reactions were subsequently carried out using Duolink PLA plus and minus probes for rabbit and mouse (respectively) and Duolink In Situ Detection Reagents Orange (Sigma) following the manufacturer's protocol. Coverslip were finally mounted with Mowiol DAPI. Images were acquired with epifluorescence microscopy with 20x objective. The number of dots per cells was calculated as the ratio between the total number of dot and cell nuclei within one frame. Each frame is then represented as a point in the quantification graph.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Cells were cultivated on coated coverslips with 20 µg/ml fibronectin, washed 2 times with warm PBS and fixed in 4% PFA - 5% Sucrose at 37°C for 15 minutes. Fixed cells were then washed 5 times and permeabilized in PBS-0.1% Triton X-100 for 5 minutes. After 5 washes, specific sites were blocked using a solution of PBS-3% BSA for 1 h and coverslips were incubated overnight with indicated primary antibody for 16 h at 4°C. Coverslip were washed 3 times and incubated for 1h with dedicated secondary antibody with Texas-Red Phalloidin. After 5 extensive washing in PBS and one last in distilled water, coverslips were mounted with Mowiol DAPI and sealed.

For lamellipodia observations, images were taken with confocal spinning disk microscopy with a 40x objective for MCF-7 and a 63x objective for MDA-MB 231. Maximum intensity projection of phalloidin staining were generated with Fiji and each lamellipodia was manually outlined. For each outline, integrated density of lamellipodia fluorescence was assessed with Fiji, as well as a square near of lamellipodia without signal and referred as the background. Fluorescence intensity of lamellipodia (CTLF, for Corrected Total Lamellipodia

FIGURE LEGENDS

Fluorescence) was then calculated as below: $CTLF = \text{Integrated density (lamellipodia)} - [\text{Mean intensity (background)} \times \text{Area (lamellipodia)}]$.

For the analysis of FLAG-FMNL3 enrichment at lamellipodia, images were taken with confocal spinning disk microscopy with a 40× objective. Maximum intensity projection of phalloidin and FLAG staining were generated with Fiji and each cell as well as lamellipodia were manually outlined using phalloidin staining as template. For each outline, integrated density of cell and lamellipodia fluorescence from FLAG staining was assessed with Fiji, as well as a square near of cell without signal and referred as the background. Enrichment of FLAG-FMNL3 in lamellipodia was calculated as below: $FMNL3 \text{ (lam)} = CTLF/CTCF$ with, $CTCF = \text{Integrated density (cell)} - [\text{Mean intensity (background)} \times \text{Area (cell)}]$.

Quantification and statistical analysis

Please refer to the Figure Legends for description of sample size (n) and statistical details. All values for n are for individual mice or individual sample. Sample sizes were chosen based on statistical power calculations and previous experience with given experiments. Cell culture assays have been performed in triplicates and in two independent experiments, unless stated otherwise. Differences were analyzed mostly by logrank, two-tailed unpaired Student's t test, two-way ANOVA with Tukey's testing for multiple comparisons using Prism 8 (GraphPad), unless stated otherwise.

FIGURE PANELS

Figure 1

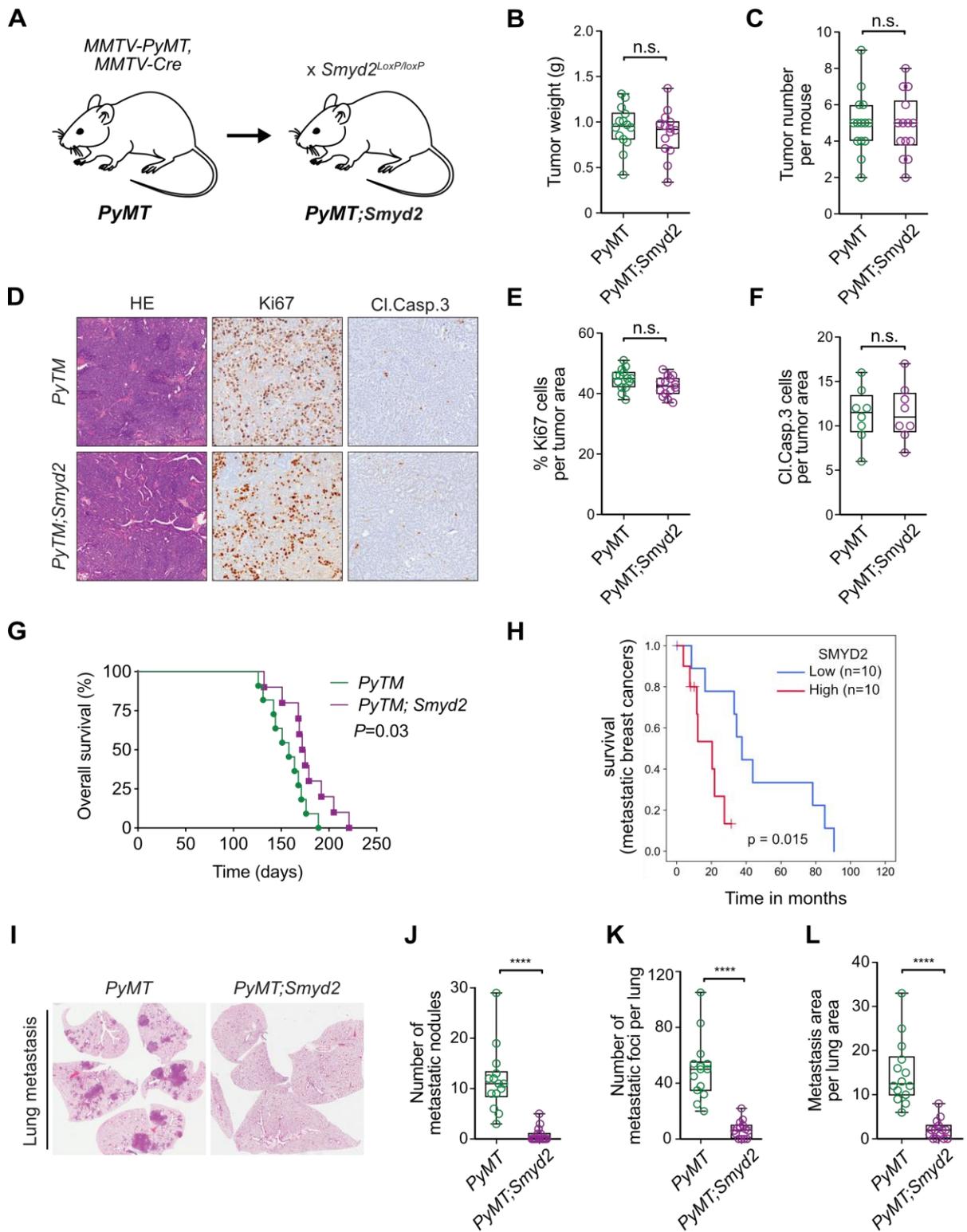


Figure 2

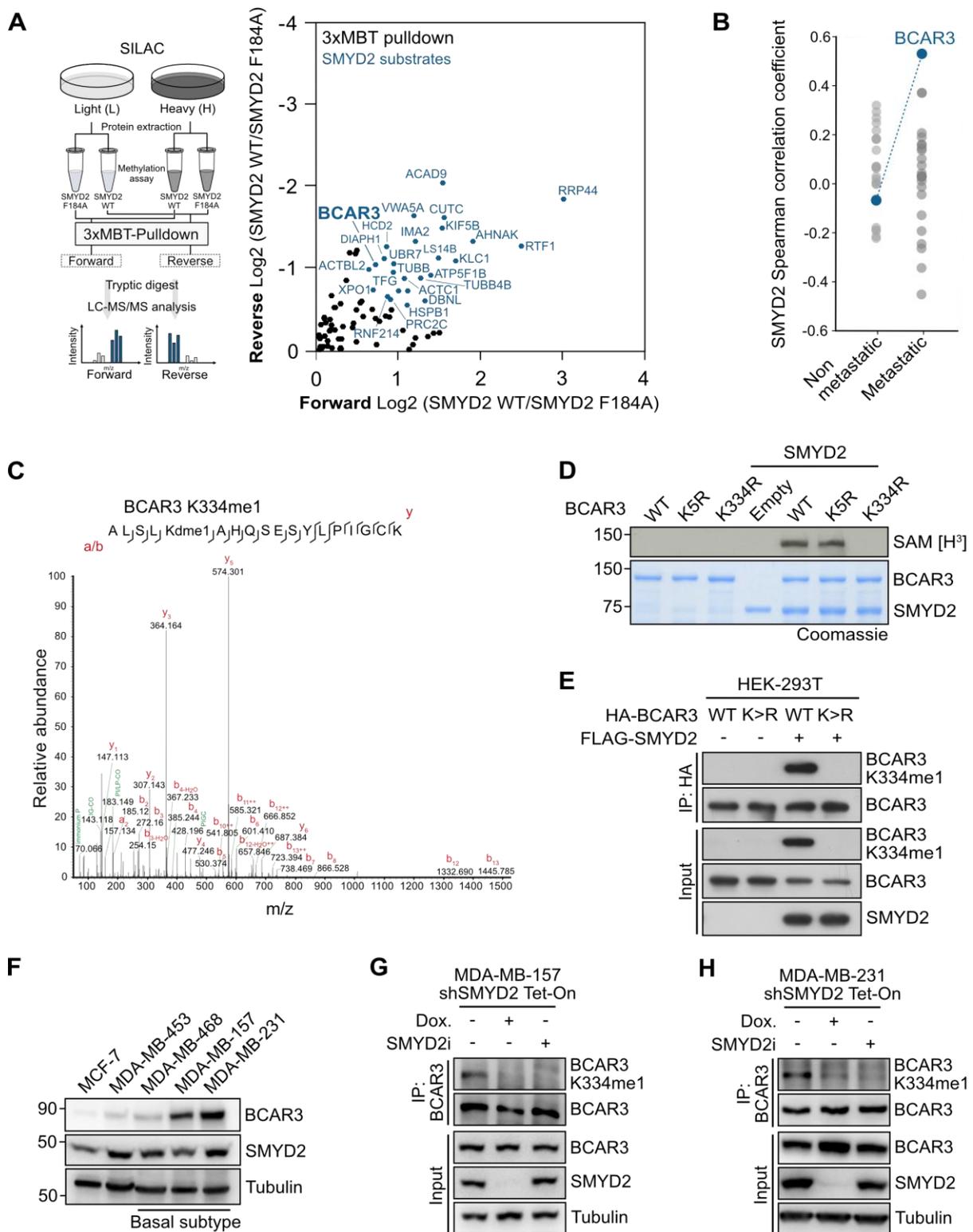


Figure 3

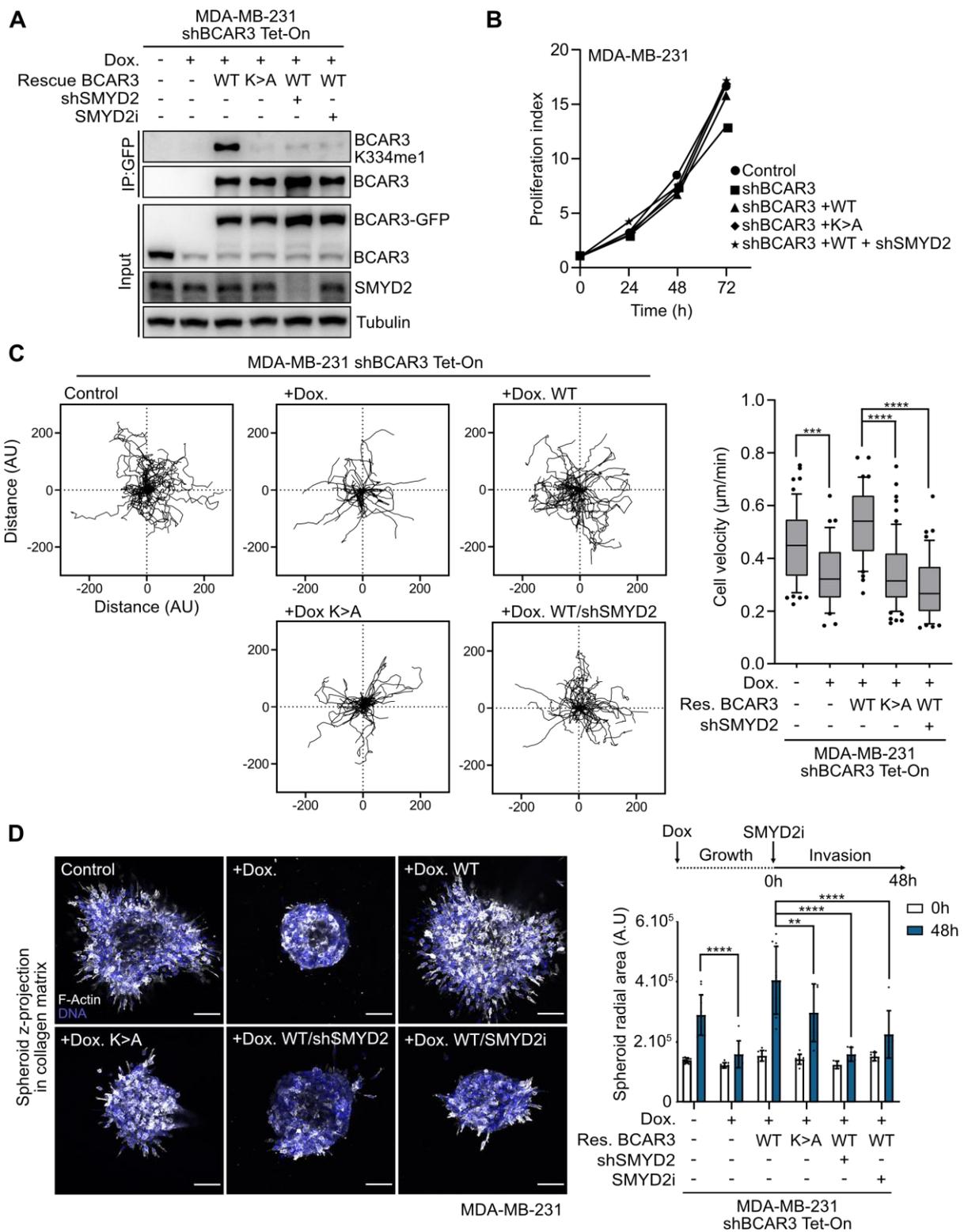


Figure 4

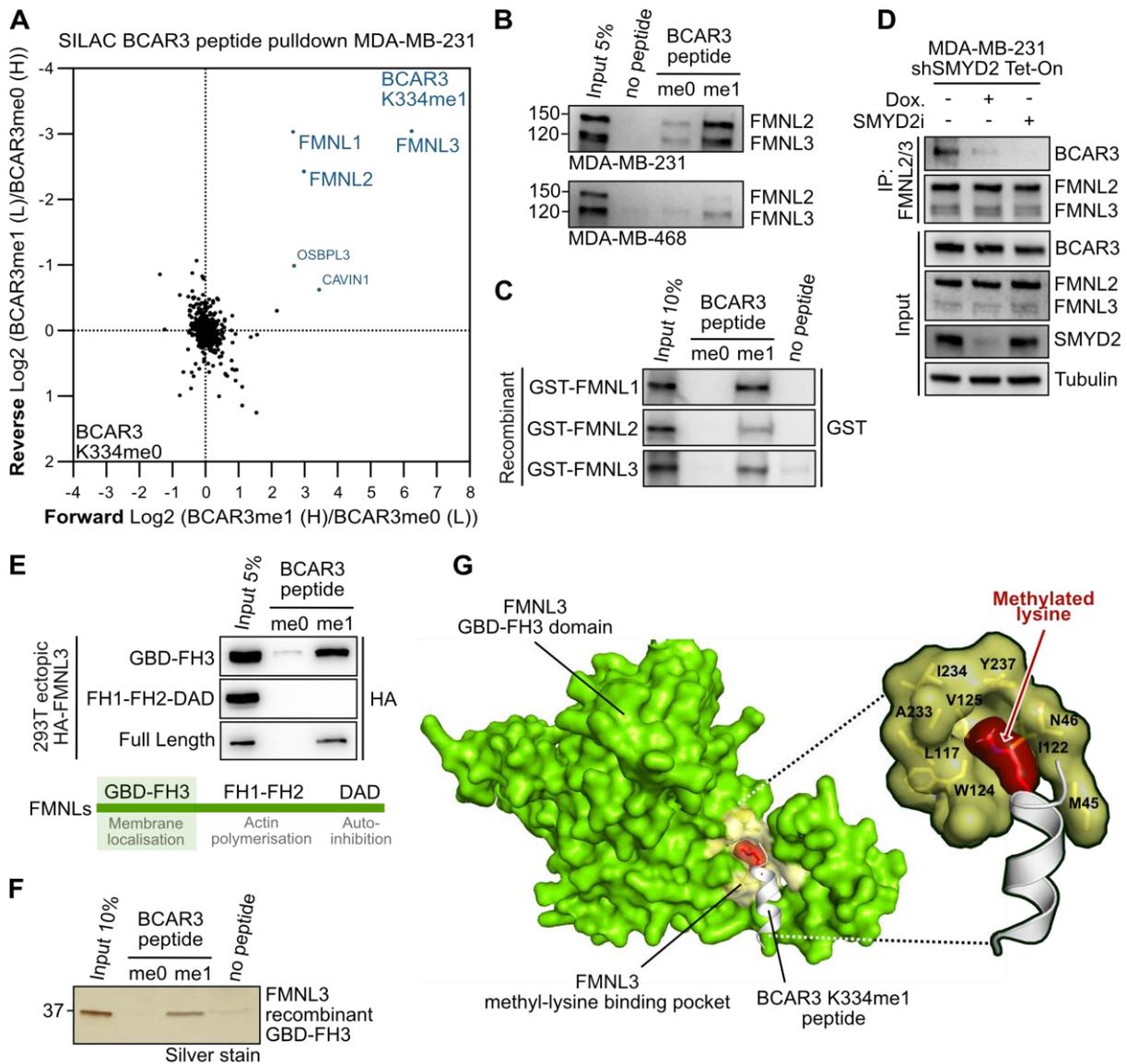


Figure 5

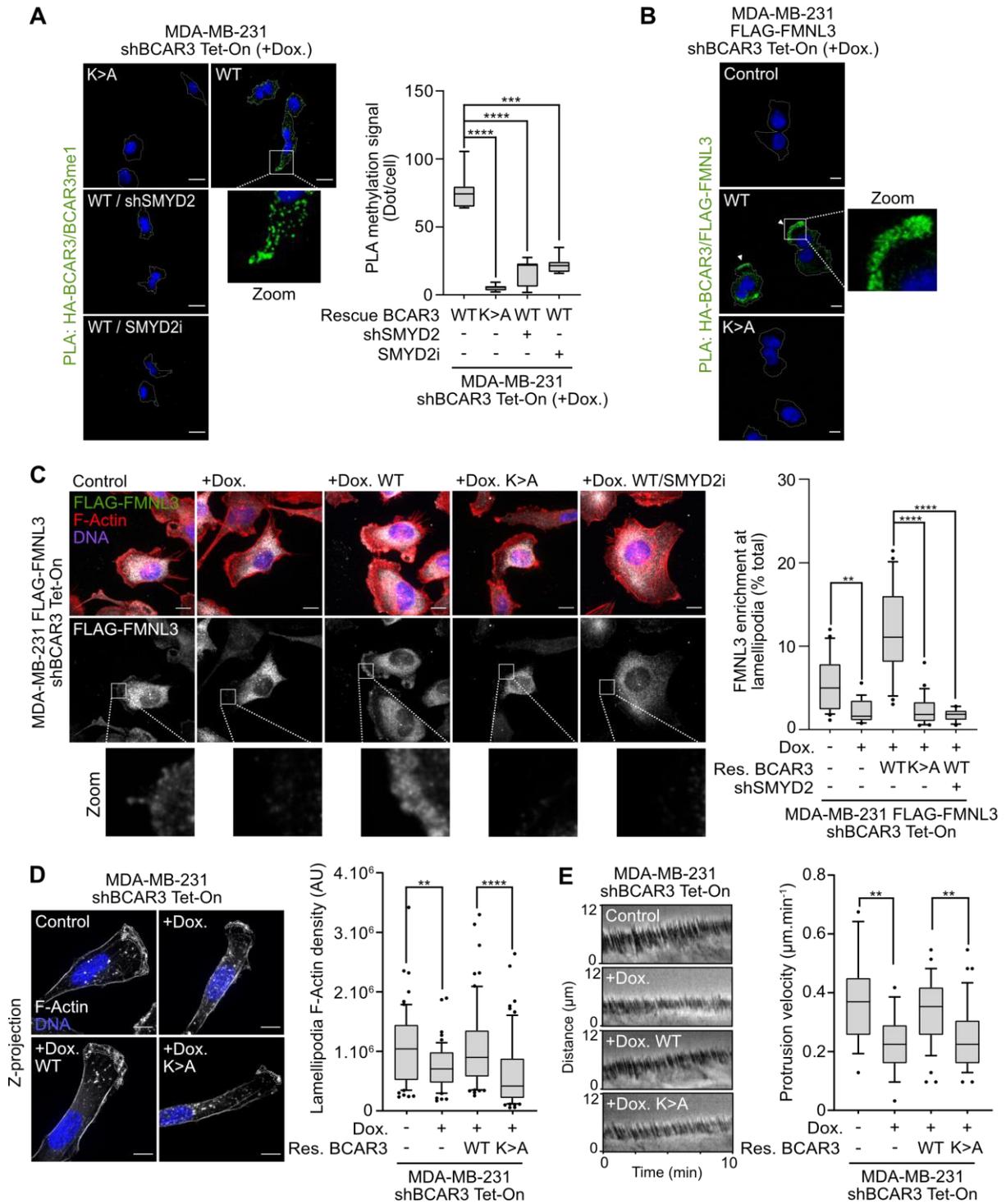


Figure 6

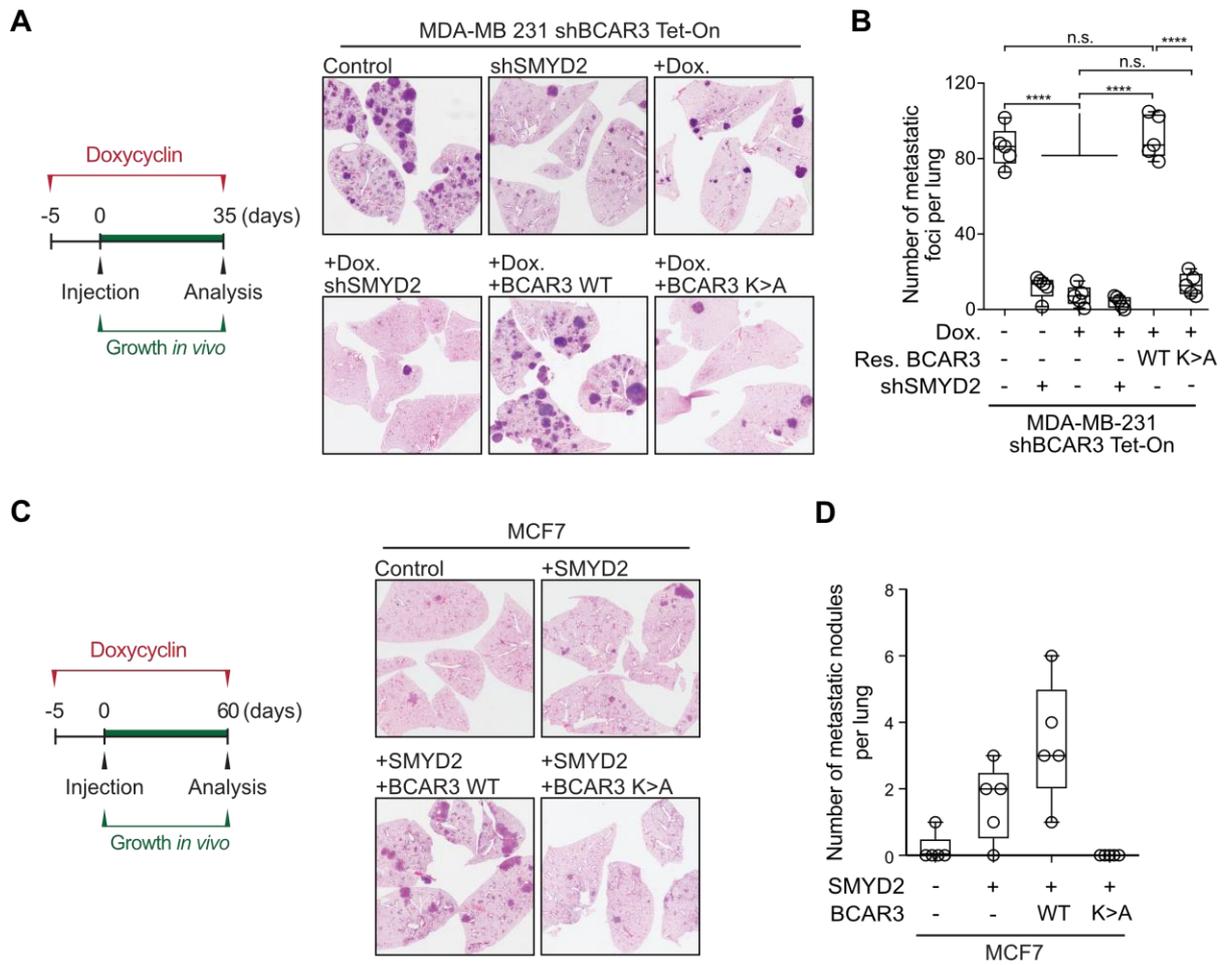
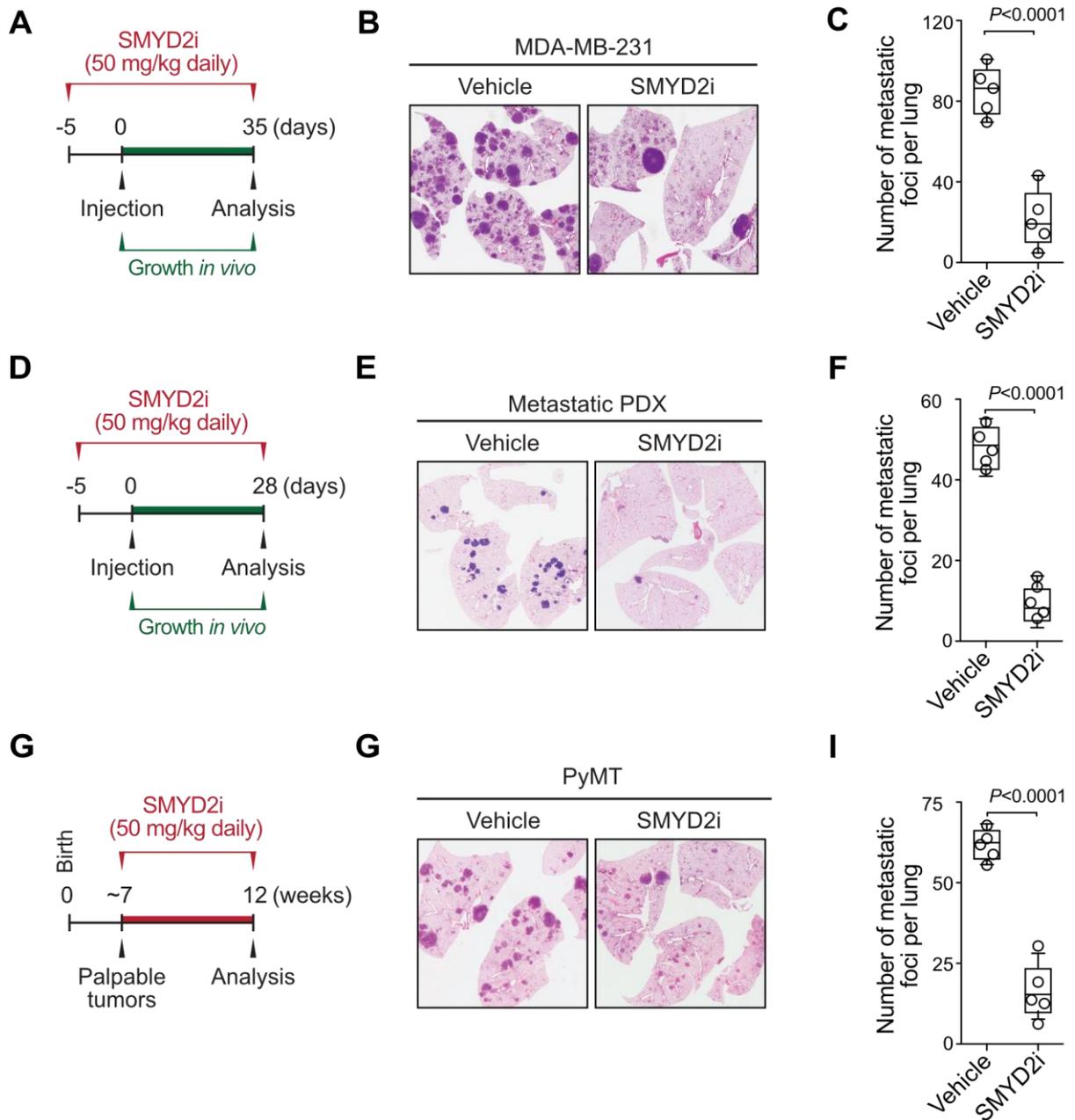
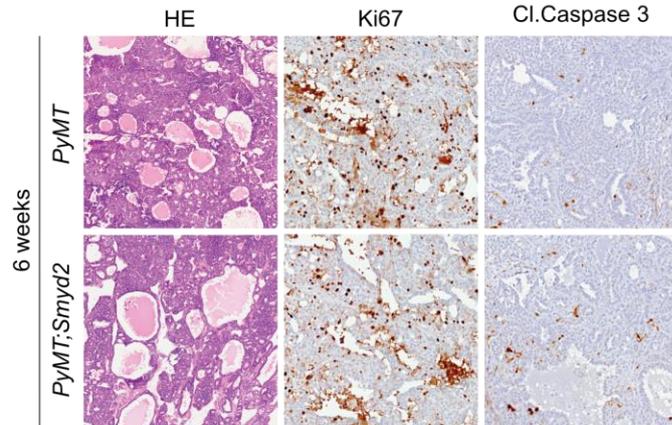


Figure 7

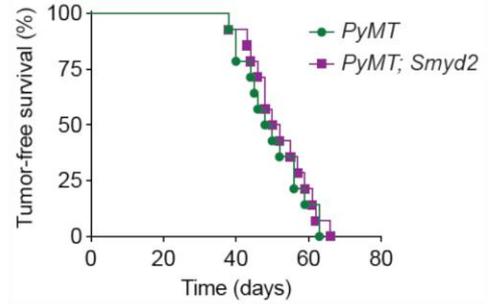


Supplementary Figure 1

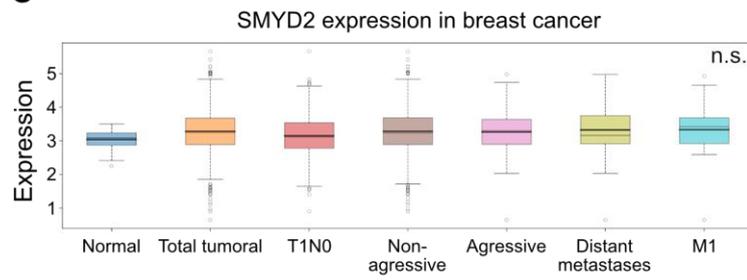
A



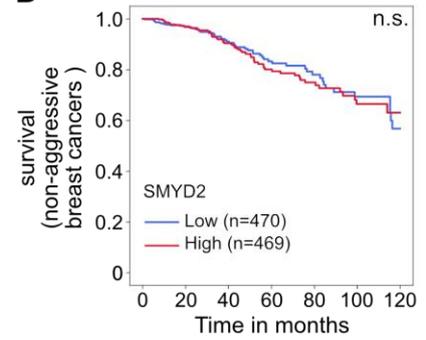
B



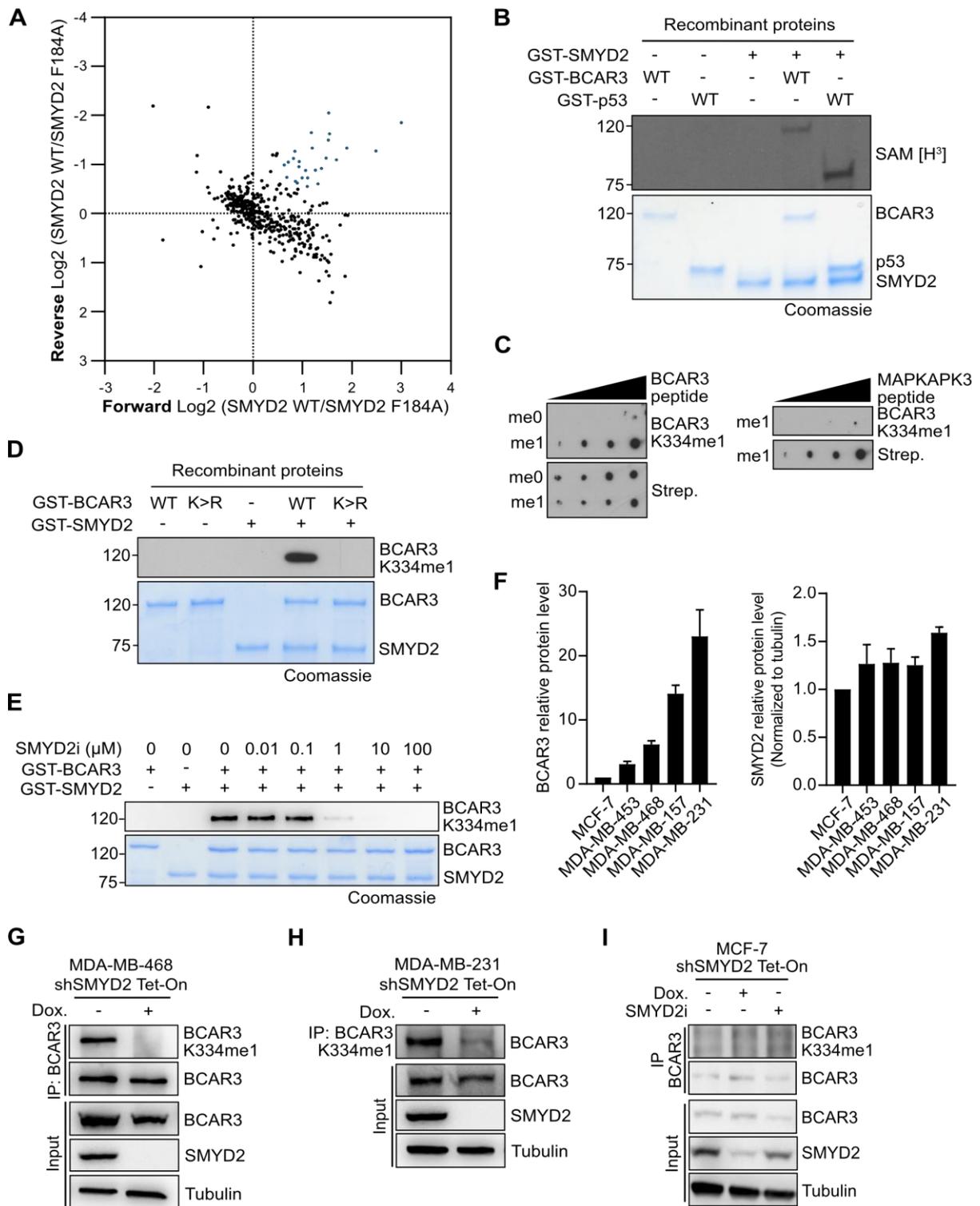
C



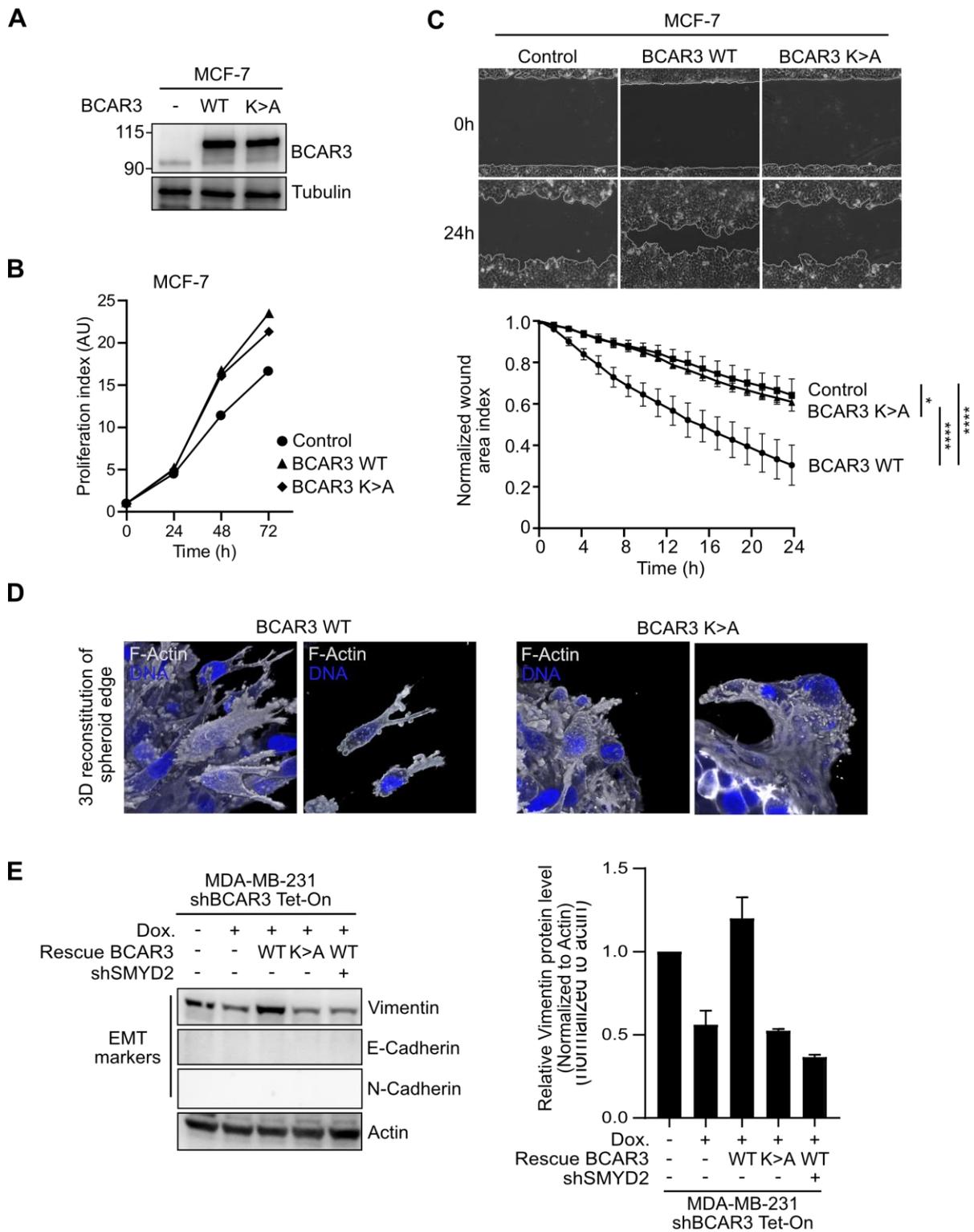
D



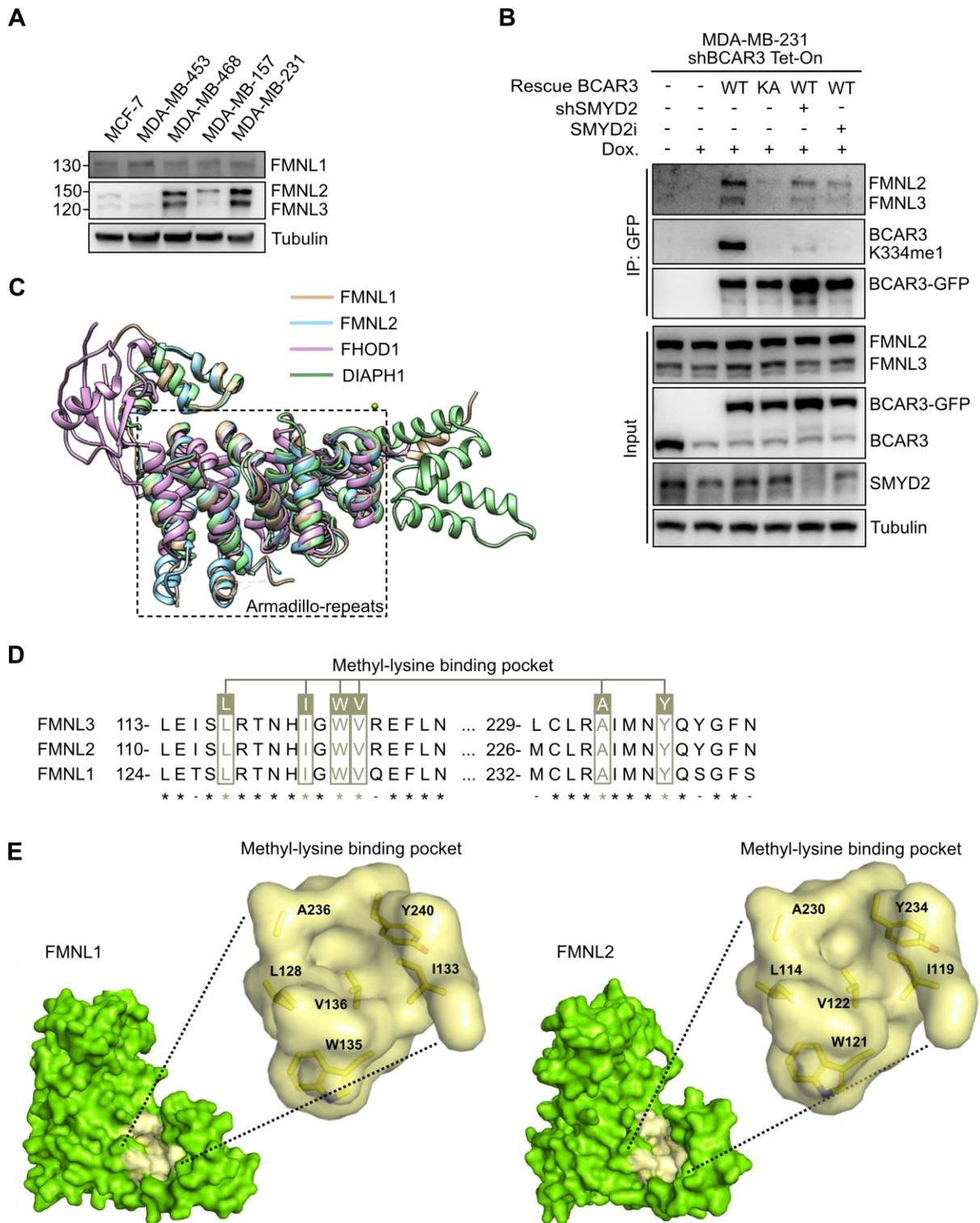
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4

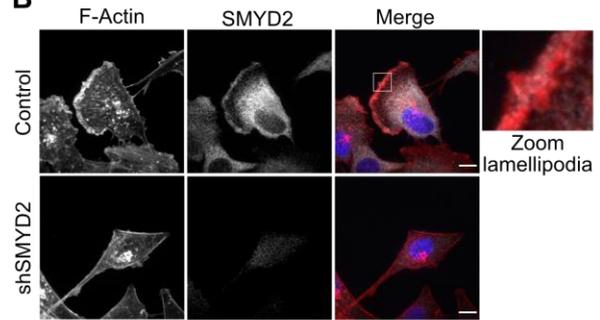


Supplementary Figure 5

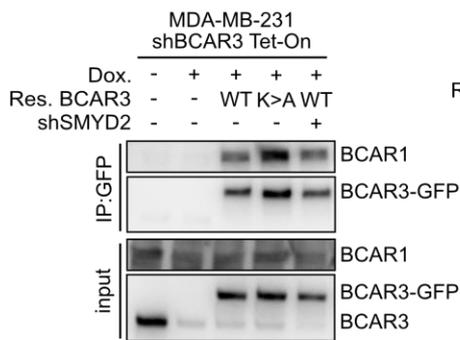
A

IF BCAR3 WT localised at lamellipodia

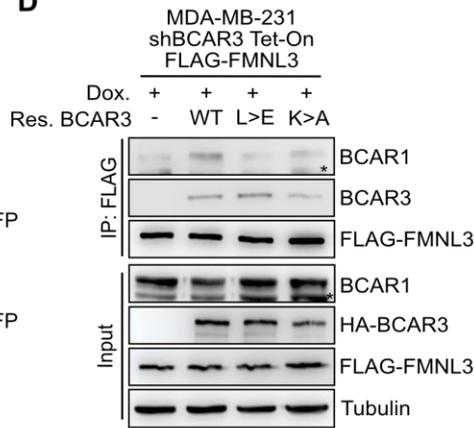
B



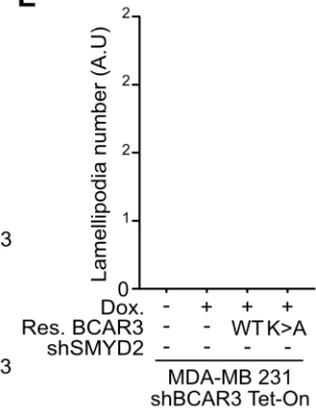
C



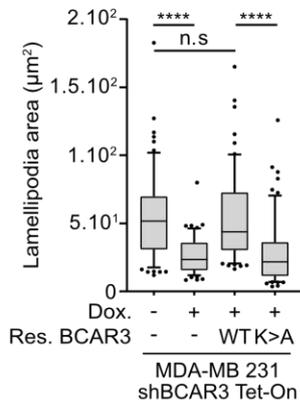
D



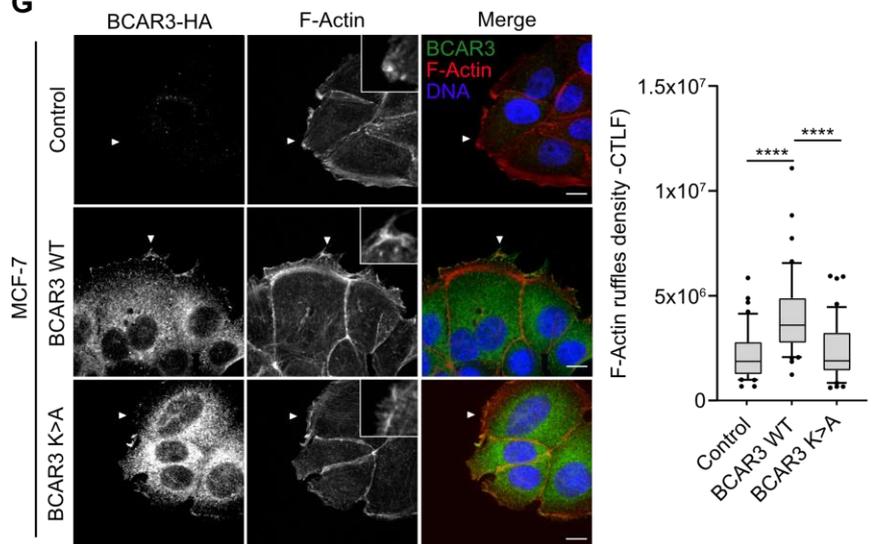
E



F



G



VIII. Discussion et perspective

Au cours de cette discussion, nous allons voyager à travers les différentes interprétations des résultats présentés dans l'article central, mais également ceux présentés dans les annexes, pour initier une réflexion sur les découvertes, les zones d'ombres restantes et les débouchés de mes travaux. Nous discuterons des liens entre SMYD2 et progression tumorale et du potentiel extrêmement prometteur de l'inhibition de SMYD2 afin de contrer la dissémination métastatique. La méthylation du nouveau substrat de SMYD2 identifié dans ce travail, la protéine BCAR3, sera mise en perspective, aussi bien au niveau moléculaire, avec les premières expériences cherchant à comprendre comment cette modification est régulée, qu'au niveau translationnel, avec son potentiel en tant que biomarqueur. Enfin, nous analyserons les conséquences fonctionnelles de cette méthylation, culminant dans une interaction avec les formines FMNLs, porteuses d'un nouveau domaine lecteur de méthylation encore non décrit

SMYD2, une nouvelle cible pour prévenir les métastases du cancer du sein

L'analyse bioinformatique que nous avons effectuée à partir de la base de données du TCGA sur le cancer du sein invasif a révélé que le niveau d'expression relatif de SMYD2 ne variait pas entre les sous-types, ni entre les différents grades. Notre analyse vient donc contraster avec les conclusions de précédentes études montrant que SMYD2 était surexprimée dans les cancers du sein de sous-type basal (L. X. Li et al. 2018a; Y. Zeng et al. 2019a). Ce sous-type regroupe essentiellement les tumeurs de plus haut grade et est globalement associé à un plus mauvais pronostic que les autres sous-types. De façon intéressante, nous avons cependant observé que les cancers métastatiques exprimant fortement SMYD2 étaient globalement de plus mauvais pronostic.

Dans cette étude nous avons utilisé le modèle murin de tumorigénèse mammaire MMTV-PyMT. Dans ce modèle, les souris développent spontanément des tumeurs mammaires qui ressemblent sensiblement à la progression et la morphologie des tumeurs humaines (Christenson et al. 2017). Au niveau transcriptionnel, les tumeurs formées sont similaires à la signature de sous-type luminal B. Cependant, la perte progressive de ER et PR, et le très faible niveau d'expression de HER2 (Lin et al. 2003), rend la progression des tumeurs MMTV-PyMT similaires à celle des cancers du sein humain de sous-type basal, de mauvais pronostic. D'ailleurs, les tumeurs MMTV-PyMT présentent une propension très importante à métastaser, avec un organotropisme quasiment exclusif aux poumons (Attalla et al. 2021b). Ce modèle était donc très intéressant afin d'étudier le rôle de SMYD2 au cours des différentes étapes de la progression tumorale mammaire *in vivo*.

Nous avons ainsi établi un modèle où SMYD2 est spécifiquement délétée des tumeurs mammaires. En absence de SMYD2 les tumeurs ne présentent pas de retard ou de défaut d'initiation, et ont une croissance similaire à celles conservant SMYD2. Ainsi nous avons pu écarter le rôle de SMYD2 dans les phénomènes d'initiation ou de croissance tumorale. Ce résultat fut néanmoins surprenant à la lumière des différentes études décrivant un rôle promouvant la prolifération des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* (Yi, Jiang, and Fang 2019b). Par ailleurs, ces résultats viennent également contraster avec la récente étude montrant que SMYD2 favorisait la croissance de xénogreffes issues des cellules triple-négatives MDA-MB 231 et MDA-MB 468 (L. X. Li et al. 2018a).

En revanche, nous avons observé que la présence de SMYD2 est absolument essentielle à la dissémination métastatique pulmonaire du modèle souris MMTV-PyMT. De plus, l'inhibition pharmacologique de SMYD2 contrecarre également la dissémination

métastatique de façon significative, indiquant que l'activité catalytique de la KMT est requise pour médier cet effet. Il est important de noter également que l'inhibiteur de SMYD2 a été ajouté à des stades où les tumeurs deviennent palpables, expliquant que quelques métastases ont pu s'établir en amont de l'inhibition de SMYD2. La croissance de ces métastases résiduelles durant le traitement avec l'inhibiteur confirme cependant que SMYD2 n'intervient pas dans la croissance cancéreuse mais bien durant la dissémination des cellules tumorales. Une des limites de ce modèle MMTV-PyMT est néanmoins l'organotropisme pulmonaire des cellules disséminantes, alors que la pathologie humaine est largement caractérisée par une dissémination osseuse. Cependant, il n'existe pas à ce jour de modèle murin de cancer du sein à dissémination osseuse, et les autres modèles ne disséminent dans les os que très rarement (Ottewell and Lawson 2021). Afin de formellement démontrer que ce blocage de la dissémination n'est pas lié à un organotropisme particulier, qui laisserait suggérer un effet de niche pré-métastatique, nous avons initié une étude avec un modèle de xénogreffe à dissémination osseuse, les lignées tumorales mammaire SUM159-M1a. Avec ce modèle, l'inhibition pharmacologique de SMYD2 mène à une absence de colonisation osseuse par les cellules tumorales, permettant de conclure sur un rôle décisif de SMYD2 dans la dissémination métastatique du cancer du sein en général.

Etant donné que l'expression globale de SMYD2 reste constante au cours de la progression tumorale humaine, il est possible que seule une sous-population de cellules cancéreuses mette en place une voie SMYD2-dépendante pro-métastatique. Différentes analyses par IHC pourraient nous renseigner sur la présence de telles cellules. Une hypothèse séduisante serait que SMYD2 soit un gène critique dans la sélection de clones métastatiques au sein de la tumeur primaire. Ces clones, probablement dans des stades d'EMT partielles plus ou moins avancés, seraient ainsi ceux « primés » pour disséminer de façon efficace, et ce même à des stades précoces de la tumorigénèse. SMYD2 pourrait donc être une cible thérapeutique particulièrement intéressante afin de prévenir la dissémination métastatique. D'ailleurs, nos travaux montrent que le traitement d'une PDX (Patient-Derived-Xenograft) issue d'une récurrence métastatique avec cet inhibiteur diminue fortement la dissémination des cellules cancéreuses. Une combinaison alliant l'inactivation de SMYD2 et un agent antiprolifératif pourrait donc s'avérer redoutable afin de lutter contre les métastases du cancer du sein. En tant qu'ouverture plus générale, il est également tentant de spéculer que ce rôle pro-métastatique de SMYD2 ne soit pas limité au cancer du sein, mais soit un mécanisme de dissémination métastatique conservé au cours de la tumorigénèse.

Nouveaux substrats de SMYD2, vers de nouveaux mécanismes

Le méthylome des lysines est en plein expansion, avec de plus en plus de nouvelles protéines méthylées identifiées par spectrométrie de masse. L'analyse du méthylome de SMYD2 avait été récemment effectuée avec deux approches différentes. L'une basée sur un enrichissement des protéines méthylées par immuno-affinité avec un anticorps pan-méthyl (Olsen et al. 2016a), et l'autre basée sur une librairie de peptides dégénérés et test de méthylation *in vitro* (Cornett et al. 2018). Ces deux analyses, complémentaires, ont présentées cependant peu de substrats communs, laissant entrevoir d'un côté un biais lié à l'utilisation d'anticorps sélectifs et peu spécifiques, et de l'autre de potentiels artefacts liés à la structure des peptides, plus facilement méthylable par SMYD2 compte-tenu de la conformation très permissive de son domaine catalytique.

Afin d'identifier les protéines méthylées par SMYD2 au cours de ma thèse, nous avons opté pour une technique d'enrichissement via une version optimisée du domaine lecteur de la protéine L3MBTL1 (3xMBT). Le domaine 3xMBT est peu sélectif des régions environnantes à la lysine méthylée, contrairement aux anticorps pan-méthyl. Par ailleurs, la réaction de méthylation sur protéines complètes permet de s'affranchir des artefacts liés aux petits peptides ou encore aux limitations d'identification due à la digestion trypsique. On constate d'ailleurs que les différents substrats identifiés sont tous très divergents dans leur séquence flanquant la lysine cible, confirmant l'absence de sélectivité du domaine MBT. Cette méthode aura notamment permis de mettre en évidence six substrats commun avec l'analyse par immuno-enrichissement effectuée par Olsen et collègues, incluant (AHNAK, BCAR3, DBNL, DIAPH1, PRRC2C et RTF1) (Olsen et al. 2016a). Peu de congruence a été constatée en revanche avec la technique par criblage de peptide utilisée par Cornett et collègues (Cornett et al. 2018). Néanmoins, il est probable que nous ayons manqué certains substrats, d'une part à cause d'un possible manquement du domaine 3xMBT ou des limitations techniques de la spectrométrie de masse, tel que l'abondance des protéines. Une approche complémentaire, basée par exemple avec le chromodomaine de HP1 (Rui Wang et al. 2018), pourrait être réalisée afin de compléter le répertoire de substrats de SMYD2.

Les différents substrats identifiés par protéomique recouvraient un éventail ontologique relativement vaste, avec un enrichissement notable de protéines impliqués dans les signalisations dépendantes des Rho-GTPases (eg., BCAR3, DBNL, DIAPH1, KIF5B, KLC1, TUBB, TUBB4B et XPO1). Etant à la recherche de substrats importants dans les processus de dissémination métastatique initiés par SMYD2, différentes analyses de corrélation entre l'expression de SMYD2 et ses différents substrats potentiels ont été effectuées. Le curetage

de la base de données TCGA sur le cancer du sein (BRCA) a permis d'isoler des échantillons de patients atteints de métastases pour lesquels les données transcriptomiques étaient complètes. Les analyses ont mis en évidence une seule corrélation positive entre SMYD2 et les différents substrats potentiels que nous avons identifié. Cette corrélation était suffisamment forte pour être significative avec ce faible nombre de patients, et liait positivement l'expression de SMYD2 avec celle de BCAR3. Bien que préliminaire, nécessitant davantage de patients et une confirmation au niveau protéique, cette analyse vient suggérer l'importance de BCAR3 dans le répertoire fonctionnel de SMYD2 durant le processus de dissémination métastatique du cancer du sein. Par ailleurs, l'évènement de méthylation de BCAR3 était particulièrement prometteur puisque la protéine avait été déjà impliquée, comme présenté dans l'introduction, dans la régulation de différentes fonctions oncogéniques dans des cellules cancéreuses mammaires (Dongpo Cai, Iyer, et al. 2003a; Cross et al. 2016a; C. Li et al. 2017).

La méthylation de BCAR3 en tant que biomarqueur dans le cancer du sein ?

Globalement, l'analyse de BCAR3 au cours de la tumorigénèse a été largement inexploré, et s'est cantonné aux études des mécanismes moléculaires au sein de quelques lignées cellulaires. L'expression de BCAR3, basée essentiellement sur des analyses transcriptomiques, n'est que rarement positivement corrélée avec la transformation cancéreuse, ce qui contraste avec les données d'immunohistochimie, montrant un potentiel enrichissement de cette protéine dans les tissus tumoraux (Cross et al. 2016a). Les premières données d'immunohistochimie effectuées sur des coupes de tumeurs mammaires de différents sous-types ont été optimisées et laissent également suggérer une surexpression de BCAR3 dans les tissus cancéreux. L'analyse de davantage de coupes de tumeurs primaires et notamment de coupes de métastases issues de tumeurs mammaires est en cours, afin de clarifier le lien entre la présence de BCAR3 et la progression tumorale.

Les hypothèses actuelles penchent vers une régulation de BCAR3 essentiellement basée sur des événements affectant la protéine par PTMs. Par exemple, PhosphoSitePlus prédit BCAR3 comme étant une protéine massivement phosphorylée. Récemment, la phosphorylation de BCAR3 sur la tyrosine Y117 a été directement liée à sa dégradation par l'ubiquitine ligase Cullin-5 dans des cellules épithéliales mammaire (Steenkiste et al. 2021a). La perte fréquente de cette ubiquitine ligase dans les tumeurs mammaires laisse suggérer une levée de ce mécanisme de dégradation dans les cellules cancéreuses, et expliquant

potentiellement l'absence de corrélation entre les données transcriptomiques et protéiques (Fay et al. 2003). Par ailleurs, un peptide contenant la thréonine T130 phosphorylée de BCAR3 à récemment été utilisé comme agent vaccinal contre des formes agressives de mélanomes humain, avec une bonne tolérance et une bonne réponse immunologique, soulignant une fois de plus l'importance de la régulation par PTM de BCAR3 au sein des cancers (Engelhard et al. 2020).

Dans ce travail de thèse, la méthylation de lysine K334 de BCAR3 a été formellement liée à l'activité KMT de SMYD2 dans le cancer du sein. Cette méthylation, jusqu'alors orpheline, avait été observée par protéomique à grande échelle dans de nombreux modèles cellulaires, tels que le carcinome colorectal (Guo et al. 2014b), le carcinome de l'œsophage malpighien (Olsen et al. 2016a), le carcinome pulmonaire (Grimes et al. 2018). Autant de type de cancers différents où SMYD2 est retrouvé surexprimé et associé à un mauvais pronostic (S. Komatsu et al. 2015; Engqvist et al. 2020; Ohtomo-Oda et al. 2016b; J.-J. Sun et al. 2019b). Par ailleurs nous démontrons ici que la méthylation est particulièrement enrichie dans des lignées de cancer mammaire métastatiques basales, tandis qu'elle n'est pas détectée au sein de lignées lumineales. Ce tropisme potentiel de la méthylation pour le sous-type tumoral représente donc une piste intéressante afin de déterminer si BCAR3 pourrait être envisagé comme marqueur pronostique.

Enfin, l'anticorps anti-BCAR3 K334me1 généré au cours de ce travail représente un outil particulièrement utile afin de répondre à cette question : la méthylation de BCAR3 peut-elle être envisagée comme un biomarqueur ? Les premières analyses par immunohistochimie ont démontré un marquage de BCAR3 méthylé au niveau des membranes plasmiques des cellules tumorales issues de coupes de tumeurs primaires, mais pas des cellules saines (Annexe Fig. 1). Le développement d'une puce (TMA, « *Tissue Micro Array* ») contenant des coupes de tissus normaux, de tumeurs primaires mammaires et différentes lésions métastatiques afférentes est en cours afin de déterminer si la présence de BCAR3 méthylé pourrait être envisagé comme un marqueur pronostique ou prédictif.

Régulation de la méthylation de BCAR3 : l'hypoxie en cause

Il est intéressant de souligner une nouvelle fois que l'expression de SMYD2 ne varie pas de façon globale durant la progression tumorale. Nous avançons donc l'hypothèse que la méthylation des substrats de SMYD2 est davantage contexte-dépendante, impliquant soit une régulation de l'activité de la KMT, soit une augmentation de l'affinité pour le substrat (par une surexpression du substrat ou une relocalisation du couple KMT/substrat).

Cependant, déterminer l'orientation de l'activité de SMYD2 vers tel ou tel substrat demeure un défi particulièrement complexe. Nous avons donc, dans un premier temps, cherché à comprendre quels signaux et quels contextes pouvaient promouvoir la méthylation de BCAR3.

Au sein d'une tumeur, les cellules cancéreuses sont exposées à une myriades de stress pouvant profondément affecter leur phénotype. Nous avons donc stimulé *in vitro* les cellules cancéreuses afin de voir à quelle gamme de signal pouvait éventuellement répondre la méthylation de BCAR3. Peu de chose sont connus quant aux signaux en aval de la méthylation en général. Cependant, tandis que « l'activité » de BCAR3 a été lié aux signalisation par facteurs de croissances comme l'EGF (M.-J. Oh et al. 2008), celle de SMYD2 a été liée aux signaux de stress, notamment véhiculé par la cytokine TNF α (Reynoird et al. 2016a). Les stressés métaboliques (privation de sérum ou de glucose), la stimulation par l'EGF, l'HGF, le NRG1 ou encore le TNF α n'ont pas eu d'impact significatif sur l'abondance de la méthylation ou sur sa cinétique. En revanche, une hypoxie prolongée (3% O₂) de plus de 24h a comme effet d'augmenter drastiquement la méthylation de BCAR3. De façon remarquable, la remise dans des conditions d'oxygénation « normales » (20% O₂) rétablit rapidement un niveau basal de méthylation, indiquant un fin niveau de régulation (**Annexe Fig.2**). Ce contexte hypoxique comme promoteur de la méthylation de BCAR3 est particulièrement intéressant. En effet, les tumeurs génèrent d'importantes régions hypoxiques, notamment à cause d'une néo-angiogenèse défectueuse, et d'une prolifération anarchique. Ces régions hypoxiques sont d'ailleurs un facteur connu pour favoriser l'hétérogénéité intra-tumorale, particulièrement dans le cancer du sein. De cette hétérogénéité émerge des clones particulièrement agressifs, et de récentes observations supportent l'idée que l'hypoxie représenterai un facteur micro-environnemental majeur vers la progression métastatique (Rankin and Giaccia 2016). Ainsi, l'hypothèse d'une orientation de l'activité de SMYD2 contexte-dépendante pourrait trouver tout son sens à travers l'hypoxie : les régions tumorales hypoxiques seraient le lieu d'une surabondance de la méthylation de BCAR3, d'une activation des phénotypes invasif et migratoire, culminant dans une dissémination métastatique exacerbée. L'analyse de la méthylation par IHC sur des coupes de tumeurs présentant ces régions hypoxiques pourrait donc être un bon point de départ afin de tester cette hypothèse.

Nous avons par la suite cherché à déterminer comment l'hypoxie pouvait réguler l'abondance de la méthylation de BCAR3. En effet, nous n'avons pas observé de changement majeur dans l'expression de SMYD2 chez les cellules en hypoxie. Cependant la rapide baisse de méthylation dépendante des conditions de réoxygénation des cellules était évocatrice d'une signalisation dynamique, potentiellement orchestrée par une lysine

déméthylase (KDM). En effet, la grande majorité des KDMs, excepté LSD1 et LSD2, possède des domaines JmjC, dont l'activité catalytique d'hydroxylation nécessite le dioxygène comme cofacteur. Il a été largement démontré qu'en condition hypoxiques ces KDMs, comme par exemple KDM5A, sont inhibées (Batie et al. 2019). Nous avons donc émis l'hypothèse que cette fluctuation de l'abondance de méthylation de BCAR3 pourrait être la résultante non pas de l'augmentation de l'activité de SMYD2 mais de l'inhibition d'une KDM par manque de dioxygène. A ce stade, l'utilisation d'inhibiteurs pour les KDM2, KDM4 et KDM7 a permis d'exclure ces enzymes. De plus, par surexpression et invalidation pharmacologique, nous avons écarté la KDM LSD1, qui, bien que ne dépendant pas du dioxygène, est une enzyme promiscuiste fréquemment responsable de la déméthylation des protéines non-histones, notamment de la méthylation de p53 par SMYD2. D'autres expériences d'inhibition de ces KDMs sont en cours afin de clairement statuer sur l'implication d'une potentielle KDM, agissant en concert avec SMYD2.

A l'image de la chromatine bivalente, et les différents mécanismes combinatoires des PTMs de histones, nous avons également cherché à savoir si la méthylation de la lysine K334 était lié à d'autres événements de méthylation de BCAR3. En effet, un autre site de méthylation, orphelin, sur la lysine K5, avait été précédemment observé (Olsen et al. 2016a). Via une approche par candidats, nous avons détecté une autre méthylation sur BCAR3, catalysée par la KMT SETD7. D'autres KMTs, connues pour méthyler des protéines non-histones, comme SETD8, G9A ou SMYD3, ne semblent en revanche pas capable de méthyler BCAR3. Après avoir catégoriquement exclu les lysines K5 et K334, les premières analyses de spectrométrie de masse ont suggéré un événement potentiel, la méthylation de la lysine K445, inconnu jusqu'alors. De façon intéressante, il semblerait qu'il existe un antagonisme entre ces deux événements de méthylation, puisque la surexpression de SETD7 est capable de réprimer la méthylation de BCAR3 par SMYD2 (**Annexe Fig. 3**). Un tel antagonisme entre SMYD2 et SETD7 au niveau du même substrat a déjà été observé pour différentes protéines comme p53, RB ou ER, où les événements de méthylation catalysés par les deux KMTs s'excluaient mutuellement. Une hypothèse expliquant cet antagonisme est particulièrement congruente avec la présence d'une KDM déméthylant la lysine 334. Sachant que les KDMs sont fréquemment dotées de domaines lecteurs, la méthylation de la lysine K445 fournirait un site d'ancrage à la KDM, lui permettant de déméthylater la lysine K334. Un tel mécanisme est observé pour la protéine p53, entre ses lysines K370 et K372, où la liaison de LSD1 à la mono-méthylation de la lysine K372 permet la déméthylation de la K370 en trans (Huang et al. 2007). Une pêche des interacteurs de la lysine K445 méthylée pourrait nous renseigner sur la présence d'une potentielle KDM, recrutée via ce mécanisme.

Le mutant BCAR3 K445A est prêt afin d'étudier le potentiel antagonisme entre ces deux marques de méthylation.

Les Formines FMNLs, des lecteurs cytoplasmiques de la méthylation de BCAR3

La méthylation est connue pour affecter la stabilité d'une protéine, ou encore sa localisation (Cornett et al. 2019a). Cependant, aucun changement dans la stabilité ou la localisation de BCAR3 n'a été détecté comme étant dépendant de la méthylation de la lysine K334. Par ailleurs, comme évoqué en introduction, la méthylation peut entrer en compétition ou en synergisme avec d'autres PTMs, notamment la phosphorylation. Par exemple, les substrats de SMYD3 MAP3K2, ou dans ce travail RNF113A, font intervenir ce type de régulation (Mazur et al. 2014b). Bien que différentes phosphorylations aient été caractérisées sur BCAR3, comme la T50, la Y117 ou la T130, aucun changement de niveau de phosphorylation en lien avec la méthylation n'a été détecté sur BCAR3 avec différents anticorps pan-phospho-sérine/thréonine ou pan phosphotyrosine. La base de donnée PhosphoSitePlus indique la présence d'une phosphorylation proximale de la lysine K334, sur la sérine S332. La mutation de cette sérine par un acide aminé « phospho-mimique », l'acide aspartique S332D, n'a pas affecté le niveau de méthylation de BCAR3 à la K334. Il semble donc qu'il n'y ait pas de diaphonie entre la méthylation de BCAR3 et sa phosphorylation.

Si ces paramètres peuvent en effet être régulés la méthylation, il semblerait qu'ils soient davantage secondaires, voire indirects. En effet, la méthylation des lysines vient essentiellement contrôler les interactions entre les protéines, en attirant notamment des protéines à domaine lecteur (Cornett et al. 2019a). De façon intéressante, la lysine K334 méthylée est située au niveau de la région proline/sérine de BCAR3, une région prédite comme intrinsèquement désordonnée (« Intrinsically Disordered Region », ou IDR). Ce type de région ne comprend en effet pas assez d'acides aminés hydrophobes pour adopter un repliement thermodynamiquement stable (Babu 2016). Ces régions font l'objet d'un regain d'intérêt ces dernières années, notamment parce qu'elles ont été liées aux transitions de phase liquide-liquide, un phénomène physique permettant à la cellule de compartimentaliser des réactions biochimiques sans l'aide de membranes (Hyman, Weber, and Jülicher 2014).

Ces régions, par nature exposées, sont spécialisées dans la mise en place d'interactions inter-protéiques, qui sont typiquement spécifiques et de faible affinité, c'est-à-dire transitoires (Zhou 2012). Conjointement, leur flexibilité conformationnelle et leur accessibilité

leur permet d'être le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles (Babu 2016). On pourra citer un exemple largement développé au cours de l'introduction : la queue N-terminale des histones, massivement modifiée, et pouvant interagir avec pléthore de domaines lecteurs. Ainsi le principal avantage de la méthylation de la lysine K334 de BCAR3 serait d'être accessible aux interactions entre protéines, d'être lue. Il est intéressant de noter que de nombreuses protéines méthylées par SMYD2 le sont d'ailleurs sur des IDR, à l'instar de la queue C-terminale de p53 (Huang et al. 2006), la partie flexible N-terminale de ER (X. Zhang et al. 2013) ou encore la région C-terminal de RB (Saddic et al. 2010). Tous ces événements ont été liés à une lecture par un ou plusieurs domaines lecteurs. Nous avons donc cherché à identifier des lecteurs potentiels de la lysine K334 méthylée sur cette région IDR de BCAR3.

Après avoir marqué isotopiquement les acides aminés de cellules cancéreuses mammaires, nous avons pu isoler et identifier par protéomique toutes les protéines pouvant interagir spécifiquement avec la version méthylée du peptide BCAR3, ainsi que celles qui étaient repoussées par cette méthylation. Toutes les protéines repoussées présentaient de faibles niveaux de fiabilité, et certaines de ces interactions, comme avec la GEMIN5, n'ont pas pu être reproduites *in vitro*. Nous avons donc conclu que la lysine native de BCAR3 ne représentait pas d'attractivité particulière pour les protéines. En revanche, la version méthylée de BCAR3 a mis en évidence différentes protéines lectrices potentielles. Parmi ces protéines, nous avons retrouvé la protéine de liaison aux phosphoinositide OSBPL3 (« Oxysterol-binding protein 3 »), la protéine essentielle à la formation des cavéoles lipidiques CAVIN1 (« Caveolae Associated protein 1 »), ainsi que trois protéines largement enrichies, formant la sous-famille des formines FMNLs (« Formin-Like proteins »). De façon surprenante, aucune de ces protéines identifiées ne présente un domaine lecteur connu évident, suggérant des modalités d'interaction inédites avec la lysine méthylée. Certaines caractéristiques viennent rapprocher ces protéines. De façon intéressante, une rapide analyse ontologique montre que la totalité des protéines identifiées ont été décrites comme pouvant s'ancrer aux membranes cellulaires. On retrouve ainsi à la membrane plasmique CAVIN1 et les FMNLs et aux membranes du golgi et du réticulum endoplasmique OSBPL3 et les FMNL2/3. Cette association pourrait suggérer que la méthylation de BCAR3 se localise à proximité des membranes cellulaires, avec une fonction relative à des mécanismes d'interface. De façon remarquable, ces différentes protéines membranaires ont toutes également été liés à des voies de mécano-transduction. Compte-tenu de la promiscuité de BCAR3 avec le nœud mécano-sensible BCAR1, il se pourrait que la méthylation intervienne comme un point d'ancrage important dans la transmission ou la genèse de signaux mécaniques. Une autre hypothèse séduisante pourrait être que les

protéines CAVIN1 et OSBPL3, bien moins enrichies que les FMNLs, interagissent non pas directement avec BCAR3 méthylé mais avec alternativement FMNL1, FMNL2 ou FMNL3, afin de former des hétérocomplexes aux fonctionnalités variables. Par exemple, il a été récemment montré que FMNL2 était recrutée au niveau des jonctions adhérentes, via une augmentation de la concentration locale de PIP2, dépendante de la CAVIN1 (Teo et al. 2020). L'existence de ces hétérocomplexes pourrait être recherché prochainement, afin de mieux comprendre la fonctionnalité de la liaison de BCAR3 méthylé avec les FMNLs

Les FMNLs étant les protéines de loin les plus enrichies et ayant été précédemment associées à différents mode de migration cellulaire, notamment au cours de la progression tumorale, nous avons focalisé notre intérêt sur cette famille de protéines au cours de ma thèse.

Un nouveau domaine lecteur, en hérisson

Aucun des domaines des FMNLs n'a été identifié comme un domaine lecteur de la méthylation. Après différentes approches de segmentation des FMNLs il a été possible d'isoler une portion contenant le domaine GBD-FH3 comme étant nécessaire et suffisante pour médier l'interaction avec BCAR3 méthylé.

L'analyse des différentes unités structurales des FMNLs indique que ce GBD-FH3 est constitué d'une répétition HEAT, suivi de quatre répétitions de type Armadillo. Il est intéressant de constater que les domaines HEAT de la protéine N-CAPD3 (DEF), sous unité régulatrice du complexe Condensine II, peuvent reconnaître la mono-méthylation H4K20me1, mais pas la tri-méthylation ou H4 non modifié (W. Liu et al. 2010b). La modélisation de l'interaction entre FMNL3 et le peptide BCAR3 méthylé a révélé que la reconnaissance de la méthylation pourrait notamment faire intervenir un des tryptophanes canonique de ce domaine HEAT. Dans ce modèle, les répétitions HEAT et Armadillo se coordonnent afin de former une poche aromatique à forte composante aliphatique permettant d'accommoder de façon remarquable la lysine méthylée de BCAR3. Cette poche est strictement conservée chez les différents membres de la sous-famille FMNLs, soulignant donc la forte probabilité que cette poche soit en effet la zone d'interaction avec la lysine méthylé. Afin de démontrer formellement les propriétés lectrices de cette poche, des mutants des FMNLs, ont été générés et sont en cours d'étude.

Comme présenté dans l'introduction, les FMNLs font partie d'une famille de protéine appelée les formines Diaphanous. Toutes présentent ce domaine GBD-FH3 régulateur. S'il

est clair que ce dernier diverge dans sa séquence, sa structure est remarquablement conservée entre les membres de la famille Diaphanous. Nous avons observé une faible liaison de BCAR3 méthylé avec différents autres membres, DIAPH1, FHOD1 et DAAM1. Ces différentes protéines n'ont pas été retrouvées dans l'analyse protéomique des lecteurs, probablement à cause de leur faible affinité pour BCAR3 méthylé. L'interaction, avec une formine non-Diaphanous, comme FMN1 ou INF1, sera testée afin de démontrer que la lecture de la méthylation est une propriété des formines Diaphanous. Cependant, si les FMNLs semblent être les interacteurs privilégiés de BCAR3 méthylé, l'inverse n'est pas systématique : il se peut que les FMNLs reconnaissent des protéines méthylées de façon préférentielle, autres que BCAR3. De même, les autres formines diaphanous, DIAPH1, FHOD1 ou DAAM1, peuvent potentiellement reconnaître d'autres lysines méthylées que la K334me1 de BCAR3, avec une bien meilleure affinité. La question sous-jacente est alors de savoir quelles sont les propriétés de ce domaine lecteur, et quels sont les protéines méthylées préférentielles des différentes formines Diaphanous ? Cette question doit évidemment être abordée sur le long cours et s'appuyer sur des analyses structurales solides. Mais une fois les acides aminés critiques identifiés, il sera possible de mettre au point des formines mutantes invalidées pour leurs propriétés lectrices et ainsi discriminer les protéines méthylées lues par ces formines.

Une hypothèse particulièrement excitante concerne la faculté de ce domaine à lire potentiellement la méthylation des histones. La fonction principale des formines est de polymériser des filaments d'actine, or de courts filaments d'actines sont présents dans le noyau. Cette actine nucléaire est notamment assemblée par les formines DIAPH1 et DIAPH2, des formines diaphanous, possédant ce domaine lecteur potentiel. L'actine nucléaire ainsi formée a été impliquée dans différents mécanismes, tels que la transcription, la réparation de l'ADN ou encore la réplication (Caridi et al. 2019). Le laboratoire de John Gurdon avance même un rôle pivot de cette polymérisation d'actine nucléaire dans la reprogrammation transcriptionnelle de cellules somatiques (Miyamoto et al. 2011), un phénomène essentiellement orchestré par des mouvements chromatiniens. Ainsi, la lecture d'un événement de méthylation des histones pourrait être couplée à une polymérisation d'actine spécifique au niveau d'un locus de chromatine donné afin de réguler ces différents processus. Une fascinante connexion entre polymérisation d'actine nucléaire et certaines marques de méthylation des histones pourrait donc apporter un nouveau niveau de régulation épigénétique.

La méthylation de BCAR3, entre point d'ancrage et d'activation des FMNLs

Une des questions complexes à appréhender au cours de ma thèse fut de comprendre quel est le lien concret entre BCAR3 et FMNLs. J'ai pu démontrer leur interaction, mais quelles en sont les conséquences ?

Les données de localisation subcellulaires ont pu démontrer que BCAR3 et SMYD2 s'accumulait dans le lamellipode et que la méthylation de BCAR3 favorisait la localisation de FMNL3 dans le lamellipode. Ces résultats étaient en accord avec les précédentes études démontrant que BCAR3 et FMNL2/3 sont présents dans ces lamellipodes (Block et al. 2012a; Steenkiste et al. 2021a). De plus nous avons fortement suggéré par PLA que la formation du complexe entre BCAR3 méthylé et FMNL3 se déroulait presque exclusivement dans ce lamellipode. Ces données laissaient donc transparaître un rôle d'ancrage de la méthylation de BCAR3 : la lysine méthylée fournirait un site permettant une accumulation locale des FMNLs dans le lamellipode.

Comme présenté dans l'introduction, BCAR3 est notamment connu pour s'associer aux points d'adhérence, naissants et maturants dans le lamellipode, afin d'en accélérer la dissociation, et donc la dynamique (Cross et al. 2016a). Cependant, la perte des FMNLs ne coïncide pas avec un défaut de formation ou de maturation de ces adhérences (Kage, Winterhoff, et al. 2017a). Par ailleurs, nous n'avons pas détecté de différence dans les profils d'adhérence entre les cellules contrôle et celles invalidées pour la méthylation. Si la méthylation de BCAR3 est donc peu susceptible d'intervenir directement dans la régulation des adhérences cellulaires, il est néanmoins possible que la méthylation soit un point relais important entre les complexes présents dans les adhérences, impliquant notamment BCAR1, et ceux régulant la dynamique du cytosquelette d'actine, comme les formines FMNLs. Une hypothèse serait qu'au sein des adhérences du lamellipode, BCAR3 puisse stimuler la phosphorylation de BCAR1 afin d'activer localement des Rho-GTPases, comme Rac1 ou CDC42. La proximité des FMNLs grâce au recrutement par la méthylation de BCAR3 en ferait alors des effecteurs de choix. Dans ce modèle, la méthylation de BCAR3 permettrait de recruter les FMNLs à proximité des GTPases liées au GTP afin de les ouvrir et les activer localement.

Nous avons en effet observé que BCAR1 s'associait bien avec le complexe formé par BCAR3 méthylé et les FMNLs. De plus, il semblerait que la méthylation puisse favoriser la formation du complexe de BCAR3 avec BCAR1, ce qui coïnciderait avec une induction de la phosphorylation des tyrosines de BCAR1 et donc de son activation. Le site de méthylation

est très distant du site d'interaction avec BCAR1, les raisons expliquant cette différence sont encore à l'étude. Il se pourrait que la localisation du BCAR3 méthylé soit finement régulée, et se rapproche de BCAR1 au niveau des adhérences. Différentes expériences de microscopie à ondes évanescentes (TIRF) nous permettront de savoir si la présence de la méthylation de BCAR3 dans les adhérences coïncide avec une augmentation locale de la phosphorylation de BCAR1 et un recrutement potentiel des FMNLs. Par ailleurs, le statut d'activation de CDC42 sera également évalué, notamment afin de savoir si la méthylation de BCAR3 permet bien une augmentation de la proportion de CDC42-GTP. Ainsi, la méthylation de BCAR3 revêtirait une fonction bimodale, avec d'un côté le recrutement des FMNLs aux lamellipodes, et de l'autre une activation des FMNLs en soutenant l'activation des GTPases.

Ces différents points sont en cours d'évaluation, et permettrait de comprendre comment la méthylation de BCAR3 peut soutenir la migration de façon dépendante à l'activité polymérase des FMNLs. En outre, ce mécanisme s'inscrit parfaitement dans un schéma oncogénique. Sa portée physiologique apparaît en effet peu essentielle, en adéquation avec l'absence de phénotype observable des invalidations de SMYD2 et BCAR3 chez la souris, tandis que son potentiel oncogénique, en termes d'accélération de la migration, fournirait un avantage invasif certain aux cellules cancéreuses.

La méthylation de BCAR3 comme signal pro-invasif et migratoire

Bien que différents rapports aient indiqués un rôle de SMYD2 dans la prolifération cellulaire, une récente étude par invalidation génétique et pharmacologique n'a pas soutenu cette observation (Thomenius et al. 2018). Nos différents modèles cellulaires et murins de tumorigénèse mammaire mènent également à cette conclusion, SMYD2 n'affecte pas directement la prolifération cellulaire. En réalité de nombreux substrats de SMYD2 ont été liés plutôt à l'arrêt du cycle, comme la méthylation de RB, ou de ER dans le cancer du sein. La méthylation de ER étant inactivatrice, il n'est pas étonnant de constater que SMYD2 serait même de bon pronostic dans les cancers du sein hormono-dépendant ER/PR positif. Par ailleurs, nous ne détectons pas de méthylation de BCAR3 dans les lignées conservant ER, suggérant donc un potentiel tropisme de SMYD2 vers certains substrats, en fonction du contexte pathologique. Bien que dans notre cas l'explication la plus parcimonieuse soit liée à l'abondance respective des substrats, de façon générale aucune étude n'est venue spécifiquement adresser cette question de sélection spatio-temporelle par SMYD2 de ces substrats.

De son côté, BCAR3 avait été clairement lié à la prolifération des cellules cancéreuse mammaire, comme détaillé en introduction. Contrairement à SMYD2, nous retrouvons en effet un impact de la délétion ou la surexpression de BCAR3 sur la prolifération. En revanche nous démontrons également que cet effet n'est pas lié à la méthylation de BCAR3, fait congruent avec l'absence de rôle de SMYD2 sur la prolifération.

Une récente étude a démontré que SMYD2 était capable de promouvoir la migration de cellules cancéreuses à travers des membranes de nitrocellulose (« chambre de Boyden ») (Y. Zeng et al. 2019a). En utilisant la même technique, le rôle de BCAR3 a également été récemment suggéré (Steenkiste et al. 2021a). Nos différents modèles viennent entériner ces observations. La migration cellulaire sur surface plane ou à travers des environnements tridimensionnels fibreux reconstitués, est largement favorisée par SMYD2 et par BCAR3. Nous démontrons par ailleurs qu'une partie significative de cet effet est médiée directement par la méthylation de BCAR3, SMYD2-dépendante.

L'analyse des paramètres migratoires des cellules démontrent que la méthylation est notamment importante afin de stimuler la vitesse de migration mésenchymateuse des cellules cancéreuses. En revanche, elle n'altère pas la persistance directionnelle de la migration. Ce phénotype migratoire est particulièrement évocateur de celui observé par des fibroblastes déplétés pour FMNL2 et FMNL3, qui migrent moins vite, sans effet néanmoins sur la persistance (Kage, Winterhoff, et al. 2017a). Par ailleurs, l'introduction de BCAR3, et plus précisément de sa méthylation, dans des cellules cancéreuses au phénotype épithélial (MCF-7) favorise fortement la migration.

De façon intéressante, dans un environnement plus contraint, tridimensionnel, nous avons observé un phénotype migratoire exacerbé. En effet, les contraintes topologiques et mécaniques de la matrice rendent les changements de direction plus difficiles à réaliser. De plus, les fibres de collagène procurent aux cellules cancéreuses des « autoroutes » afin de migrer de façon plus directionnelle. Ainsi, la vitesse devient un paramètre d'efficacité de premier ordre durant la migration tridimensionnelle (P.-H. Wu et al. 2014). Les cellules invalidées pour BCAR3 ou SMYD2 ne migrent presque plus à travers cette matrice de collagène. Similairement, la déplétion spécifique de la méthylation réduisait fortement les capacités motiles et invasives des cellules cancéreuses. On notera que l'effet de FMNL2 et FMNL3 sur la migration est également exacerbé lorsque les cellules sont placées dans un environnement plus visqueux, donc présentant une plus forte contrainte mécanique (Kage, Winterhoff, et al. 2017a). Maintenant que les conditions expérimentales de culture et d'imagerie ont été mises en place, les prochaines expériences viseront à analyser le

mouvement des cellules à travers cette matrice de collagène, afin de mieux comprendre leur stratégie motile.

De plus, l'optimisation de l'imagerie par optique adaptative nous a permis de venir observer plus finement la morphologie des cellules en migration tridimensionnelle. Les premières observations indiquent qu'à l'instar des lamellipodes plans, les cellules conservant la méthylation de BCAR3 et l'interaction avec les FMNLs présentent de longues protrusions polarisées vers l'extérieur du sphéroïde. Comme présenté lors de l'introduction, la structure générique du lamellipode n'est pas conservée en tridimension et laisse volontiers place à une protrusion pseudopodiale allongée. Cependant ce dernier est également généré selon des mécanismes similaires, par polymérisation d'actine branchée, par le complexe ARP2/3, et sous contrôle des Rho-GTPases telles que Rac1 et CDC42 (Caswell and Zech 2018). Il est possible que les formines comme les FMNLs jouent également un rôle dans la stabilisation mécanique de cette protrusion (Kage, Winterhoff, et al. 2017a). Dans ce cas, la méthylation de BCAR3 serait importante pour activer les FMNLs et soutenir la résistance mécanique du pseudopode. Cet aspect du travail en est encore au stade du balbutiement. Néanmoins, l'analyse de la longueur de ces protrusions dans des matrices de rigidité différentes nous indiquerait si la méthylation est en effet un vecteur de résistance mécanique, et représenterait un bon point de départ pour des analyses approfondies.

Les cellules utilisées pour ces tests de migration, les MDA-MB 231 sont des cellules à fort caractère mésenchymateux. De façon intéressante, la déplétion spécifique de la méthylation a mené à une diminution de l'abondance de Vimentine, une protéine constituant les filaments intermédiaires, et un marqueur consensus des cellules mésenchymateuses. Si cette baisse n'est probablement pas une conséquence directe de la méthylation de BCAR3, il se peut qu'elle fasse partie d'un programme transcriptionnel global, où la méthylation serait importante pour conserver des caractéristiques cellulaires davantage mésenchymateuses. Il sera nécessaire de tester d'autres marqueurs, comme l' α -SMA, ou certains facteurs de transcription de l'EMT comme TWIST, SNAIL ou ZEB1 (J. Yang et al. 2020). Cette promotion potentielle de l'EMT par la méthylation de BCAR3 est d'ailleurs soutenue par la récente étude démontrant que SMYD2 serait capable de promouvoir un tel programme transcriptionnel (Y. Zeng et al. 2019a).

De façon plus générale, cette exacerbation du phénotype mésenchymateux est aussi congruente avec la migration plus rapide au sein de la matrice de collagène. Il est en effet possible que ce phénotype permette une expression de différentes protéases de la famille des MMPs, acteurs essentiels dans les processus de migration invasive, dégradant la matrice pour permettre à la cellule d'avancer. Ceci serait en accord avec la récente analyse

protéomique identifiant BCAR3 parmi les candidats importants dans la mise en place de l'invadopode bidimensionnel, une structure essentielle à l'invasion et particulièrement riche en MMPs (Thuault et al. 2020). En tridimension, les invadopodes sont fréquemment fusionnés aux pseudopodes, au niveau de l'extrémité de ces longues protrusions, pour contribuer à la dégradation de la matrice. L'analyse de l'expression de ces MMPs et des expériences de digestion de gélatine pourraient donc être effectuées pour répondre à cette question. Notons que cette analyse phénotypique du rôle de la méthylation de BCAR3 est particulièrement intéressante à la lumière de la manière dont elle est régulée, par hypoxie. En effet, il est largement reconnu que l'hypoxie est un facteur prépondérant dans la mise en place de caractéristique mésenchymateuses et invasives (Rankin and Giaccia 2016). Il se peut donc que la méthylation de BCAR3 par SMYD2 soit un mécanisme adaptatif des cellules cancéreuses afin de s'extraire des conditions hypoxiques, peu favorables à la survie. Cette adaptation orienterait les cellules vers un phénotype plus mésenchymateux, favorisant *in fine* la dissémination métastatique (**Figure 40**).

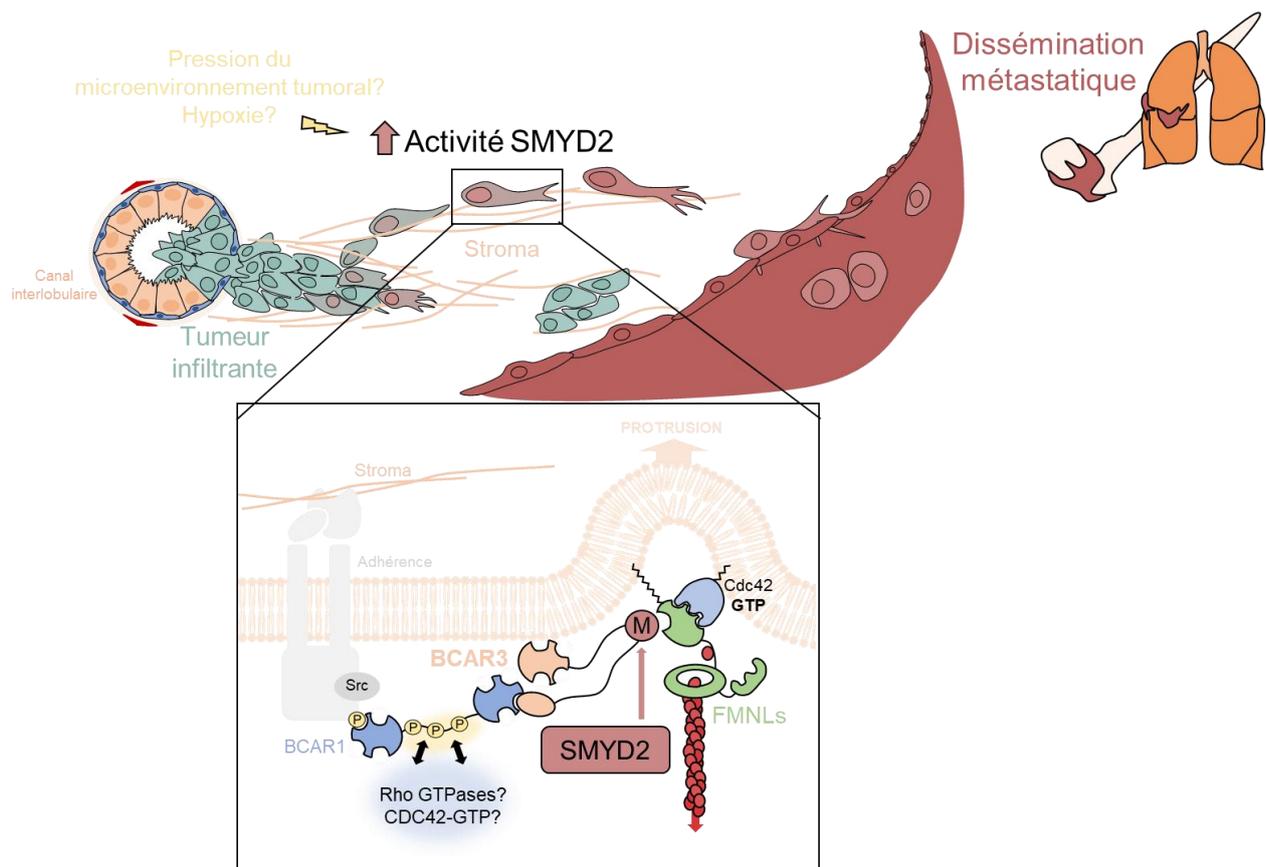


Figure 40. Schéma bilan des fonctions de l'axe SMYD2/BCAR3/FMNLs dans la dissémination métastatique mammaire.

Conclusion

Une curieuse sensation me vient alors que je m'apprête à remplir cette section. Je l'ai gardé pour la fin. La toute fin. Peut-être était-ce nécessaire. Philosophier un peu en l'état. Derrière ce manuscrit, je pense avoir livré une version sincère de ce que j'ai appris, de ce que j'ai découvert, de ce que j'ai compris. Nous démontrons ici que SMYD2 joue un rôle décisif dans la dissémination du cancer du sein métastatique. Nous mettons un lumière un répertoire de substrats inconnus jusqu'alors. Puis, s'attardant sur l'un d'entre eux en particulier, BCAR3, nous élucidons une signalisation complète. La méthylation de cette protéine BCAR3, attire une famille de protéine, les formines FMNLs, des nucléateur d'actine. Ce point d'ancrage est alors décisif afin de promouvoir la dynamique du lamellipode, et la vitesse de migration mésenchymateuse. Finalement, ces observations ne restent pas cantonnées aux parois translucides des boites de pétri et viennent aussi prendre tout leur sens dans un système vivant, en médiant un rôle clé dans la dissémination métastatique.

Annexes

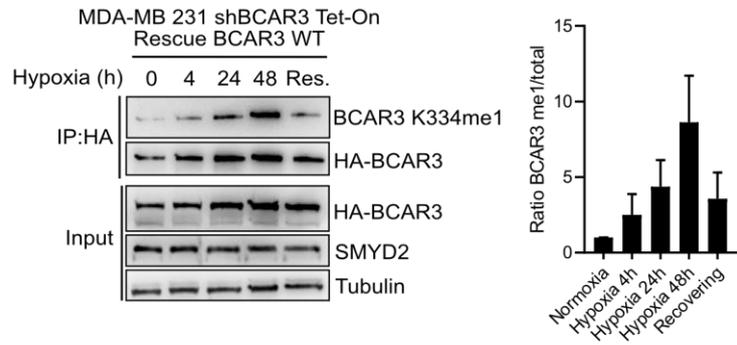
1. Résultats étayant la discussion

Annexe Fig.1

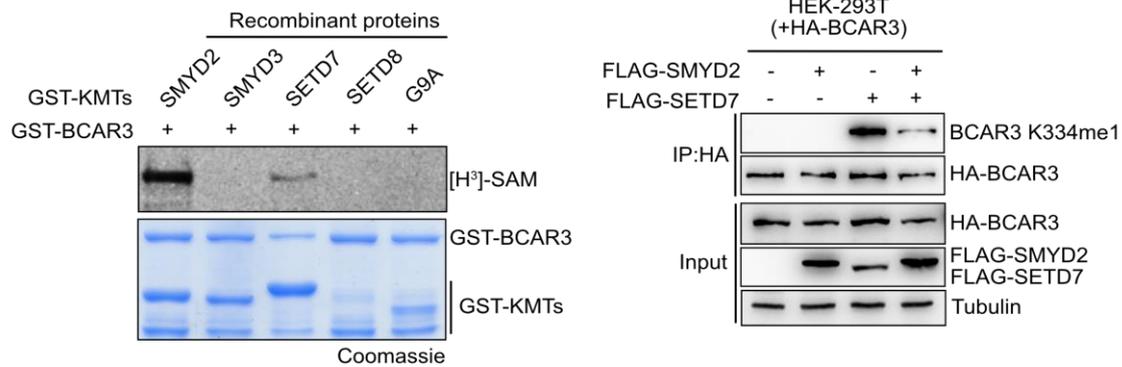
IHC: BCAR3 K334me1
Breast cancer tissue



Annexe Fig.2



Annexe Fig.3



2. Analyse structurale du nouveau domaine lecteur de méthylation des FMNLs

Les Formines, et a fortiori les FMNLs, ne possèdent pas de domaine lecteur de la méthylation connu. Pourtant, nous avons montré que les formines pouvaient interagir de façon directe avec la lysine K334 méthylée de BCAR3 via leur domaine régulateur GBD-FH3. Un aspect important de cette thèse a donc cherché à caractériser les paramètres structuraux de cette interaction entre le domaine GBD-FH3 de FMNL3 et BCAR3 méthylé.

Aucune structure de ce domaine GBD-FH3 de FMNL3 n'est à ce jour disponible. En revanche, les structures des domaines GBD-FH3 de FMNL2 et FMNL1, en complexe avec la GTPase CDC42-GTP ont été résolues en 2015. Basée sur une importante homologie de séquence entre les FMNLs nous avons pu mettre au point plusieurs fragments candidats et finalement sélectionné un fragment allant de la méthionine M1 à la glycine G382. Ce fragment présentait par ailleurs une liaison optimale avec le peptide BCAR3 méthylé, et quasiment aucune réactivité pour la version non méthylé (voir article, Figure...)

Après avoir sélectionné une souche de bactérie, la Rosetta2, nous avons optimisé les conditions de purification de ce fragment. Finalement, une double purification d'affinité reposant sur une pêche par l'extrémité C-terminale fusionnée avec un tag HIS, suivi d'une pêche par l'extrémité N-terminale fusionnée avec un tag GST, a été effectuée afin d'optimiser une purification de seulement la forme complète du fragment, et s'affranchir des différents produits de dégradation. Après un clivage du tag GST avec la protéase Prescission, une chromatographie d'exclusion de taille est effectuée afin d'évacuer les dernières impuretés et vérifier l'homo-dispersion de l'échantillon. Enfin, différentes expériences de DSF ont été réalisées afin d'identifier le système de tampon permettant une stabilité thermique optimale de la protéine. Le fragment présentait une stabilité optimale notamment dans un tampon à 100 mM Tricine pH 8.0, et était notamment stabilisé par des concentrations importantes de NaCl > 250 mM (Figure). De façon étonnante, nous avons également observé que le fragment était très fortement stabilisé par le Coenzyme A, ainsi que des fragments d'ADN de 60 paires de bases.

Une fois le fragment purifié dans ce système tampon, différentes expériences de cristallogénèse ont pu être initiées. Malheureusement, après diffraction, les différents cristaux obtenus se sont révélés être soit des formations salines, soit des cristaux inexploitable. Une optimisation plus poussée est donc en cours de réalisation, notamment en tentant d'autres fragments de ce domaine GBD-FH3.

3. Etude de la dynamique des marques de méthylation de p53 dans les cancers

Mon stage de Master 2 et ma première année de thèse ont entièrement été dédiés à ce projet, qui visait à étudier la dynamique des marques de méthylation affectant les lysines du suppresseur de tumeur p53. A ce jour, l'ensemble des événements de méthylation modifiant p53 sont concentrés sur le domaine carboxy-terminal, ou régulateur, de p53. Il s'agit d'une région terminale, flexible, analogue à la queue des histone H3 ou H4 par exemple. Ce domaine est la cible de très nombreuses PTMs, comme la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitinylation et la méthylation. Globalement ces différentes modifications participent à l'élaboration de la réponse de p53 afin d'intégrer et de transduire différentes réponses biologiques. Par exemple, il a été démontré que la méthylation de la lysine K370 par SMYD2 permettait d'atténuer la réponse de p53 au stress génotoxique (Huang et al. 2006). La modulation des fonctions de p53 par méthylation était donc un aspect particulièrement intéressant, et ce notamment dans les cancers conservant une version sauvage de p53. L'hypothèse de travail était que dans les cancers conservant un p53 sauvage, tels que les mélanomes et les neuroblastomes, les fonctions de p53 seraient réprimées par apposition de marques de méthylation répressives, telles que sur la lysine K370. L'objectif de ce projet était de caractériser la dynamique des différentes marques de méthylation de p53 et d'apporter la preuve de concept que les fonctions suppressives de tumeur de p53 pourraient être restaurées en bloquant cette signalisation par méthylation répressive.

Cette étude a été initiée par la validation systématique *in vitro* de toutes les marques de méthylation connues pouvant affecter p53. Ainsi, nous avons pu confirmer que p53 était méthylé par les KMTs SMYD2, G9A, SETD7 et SETD8, au niveau des lysines respectives K370, K372, K373 et K382. Dans un second temps, différents anticorps reconnaissant les marques de méthylation, notamment la K370me1 et la K382me1, dépendantes de SMYD2 et SETD8 respectivement, ont été caractérisés, afin de commencer à étudier de façon efficace ces marques au sein des cellules. Cependant, un travail d'optimisation sur ces anticorps est encore nécessaire. Afin d'étudier la dynamique de ces marques, l'utilisation de la spectrométrie de masse, avec une stratégie ciblée sur p53, était la meilleure option. Nous avons donc optimisé la purification du p53 endogène. Pour cela différentes techniques ont été utilisées, tels que la pêche par immunoprécipitation ou à l'aide de « Nanobodies ». Néanmoins, nous avons finalement opté pour l'utilisation d'une lignée cancéreuse générée par CRISPR-Knock-in, consistant en l'ajout de tag Streptavidine aux extrémité N-terminale ou C-terminale du gène TP53. Après avoir vérifié que ces tags ne perturbaient pas les

fonctions de facteur de transcription de p53, nous avons pu optimiser les conditions de purification, puis de préparation de l'échantillon à l'analyse par spectrométrie de masse. Finalement nous avons atteint une couverture de plus de 80% de la protéine, contenant notamment la portion C-terminale, riche en lysine et donc difficile à isoler par digestion tryptique standard.

Ce projet est désormais entre les mains d'une thésarde talentueuse, qui, je n'en doute pas, arrivera à élucider les différents paramètres régulant la dynamique de la méthylation de p53.

4. Etude du rôle de la méthylation de l'ubiquitine ligase RNF113A dans la résistance aux agents alkylants dans le cancer du poumon

Joindre draft

Revue

Au cours de ma thèse j'ai pu participer à la rédaction de deux revues, portées sur l'impact de la méthylation des lysines de protéines non-histones dans les cancers.

References

- Abercrombie, M., Joan E. M. Heaysman, and Susan M. Pegrum. 1971. 'The Locomotion of Fibroblasts in Culture: IV. Electron Microscopy of the Leading Lamella'. *Experimental Cell Research* 67 (2): 359–67. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(71\)90420-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(71)90420-4).
- Abercrombie, M., E Joan, M. Heaysman, and Susan M. Pegrum. 1970. 'The Locomotion of Fibroblasts in Culture: II. "Ruffling"'. *Experimental Cell Research* 60 (3): 437–44. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(70\)90537-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(70)90537-9).
- Abotaleb, Mariam, Peter Kubatka, Martin Caprnda, Elizabeth Varghese, Barbora Zolakova, Pavol Zubor, Radka Opatrilova, Peter Kruzliak, Patrik Stefanicka, and Dietrich Büsselberg. 2018. 'Chemotherapeutic Agents for the Treatment of Metastatic Breast Cancer: An Update'. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 101 (May): 458–77. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.108>.
- Abu-Farha, Mohamed, Jean-Philippe Lambert, Ashraf S. Al-Madhoun, Fred Elisma, Ilona S. Skerjanc, and Daniel Figeys. 2008. 'The Tale of Two Domains: Proteomics and Genomics Analysis of SMYD2, A New Histone Methyltransferase *'. *Molecular & Cellular Proteomics* 7 (3): 560–72. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700271-MCP200>.
- Abu-Farha, Mohamed, Sylvain Lanouette, Fred Elisma, Véronique Tremblay, Jeffery Butson, Daniel Figeys, and Jean-François Couture. 2011. 'Proteomic Analyses of the SMYD Family Interactomes Identify HSP90 as a Novel Target for SMYD2'. *Journal of Molecular Cell Biology* 3 (5): 301–8. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr025>.
- Agthoven, T. van, T. L. van Agthoven, A. Dekker, P. J. van der Spek, L. Vreede, and L. C. Dorssers. 1998a. 'Identification of BCAR3 by a Random Search for Genes Involved in Antiestrogen Resistance of Human Breast Cancer Cells'. *The EMBO Journal* 17 (10): 2799–2808. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.10.2799>.
- . 1998b. 'Identification of BCAR3 by a Random Search for Genes Involved in Antiestrogen Resistance of Human Breast Cancer Cells'. *The EMBO Journal* 17 (10): 2799–2808. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.10.2799>.
- Ahmed, Hazem, Shili Duan, Cheryl H. Arrowsmith, Dalia Barsyte-Lovejoy, and Matthieu Schapira. 2016. 'An Integrative Proteomic Approach Identifies Novel Cellular SMYD2 Substrates'. *Journal of Proteome Research* 15 (6): 2052–59. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00220>.
- Alexander, Stephanie, Bettina Weigelin, Frank Winkler, and Peter Friedl. 2013. 'Preclinical Intravital Microscopy of the Tumour-Stroma Interface: Invasion, Metastasis, and Therapy Response'. *Current Opinion in Cell Biology, Cell adhesion and migration*, 25 (5): 659–71. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.07.001>.
- Allfrey, V. G., R. Faulkner, and A. E. Mirsky. 1964. 'Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 51 (5): 786–94. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>.
- Ambler, R. P., and M. W. Rees. 1959. 'ε-N-Methyl-Lysine in Bacterial Flagellar Protein'. *Nature* 184 (4679): 56–57. <https://doi.org/10.1038/184056b0>.
- Andre, Fabrice, Bastien Job, Philippe Dessen, Attila Tordai, Stefan Michiels, Cornelia Liedtke, Catherine Richon, et al. 2009. 'Molecular Characterization of Breast Cancer with High-Resolution Oligonucleotide Comparative Genomic Hybridization Array'. *Clinical Cancer Research* 15 (2): 441–51.
- Andrews, Forest H, Brian D Strahl, and Tatiana G Kutateladze. 2016. 'Insights into Newly Discovered Marks and Readers of Epigenetic Information'. *Nature Chemical Biology* 12 (9): 662–68. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2149>.
- Anwar, Talha, Caroline Arellano-Garcia, James Ropa, Yu-Chih Chen, Hong Sun Kim, Euisik Yoon, Sierrah Grigsby, et al. 2018. 'P38-Mediated Phosphorylation at T367 Induces EZH2 Cytoplasmic Localization to Promote Breast Cancer Metastasis'. *Nature Communications* 9 (1): 2801. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05078-8>.

- Attalla, Sherif, Tarek Taifour, Tung Bui, and William Muller. 2021a. 'Insights from Transgenic Mouse Models of PyMT-Induced Breast Cancer: Recapitulating Human Breast Cancer Progression in Vivo'. *Oncogene* 40 (3): 475–91. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01560-0>.
- . 2021b. 'Insights from Transgenic Mouse Models of PyMT-Induced Breast Cancer: Recapitulating Human Breast Cancer Progression in Vivo'. *Oncogene* 40 (3): 475–91. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01560-0>.
- Auffray, Cedric, Darin Fogg, Meriem Garfa, Gaelle Elain, Olivier Join-Lambert, Samer Kayal, Sabine Sarnacki, Ana Cumano, Gregoire Lauvau, and Frederic Geissmann. 2007. 'Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior'. *Science* 317 (5838): 666–70. <https://doi.org/10.1126/science.1142883>.
- Babu, M. Madan. 2016. 'The Contribution of Intrinsically Disordered Regions to Protein Function, Cellular Complexity, and Human Disease'. *Biochemical Society Transactions* 44 (5): 1185–1200. <https://doi.org/10.1042/BST20160172>.
- Bachmann, Ingeborg M., Ole J. Halvorsen, Karin Collett, Ingunn M. Stefansson, Oddbjørn Straume, Svein A. Haukaas, Helga B. Salvesen, Arie P. Otte, and Lars A. Akslen. 2006. 'EZH2 Expression Is Associated With High Proliferation Rate and Aggressive Tumor Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate, and Breast'. *Journal of Clinical Oncology* 24 (2): 268–73. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.5180>.
- Baker, Joseph L., Naomi Courtemanche, Daniel L. Parton, Martin McCullagh, Thomas D. Pollard, and Gregory A. Voth. 2015. 'Electrostatic Interactions between the Bni1p Formin FH2 Domain and Actin Influence Actin Filament Nucleation'. *Structure (London, England: 1993)* 23 (1): 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.10.014>.
- Barski, Artem, Suresh Cuddapah, Kairong Cui, Tae-Young Roh, Dustin E. Schones, Zhibin Wang, Gang Wei, Iouri Chepelev, and Keji Zhao. 2007. 'High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome'. *Cell* 129 (4): 823–37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>.
- Barsyte-Lovejoy, Dalia, Fengling Li, Menno J. Oudhoff, John H. Tatlock, Aiping Dong, Hong Zeng, Hong Wu, et al. 2014. '(R)-PFI-2 Is a Potent and Selective Inhibitor of SETD7 Methyltransferase Activity in Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (35): 12853–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407358111>.
- Batie, Michael, Julianty Frost, Mark Frost, James W. Wilson, Pieta Schofield, and Sonia Rocha. 2019. 'Hypoxia Induces Rapid Changes to Histone Methylation and Reprograms Chromatin'. *Science* 363 (6432): 1222–26. <https://doi.org/10.1126/science.aau5870>.
- Benedetti, Rosaria, Carmela Dell'Aversana, Tommaso De Marchi, Dante Rotili, Ning Qing Liu, Boris Novakovic, Serena Boccella, et al. 2019. 'Inhibition of Histone Demethylases LSD1 and UTX Regulates ER α Signaling in Breast Cancer'. *Cancers* 11 (12). <https://doi.org/10.3390/cancers11122027>.
- Benkert, Pascal, Marco Biasini, and Torsten Schwede. 2011. 'Toward the Estimation of the Absolute Quality of Individual Protein Structure Models'. *Bioinformatics* 27 (3): 343–50. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>.
- Bernstein, Bradley E., Tarjei S. Mikkelsen, Xiaohui Xie, Michael Kamal, Dana J. Huebert, James Cuff, Ben Fry, et al. 2006. 'A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells'. *Cell* 125 (2): 315–26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>.
- Bertucci, F., P. Finetti, and D. Birnbaum. 2012. 'Basal Breast Cancer: A Complex and Deadly Molecular Subtype'. *Current Molecular Medicine* 12 (1): 96–110. <https://doi.org/10.2174/156652412798376134>.
- Bertucci, François, Charlotte K. Y. Ng, Anne Patsouris, Nathalie Droin, Salvatore Piscuoglio, Nadine Carbuca, Jean Charles Soria, et al. 2019. 'Genomic Characterization of Metastatic Breast Cancers'. *Nature* 569 (7757): 560–64. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1056-z>.

- Bhat, Kamakoti P., H. Ümit Kaniskan, Jian Jin, and Or Gozani. 2021. 'Epigenetics and beyond: Targeting Writers of Protein Lysine Methylation to Treat Disease'. *Nature Reviews Drug Discovery* 20 (4): 265–86. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00108-x>.
- Biggar, Kyle K., Francois Charih, Huadong Liu, Yasser B. Ruiz-Blanco, Leanne Stalker, Anand Chopra, Justin Connolly, et al. 2020. 'Proteome-Wide Prediction of Lysine Methylation Leads to Identification of H2BK43 Methylation and Outlines the Potential Methyllysine Proteome'. *Cell Reports* 32 (2): 107896. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107896>.
- Bischoff, Maik C., Sebastian Lieb, Renate Renkawitz-Pohl, and Sven Bogdan. 2021. 'Filopodia-Based Contact Stimulation of Cell Migration Drives Tissue Morphogenesis'. *Nature Communications* 12 (1): 791. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20362-2>.
- Blanchoin, Laurent, Kurt J. Amann, Henry N. Higgs, Jean-Baptiste Marchand, Donald A. Kaiser, and Thomas D. Pollard. 2000. 'Direct Observation of Dendritic Actin Filament Networks Nucleated by Arp2/3 Complex and WASP/Scar Proteins'. *Nature* 404 (6781): 1007–11. <https://doi.org/10.1038/35010008>.
- Block, Jennifer, Dennis Breitsprecher, Sonja Kühn, Moritz Winterhoff, Frieda Kage, Robert Geffers, Patrick Duwe, et al. 2012a. 'FMNL2 Drives Actin-Based Protrusion and Migration Downstream of Cdc42'. *Current Biology* 22 (11): 1005–12. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.064>.
- . 2012b. 'FMNL2 Drives Actin-Based Protrusion and Migration Downstream of Cdc42'. *Current Biology* 22 (11): 1005–12. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.064>.
- Boehm, Daniela, Mark Jeng, Gregory Camus, Andrea Gramatica, Roland Schwarzer, Jeffrey R. Johnson, Philip A. Hull, et al. 2017. 'SMYD2-Mediated Histone Methylation Contributes to HIV-1 Latency'. *Cell Host & Microbe* 21 (5): 569-579.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.011>.
- Bos, Johannes L., Johan de Rooij, and Kris A. Reedquist. 2001. 'Rap1 Signalling: Adhering to New Models'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (5): 369–77. <https://doi.org/10.1038/35073073>.
- Bouyssié, David, Anne-Marie Hesse, Emmanuelle Mouton-Barbosa, Magali Rompais, Charlotte Macron, Christine Carapito, Anne Gonzalez de Peredo, et al. 2020. 'Proline: An Efficient and User-Friendly Software Suite for Large-Scale Proteomics'. *Bioinformatics (Oxford, England)* 36 (10): 3148–55. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa118>.
- Breitsprecher, Dennis, and Bruce L. Goode. 2013. 'Formins at a Glance'. *Journal of Cell Science* 126 (Pt 1): 1–7. <https://doi.org/10.1242/jcs.107250>.
- Breitsprecher, Dennis, Richa Jaiswal, Jeffrey P. Bombardier, Christopher J. Gould, Jeff Gelles, and Bruce L. Goode. 2012. 'Rocket Launcher Mechanism of Collaborative Actin Assembly Defined by Single-Molecule Imaging'. *Science (New York, N. Y.)* 336 (6085): 1164–68. <https://doi.org/10.1126/science.1218062>.
- Brown, Mark A., Melissa A. Edwards, Ilham Alshiraihi, Huimin Geng, Joseph D. Dekker, and Haley O. Tucker. 2020. 'The Lysine Methyltransferase SMYD2 Is Required for Normal Lymphocyte Development and Survival of Hematopoietic Leukemias'. *Genes and Immunity*, March. <https://doi.org/10.1038/s41435-020-0094-8>.
- Brown, Mark A., Robert J. Sims, Paul D. Gottlieb, and Philip W. Tucker. 2006. 'Identification and Characterization of Smyd2: A Split SET/MYND Domain-Containing Histone H3 Lysine 36-Specific Methyltransferase That Interacts with the Sin3 Histone Deacetylase Complex'. *Molecular Cancer* 5 (June): 26. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-26>.
- Cabodi, Sara, Laura Moro, Germano Baj, Monica Smeriglio, Paola Di Stefano, Silvana Gippone, Nicola Surico, et al. 2004. 'P130Cas Interacts with Estrogen Receptor Alpha and Modulates Non-Genomic Estrogen Signaling in Breast Cancer Cells'. *Journal of Cell Science* 117 (Pt 8): 1603–11. <https://doi.org/10.1242/jcs.01025>.

- Cai, D., L. K. Clayton, A. Smolyar, and A. Lerner. 1999. 'AND-34, a Novel P130Cas-Binding Thymic Stromal Cell Protein Regulated by Adhesion and Inflammatory Cytokines'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (4): 2104–12.
- Cai, Dongpo, Kyriacos N. Felekis, Richard I. Near, Geraldine M. O'Neill, Jean Maguire van Seventer, Erica A. Golemis, and Adam Lerner. 2003. 'The GDP Exchange Factor AND-34 Is Expressed in B Cells, Associates with HEF1, and Activates Cdc42'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (2): 969–78. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.2.969>.
- Cai, Dongpo, Anita Iyer, Kyriacos N. Felekis, Richard I. Near, Zhijun Luo, Jonathan Chernoff, Chris Albanese, Richard G. Pestell, and Adam Lerner. 2003a. 'AND-34/BCAR3, a GDP Exchange Factor Whose Overexpression Confers Antiestrogen Resistance, Activates Rac, PAK1, and the Cyclin D1 Promoter'. *Cancer Research* 63 (20): 6802–8.
- . 2003b. 'AND-34/BCAR3, a GDP Exchange Factor Whose Overexpression Confers Antiestrogen Resistance, Activates Rac, PAK1, and the Cyclin D1 Promoter'. *Cancer Research* 63 (20): 6802–8.
- Cao, Jun, Mengdi Zhang, Bin Wang, Long Zhang, Meiyu Fang, and Fangfang Zhou. 2021. 'Chemoresistance and Metastasis in Breast Cancer Molecular Mechanisms and Novel Clinical Strategies'. *Frontiers in Oncology* 11: 658552. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.658552>.
- Cao, Lu, and Yun Niu. 2020. 'Triple Negative Breast Cancer: Special Histological Types and Emerging Therapeutic Methods'. *Cancer Biology & Medicine* 17 (2): 293–306. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0465>.
- Cao, Xing-Jun, and Benjamin A. Garcia. 2016. 'Global Proteomics Analysis of Protein Lysine Methylation'. *Current Protocols in Protein Science* 86 (1): 24.8.1-24.8.19. <https://doi.org/10.1002/cpps.16>.
- Cardoso, F., S. Paluch-Shimon, E. Senkus, G. Curigliano, M. S. Aapro, F. André, C. H. Barrios, et al. 2020. '5th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 5)'. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 31 (12): 1623–49. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.09.010>.
- Caridi, Christopher Patrick, Matthias Plessner, Robert Grosse, and Irene Chiolo. 2019. 'Nuclear Actin Filaments in DNA Repair Dynamics'. *Nature Cell Biology* 21 (9): 1068–77. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0379-1>.
- Carlson, Scott M, Kaitlyn E Moore, Erin M Green, Glòria Mas Martín, and Or Gozani. 2014a. 'Proteome-Wide Enrichment of Proteins Modified by Lysine Methylation'. *Nature Protocols* 9 (1): 37–50. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.164>.
- Carlson, Scott M., Kaitlyn E. Moore, Erin M. Green, Glòria Mas Martín, and Or Gozani. 2014b. 'Proteome-Wide Enrichment of Proteins Modified by Lysine Methylation'. *Nature Protocols* 9 (1): 37–50. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.164>.
- Carlson, Scott M., Kaitlyn E. Moore, Saumya M. Sankaran, Nicolas Reynoird, Joshua E. Elias, and Or Gozani. 2015a. 'A Proteomic Strategy Identifies Lysine Methylation of Splicing Factor SnRNP70 by the SETMAR Enzyme*'. *Journal of Biological Chemistry* 290 (19): 12040–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.641530>.
- . 2015b. 'A Proteomic Strategy Identifies Lysine Methylation of Splicing Factor SnRNP70 by the SETMAR Enzyme'. *The Journal of Biological Chemistry* 290 (19): 12040–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.641530>.
- Carr, Simon M, Shonagh Munro, Benedikt Kessler, Udo Oppermann, and Nicholas B La Thangue. 2011. 'Interplay between Lysine Methylation and Cdk Phosphorylation in Growth Control by the Retinoblastoma Protein'. *The EMBO Journal* 30 (2): 317–27. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.311>.
- Casabona, Maria G., Yves Vandenbrouck, Ina Attree, and Yohann Couté. 2013. 'Proteomic Characterization of Pseudomonas Aeruginosa PAO1 Inner Membrane'. *Proteomics* 13 (16): 2419–23. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200565>.

- Case, Lindsay B., and Clare M. Waterman. 2015. 'Integration of Actin Dynamics and Cell Adhesion by a Three-Dimensional, Mechanosensitive Molecular Clutch'. *Nature Cell Biology* 17 (8): 955–63. <https://doi.org/10.1038/ncb3191>.
- Castrillon, D.H., and S.A. Wasserman. 1994. 'Diaphanous Is Required for Cytokinesis in Drosophila and Shares Domains of Similarity with the Products of the Limb Deformity Gene'. *Development* 120 (12): 3367–77. <https://doi.org/10.1242/dev.120.12.3367>.
- Caswell, Patrick T., and Tobias Zech. 2018. 'Actin-Based Cell Protrusion in a 3D Matrix'. *Trends in Cell Biology* 28 (10): 823–34. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.003>.
- Genik, Bercin K., and Ali Shilatifard. 2021. 'COMPASS and SWI/SNF Complexes in Development and Disease'. *Nature Reviews Genetics* 22 (1): 38–58. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0278-0>.
- Chambers, Ann F., Alan C. Groom, and Ian C. MacDonald. 2002. 'Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites'. *Nature Reviews Cancer* 2 (8): 563–72. <https://doi.org/10.1038/nrc865>.
- Chandramouli, Balasubramanian, and Giovanni Chillemi. 2016. 'Conformational Dynamics of Lysine Methyltransferase Smyd2. Insights into the Different Substrate Crevice Characteristics of Smyd2 and Smyd3'. *Journal of Chemical Information and Modeling* 56 (12): 2467–75. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00652>.
- Chandramouli, Balasubramanian, Gerry Melino, and Giovanni Chillemi. 2019. 'Smyd2 Conformational Changes in Response to P53 Binding: Role of the C-Terminal Domain'. *Molecular Oncology* 13 (6): 1450–61. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12502>.
- Chang, Chun-Ju, Jer-Yen Yang, Weiya Xia, Chun-Te Chen, Xiaoming Xie, Chi-Hong Chao, Wendy A. Woodward, Jung-Mao Hsu, Gabriel N. Hortobagyi, and Mien-Chie Hung. 2011. 'EZH2 Promotes Expansion of Breast Tumor Initiating Cells through Activation of RAF1- β -Catenin Signaling'. *Cancer Cell* 19 (1): 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.035>.
- Charras, Guillaume, and Ewa Paluch. 2008. 'Blebs Lead the Way: How to Migrate without Lamellipodia'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (9): 730–36. <https://doi.org/10.1038/nrm2453>.
- Chen, A., P. D. Arora, C. A. McCulloch, and A. Wilde. 2017. 'Cytokinesis Requires Localized β -Actin Filament Production by an Actin Isoform Specific Nucleator'. *Nature Communications* 8 (1): 1530. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01231-x>.
- Chen, Wen-Hui, Mu-Yan Cai, Jia-Xing Zhang, Feng-Wei Wang, Lin-Quan Tang, Yi-Ji Liao, Xiao-Han Jin, et al. 2018. 'FMNL1 Mediates Nasopharyngeal Carcinoma Cell Aggressiveness by Epigenetically Upregulating MTA1'. *Oncogene* 37 (48): 6243–58. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0351-8>.
- Chen, Wenjing, Andrew D. Hoffmann, Huiping Liu, and Xia Liu. 2018. 'Organotropism: New Insights into Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis'. *Npj Precision Oncology* 2 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41698-018-0047-0>.
- Cheung, Kevin J., Edward Gabrielson, Zena Werb, and Andrew J. Ewald. 2013. 'Collective Invasion in Breast Cancer Requires a Conserved Basal Epithelial Program'. *Cell* 155 (7): 1639–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.029>.
- Cho, Hyun-Soo, Shinya Hayami, Gouji Toyokawa, Kazuhiro Maejima, Yuka Yamane, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, et al. 2012. 'RB1 Methylation by SMYD2 Enhances Cell Cycle Progression through an Increase of RB1 Phosphorylation'. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 14 (6): 476–86. <https://doi.org/10.1593/neo.12656>.
- Choi, Colin K., Miguel Vicente-Manzanares, Jessica Zareno, Leanna A. Whitmore, Alex Mogilner, and Alan Rick Horwitz. 2008. 'Actin and α -Actinin Orchestrate the Assembly and Maturation of Nascent Adhesions in a Myosin II Motor-Independent Manner'. *Nature Cell Biology* 10 (9): 1039–50. <https://doi.org/10.1038/ncb1763>.
- Christenson, Jessica L., Kiel T. Butterfield, Nicole S. Spoelstra, John D. Norris, Jatinder S. Josan, Julie A. Pollock, Donald P. McDonnell, Benita S. Katzenellenbogen, John A. Katzenellenbogen, and Jennifer K. Richer. 2017. 'MMTV-PyMT and Derived Met-1 Mouse Mammary Tumor Cells as Models for Studying the Role of the Androgen

- Receptor in Triple-Negative Breast Cancer Progression'. *Hormones & Cancer* 8 (2): 69–77. <https://doi.org/10.1007/s12672-017-0285-6>.
- Chuikov, Sergei, Julia K. Kurash, Jonathan R. Wilson, Bing Xiao, Neil Justin, Gleb S. Ivanov, Kristine McKinney, et al. 2004. 'Regulation of P53 Activity through Lysine Methylation'. *Nature* 432 (7015): 353–60. <https://doi.org/10.1038/nature03117>.
- Clark, Andrew G, and Danijela Matic Vignjevic. 2015. 'Modes of Cancer Cell Invasion and the Role of the Microenvironment'. *Current Opinion in Cell Biology*, Cell adhesion and migration, 36 (October): 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.06.004>.
- Clarke, Steven G. 2013. 'Protein Methylation at the Surface and Buried Deep: Thinking Outside the Histone Box'. *Trends in Biochemical Sciences* 38 (5): 243–52. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.02.004>.
- Comb, D. G., N. Sarkar, and C. J. Pinzino. 1966. 'The Methylation of Lysine Residues in Protein'. *The Journal of Biological Chemistry* 241 (8): 1857–62.
- Cornett, Evan M., Bradley M. Dickson, Krzysztof Krajewski, Nicholas Spellmon, Andrew Umstead, Robert M. Vaughan, Kevin M. Shaw, et al. 2018. 'A Functional Proteomics Platform to Reveal the Sequence Determinants of Lysine Methyltransferase Substrate Selectivity'. *Science Advances* 4 (11): eaav2623. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav2623>.
- Cornett, Evan M., Laure Ferry, Pierre-Antoine Defossez, and Scott B. Rothbart. 2019a. 'Lysine Methylation Regulators Moonlighting Outside the Epigenome'. *Molecular Cell* 75 (6): 1092–1101. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.026>.
- . 2019b. 'Lysine Methylation Regulators Moonlighting Outside the Epigenome'. *Molecular Cell* 75 (6): 1092–1101. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.026>.
- Courtemanche, Naomi. 2018. 'Mechanisms of Formin-Mediated Actin Assembly and Dynamics'. *Biophysical Reviews* 10 (6): 1553–69. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0468-6>.
- Cox, Jürgen, and Matthias Mann. 2008. 'MaxQuant Enables High Peptide Identification Rates, Individualized p.p.b.-Range Mass Accuracies and Proteome-Wide Protein Quantification'. *Nature Biotechnology* 26 (12): 1367–72. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>.
- CP, Wild, Weiderpass E, and Stewart BW. 2020. *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. IARC. <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-Cancer-Research-For-Cancer-Prevention-2020>.
- Cross, A. M., A. L. Wilson, M. S. Guerrero, K. S. Thomas, A. I. Bachir, K. E. Kubow, A. R. Horwitz, and A. H. Bouton. 2016a. 'Breast Cancer Antiestrogen Resistance 3-P130Cas Interactions Promote Adhesion Disassembly and Invasion in Breast Cancer Cells'. *Oncogene* 35 (45): 5850–59. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.123>.
- . 2016b. 'Breast Cancer Antiestrogen Resistance 3-P130Cas Interactions Promote Adhesion Disassembly and Invasion in Breast Cancer Cells'. *Oncogene* 35 (45): 5850–59. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.123>.
- Cui, Fusheng, Yuqing Ji, Man Wang, Fengxiao Gao, Yongcai Li, and Xueshen Li. 2019. 'MiR-143 Inhibits Proliferation and Metastasis of Nasopharyngeal Carcinoma Cells via Targeting FMNL1 Based on Clinical and Radiologic Findings'. *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (10): 16427–34. <https://doi.org/10.1002/jcb.28709>.
- Daigle, Scott R., Edward J. Olhava, Carly A. Therkelsen, Christina R. Majer, Christopher J. Sneeringer, Jeffrey Song, L. Danielle Johnston, et al. 2011. 'Selective Killing of Mixed Lineage Leukemia Cells by a Potent Small-Molecule DOT1L Inhibitor'. *Cancer Cell* 20 (1): 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.009>.
- Dawood, Shaheenah, and Ana M. Gonzalez-Angulo. 2013. 'Progress in the Biological Understanding and Management of Breast Cancer-Associated Central Nervous System Metastases'. *The Oncologist* 18 (6): 675–84. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0438>.

- Defilippi, Paola, Paola Di Stefano, and Sara Cabodi. 2006. 'P130Cas: A Versatile Scaffold in Signaling Networks'. *Trends in Cell Biology* 16 (5): 257–63. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.03.003>.
- Dehapiot, Benoit, Raphaël Clément, Hervé Alégot, Gabriella Gzásó-Gerhát, Jean-Marc Philippe, and Thomas Lecuit. 2020. 'Assembly of a Persistent Apical Actin Network by the Formin Frl/Fmnl Tunes Epithelial Cell Deformability'. *Nature Cell Biology* 22 (7): 791–802. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0524-x>.
- Deng, Xiaolan, Ryuji Hamamoto, Theodore Vougiouklakis, Rui Wang, Yuichiro Yoshioka, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Yo Matsuo, Jae-Hyun Park, and Yusuke Nakamura. 2017. 'Critical Roles of SMYD2-Mediated β -Catenin Methylation for Nuclear Translocation and Activation of Wnt Signaling'. *Oncotarget* 8 (34): 55837–47. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19646>.
- Diehl, Florian, Mark A. Brown, Machteld J. van Amerongen, Tatyana Novoyatleva, Astrid Wietelmann, June Harriss, Fulvia Ferrazzi, et al. 2010. 'Cardiac Deletion of Smyd2 Is Dispensable for Mouse Heart Development'. *PLoS One* 5 (3): e9748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009748>.
- Dilworth, David, and Dalia Barsyte-Lovejoy. 2019. 'Targeting Protein Methylation: From Chemical Tools to Precision Medicines'. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (15): 2967–85. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03147-9>.
- Dimchev, Vanessa, Ines Lahmann, Stefan A. Koestler, Frieda Kage, Georgi Dimchev, Anika Steffen, Theresia E. B. Stradal, Franz Vauti, Hans-Henning Arnold, and Klemens Rottner. 2021. 'Induced Arp2/3 Complex Depletion Increases FMNL2/3 Formin Expression and Filopodia Formation'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (February): 634708. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.634708>.
- Diz-Muñoz, Alba, Michael Krieg, Martin Bergert, Itziar Ibarlucea-Benitez, Daniel J. Muller, Ewa Paluch, and Carl-Philipp Heisenberg. 2010. 'Control of Directed Cell Migration In Vivo by Membrane-to-Cortex Attachment'. *PLoS Biology* 8 (11): e1000544. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000544>.
- Donlin, Laura T., Christian Andresen, Steffen Just, Eugene Rudensky, Christopher T. Pappas, Martina Kruger, Erica Y. Jacobs, et al. 2012. 'Smyd2 Controls Cytoplasmic Lysine Methylation of Hsp90 and Myofilament Organization'. *Genes & Development* 26 (2): 114–19. <https://doi.org/10.1101/gad.177758.111>.
- Dorssers, L C, T van Agthoven, A Dekker, T L van Agthoven, and E M Kok. 1993. 'Induction of Antiestrogen Resistance in Human Breast Cancer Cells by Random Insertional Mutagenesis Using Defective Retroviruses: Identification of Bcar-1, a Common Integration Site.' *Molecular Endocrinology* 7 (7): 870–78. <https://doi.org/10.1210/mend.7.7.8413311>.
- Dorssers, Lambert C. J., Ton van Agthoven, Arend Brinkman, Jos Veldscholte, Marcel Smid, and Koen J. Decherig. 2005. 'Breast Cancer Oestrogen Independence Mediated by BCAR1 or BCAR3 Genes Is Transmitted through Mechanisms Distinct from the Oestrogen Receptor Signalling Pathway or the Epidermal Growth Factor Receptor Signalling Pathway'. *Breast Cancer Research: BCR* 7 (1): R82-92. <https://doi.org/10.1186/bcr954>.
- Dorssers, Lambert C. J., and Jos Veldscholte. 1997. 'Identification of a Novel Breast-Cancer-Anti-Estrogen-Resistance (BCAR2) Locus by Cell-Fusion-Mediated Gene Transfer in Human Breast-Cancer Cells'. *International Journal of Cancer* 72 (4): 700–705. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970807\)72:4<700::AID-IJC24>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970807)72:4<700::AID-IJC24>3.0.CO;2-D).
- Eggert, Erik, Roman C. Hillig, Silke Koehr, Detlef Stöckigt, Jörg Weiske, Naomi Barak, Jeffrey Mowat, et al. 2016a. 'Discovery and Characterization of a Highly Potent and Selective Aminopyrazoline-Based in Vivo Probe (BAY-598) for the Protein Lysine Methyltransferase SMYD2'. *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (10): 4578–4600. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01890>.
- . 2016b. 'Discovery and Characterization of a Highly Potent and Selective Aminopyrazoline-Based in Vivo Probe (BAY-598) for the Protein Lysine

- Methyltransferase SMYD2'. *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (10): 4578–4600. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01890>.
- Emsley, Paul, and Kevin Cowtan. 2004. 'Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics'. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 60 (Pt 12 Pt 1): 2126–32. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>.
- Engelhard, Victor H, Rebecca C Obeng, Kara L Cummings, Gina R Petroni, Angela L Ambakhutwala, Kimberly A Chianese-Bullock, Kelly T Smith, et al. 2020. 'MHC-Restricted Phosphopeptide Antigens: Preclinical Validation and First-in-Humans Clinical Trial in Participants with High-Risk Melanoma'. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 8 (1). <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000262>.
- Engqvist, Hanna, Toshima Z. Parris, Anikó Kovács, Elisabeth Werner Rönnerman, Karin Sundfeldt, Per Karlsson, and Khalil Helou. 2020. 'Validation of Novel Prognostic Biomarkers for Early-Stage Clear-Cell, Endometrioid and Mucinous Ovarian Carcinomas Using Immunohistochemistry'. *Frontiers in Oncology* 10: 162. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00162>.
- Esteva, Francisco J, Vanessa M Hubbard-Lucey, Jun Tang, and Lajos Pusztai. 2019. 'Immunotherapy and Targeted Therapy Combinations in Metastatic Breast Cancer'. *The Lancet Oncology* 20 (3): e175–86. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30026-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30026-9).
- Fang, Dong, Haiyun Gan, Liang Cheng, Jeong-Heon Lee, Hui Zhou, Jann N Sarkaria, David J Daniels, and Zhiguo Zhang. 2018. 'H3.3K27M Mutant Proteins Reprogram Epigenome by Sequestering the PRC2 Complex to Poised Enhancers'. Edited by Jerry L Workman. *ELife* 7 (June): e36696. <https://doi.org/10.7554/eLife.36696>.
- Fang, Lan, Hongqi Teng, Yilin Wang, Guanghong Liao, Linjun Weng, Yaxu Li, Xinbo Wang, et al. 2018. 'SET1A-Mediated Mono-Methylation at K342 Regulates YAP Activation by Blocking Its Nuclear Export and Promotes Tumorigenesis'. *Cancer Cell* 34 (1): 103–118.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.06.002>.
- Fares, Jawad, Mohamad Y. Fares, Hussein H. Khachfe, Hamza A. Salhab, and Youssef Fares. 2020. 'Molecular Principles of Metastasis: A Hallmark of Cancer Revisited'. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>.
- Favaro, Patricia, Fabiola Traina, João Agostinho Machado-Neto, Mariana Lazarini, Matheus Rodrigues Lopes, João Kleber Novais Pereira, Fernando Ferreira Costa, Elvira Infante, Anne J. Ridley, and Sara Teresinha Olalla Saad. 2013. 'FMNL1 Promotes Proliferation and Migration of Leukemia Cells'. *Journal of Leukocyte Biology* 94 (3): 503–12. <https://doi.org/10.1189/jlb.0113057>.
- Fay, Michael J, Kenneth A Longo, George A Karathanasis, David M Shope, Craig J Mandernach, Jason R Leong, Alfred Hicks, Kenneth Pherson, and Aymna Husain. 2003. 'Analysis of CUL-5 Expression in Breast Epithelial Cells, Breast Cancer Cell Lines, Normal Tissues and Tumor Tissues'. *Molecular Cancer* 2 (November): 40. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-2-40>.
- Felekis, Kyriacos N., Radha P. Narsimhan, Richard Near, Ariel F. Castro, Yi Zheng, Lawrence A. Quilliam, and Adam Lerner. 2005. 'AND-34 Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase and Induces Anti-Estrogen Resistance in a SH2 and GDP Exchange Factor-like Domain-Dependent Manner'. *Molecular Cancer Research: MCR* 3 (1): 32–41.
- Felekis, Kyriacos, Lawrence A. Quilliam, and Adam Lerner. 2006. 'Characterization of AND-34 Function and Signaling'. *Methods in Enzymology* 407: 55–63. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)07006-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)07006-0).
- Feng, Qin, Hengbin Wang, Huck Hui Ng, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Kevin Struhl, and Yi Zhang. 2002. 'Methylation of H3-Lysine 79 Is Mediated by a New Family of HMTases without a SET Domain'. *Current Biology* 12 (12): 1052–58. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00901-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00901-6).
- Fenzia, Claudio, Cinzia Bottino, Silvia Corbetta, Raffaella Fittipaldi, Pamela Floris, Germano Gaudenzi, Silvia Carra, Franco Cotelli, Giovanni Vitale, and Giuseppina Caretti.

2019. 'SMYD3 Promotes the Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer'. *Nucleic Acids Research* 47 (3): 1278–93. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1221>.
- Ferguson, Andrew D., Nicholas A. Larsen, Tina Howard, Hannah Pollard, Isabelle Green, Christie Grande, Tony Cheung, et al. 2011. 'Structural Basis of Substrate Methylation and Inhibition of SMYD2'. *Structure (London, England: 1993)* 19 (9): 1262–73. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.06.011>.
- Fischle, Wolfgang, Boo Shan Tseng, Holger L. Dormann, Beatrix M. Ueberheide, Benjamin A. Garcia, Jeffrey Shabanowitz, Donald F. Hunt, Hironori Funabiki, and C. David Allis. 2005. 'Regulation of HP1-Chromatin Binding by Histone H3 Methylation and Phosphorylation'. *Nature* 438 (7071): 1116–22. <https://doi.org/10.1038/nature04219>.
- Flavahan, William A., Elizabeth Gaskell, and Bradley E. Bernstein. 2017. 'Epigenetic Plasticity and the Hallmarks of Cancer'. *Science* 357 (6348). <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>.
- Flier, Silvia van der, Christina M. W. Chan, Arend Brinkman, Marcel Smid, Stephen R. D. Johnston, Lambert C. J. Dorssers, and Mitchell Dowsett. 2000. 'BCAR1/P130Cas Expression in Untreated and Acquired Tamoxifen-Resistant Human Breast Carcinomas'. *International Journal of Cancer* 89 (5): 465–68. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20000920\)89:5<465::AID-IJC11>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20000920)89:5<465::AID-IJC11>3.0.CO;2-O).
- Friedl, Peter, and Katarina Wolf. 2009. 'Proteolytic Interstitial Cell Migration: A Five-Step Process'. *Cancer and Metastasis Reviews* 28 (1): 129–35. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9174-3>.
- . 2010. 'Plasticity of Cell Migration: A Multiscale Tuning Model'. *The Journal of Cell Biology* 188 (1): 11–19. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909003>.
- Fujiki, Ryoji, Toshihiro Chikanishi, Waka Hashiba, Hiroaki Ito, Ichiro Takada, Robert G. Roeder, Hirochika Kitagawa, and Shigeaki Kato. 2014. 'Retraction Note: GlcNAcylation of a Histone Methyltransferase in Retinoic-Acid-Induced Granulopoiesis'. *Nature* 505 (7484): 574–574. <https://doi.org/10.1038/nature12896>.
- Gao, Shuman, Zhiqiang Wang, Wencai Wang, Xueli Hu, Peilin Chen, Jiwen Li, Xinhua Feng, Jiemin Wong, and James X. Du. 2017. 'The Lysine Methyltransferase SMYD2 Methylates the Kinase Domain of Type II Receptor BMPR2 and Stimulates Bone Morphogenetic Protein Signaling'. *The Journal of Biological Chemistry* 292 (30): 12702–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.776278>.
- Gao, Xuhui, Xuelian Wang, Kaican Cai, Wujun Wang, Qun Ju, Xiyao Yang, Haofei Wang, and Hua Wu. 2016. 'MicroRNA-127 Is a Tumor Suppressor in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma through the Regulation of Oncogene FMNL3'. *European Journal of Pharmacology* 791 (November): 603–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.09.025>.
- Gardberg, Maria, Vanina D. Heuser, Ilkka Koskivuo, Mari Koivisto, and Olli Carpén. 2016. 'FMNL2/FMNL3 Formins Are Linked with Oncogenic Pathways and Predict Melanoma Outcome'. *The Journal of Pathology. Clinical Research* 2 (1): 41–52. <https://doi.org/10.1002/cjp2.34>.
- Glentis, Alexandros, Vasily Gurchenkov, and Danijela Matic Vignjevic. 2014. 'Assembly, Heterogeneity, and Breaching of the Basement Membranes'. *Cell Adhesion & Migration* 8 (3): 236–45. <https://doi.org/10.4161/cam.28733>.
- Godinho, M. F. E., A. M. Sieuwerts, M. P. Look, D. Meijer, J. A. Foekens, L. C. J. Dorssers, and T. van Agthoven. 2010. 'Relevance of BCAR4 in Tamoxifen Resistance and Tumour Aggressiveness of Human Breast Cancer'. *British Journal of Cancer* 103 (8): 1284–91. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605884>.
- Gorelik, Roman, and Alexis Gautreau. 2014. 'Quantitative and Unbiased Analysis of Directional Persistence in Cell Migration'. *Nature Protocols* 9 (8): 1931–43. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.131>.
- Gotoh, T., D. Cai, X. Tian, L. A. Feig, and A. Lerner. 2000. 'P130Cas Regulates the Activity of AND-34, a Novel Ral, Rap1, and R-Ras Guanine Nucleotide Exchange Factor'. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (39): 30118–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003074200>.

- Gottlieb, Paul D., Stephanie A. Pierce, Robert J. Sims, Hiroyuki Yamagishi, Elizabeth K. Weihe, June V. Harriss, Shanna D. Maika, et al. 2002. 'Bop Encodes a Muscle-Restricted Protein Containing MYND and SET Domains and Is Essential for Cardiac Differentiation and Morphogenesis'. *Nature Genetics* 31 (1): 25–32. <https://doi.org/10.1038/ng866>.
- Grimes, Mark, Benjamin Hall, Lauren Foltz, Tyler Levy, Klarisa Rikova, Jeremiah Gaiser, William Cook, et al. 2018. 'Integration of Protein Phosphorylation, Acetylation, and Methylation Datasets to Outline Lung Cancer Signaling Networks'. *Science Signaling* 11 (531): eaaq1087. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaq1087>.
- Grobe, Hanna, Andrea Wüstenhagen, Christian Baarlink, Robert Grosse, and Katharina Grikscheit. 2018. 'A Rac1-FMNL2 Signaling Module Affects Cell-Cell Contact Formation Independent of Cdc42 and Membrane Protrusions'. *PLOS ONE* 13 (3): e0194716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194716>.
- Guo, Ailan, Hongbo Gu, Jing Zhou, Daniel Mulhern, Yi Wang, Kimberly A. Lee, Vicky Yang, et al. 2014a. 'Immunoaffinity Enrichment and Mass Spectrometry Analysis of Protein Methylation'. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 13 (1): 372–87. <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.027870>.
- . 2014b. 'Immunoaffinity Enrichment and Mass Spectrometry Analysis of Protein Methylation'. *Molecular & Cellular Proteomics* 13 (1): 372–87. <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.027870>.
- Hamamoto, Ryuji, Yoichi Furukawa, Masashi Morita, Yuko Iimura, Fabio Pittella Silva, Meihua Li, Ryuichiro Yagyu, and Yusuke Nakamura. 2004. 'SMYD3 Encodes a Histone Methyltransferase Involved in the Proliferation of Cancer Cells'. *Nature Cell Biology* 6 (8): 731–40. <https://doi.org/10.1038/ncb1151>.
- Hamamoto, Ryuji, Vassiliki Saloura, and Yusuke Nakamura. 2015. 'Critical Roles of Non-Histone Protein Lysine Methylation in Human Tumorigenesis'. *Nature Reviews Cancer* 15 (2): 110–24. <https://doi.org/10.1038/nrc3884>.
- Han, Yanyan, Elfriede Eppinger, Ingrid G. Schuster, Luise U. Weigand, Xiaoling Liang, Elisabeth Kremmer, Christian Peschel, and Angela M. Krackhardt. 2009. 'Formin-like 1 (FMNL1) Is Regulated by N-Terminal Myristoylation and Induces Polarized Membrane Blebbing'. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (48): 33409–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.060699>.
- Hanker, Ariella B., Dhivya R. Sudhan, and Carlos L. Arteaga. 2020. 'Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer'. *Cancer Cell* 37 (4): 496–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.009>.
- Harbeck, Nadia, Frédérique Penault-Llorca, Javier Cortes, Michael Gnant, Nehmat Houssami, Philip Poortmans, Kathryn Ruddy, Janice Tsang, and Fatima Cardoso. 2019. 'Breast Cancer'. *Nature Reviews Disease Primers* 5 (1): 1–31. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.
- Harper, Kathryn L., Maria Soledad Sosa, David Entenberg, Hedayatollah Hosseini, Julie F. Cheung, Rita Nobre, Alvaro Avivar-Valderas, et al. 2016. 'Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2 + Mammary Cancer'. *Nature* 540 (7634): 588–92. <https://doi.org/10.1038/nature20609>.
- Harris, Elizabeth S., Timothy J. Gauvin, Ernest G. Heimsath, and Henry N. Higgs. 2010. 'Assembly of Filopodia by the Formin FRL2 (FMNL3)'. *Cytoskeleton* 67 (12): 755–72. <https://doi.org/10.1002/cm.20485>.
- Harris, William J., Xu Huang, James T. Lynch, Gary J. Spencer, James R. Hitchin, Yaoyong Li, Filippo Ciceri, et al. 2012. 'The Histone Demethylase KDM1A Sustains the Oncogenic Potential of MLL-AF9 Leukemia Stem Cells'. *Cancer Cell* 21 (4): 473–87. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.014>.
- He, Aibin, Xiaohua Shen, Qing Ma, Jingjing Cao, Alexander von Gise, Pingzhu Zhou, Gang Wang, Victor E. Marquez, Stuart H. Orkin, and William T. Pu. 2012. 'PRC2 Directly Methylates GATA4 and Represses Its Transcriptional Activity'. *Genes & Development* 26 (1): 37–42. <https://doi.org/10.1101/gad.173930.111>.

- Heo, Kyung-Sun. 2019. 'Regulation of Post-Translational Modification in Breast Cancer Treatment'. *BMB Reports* 52 (2): 113–18.
- Hetheridge, Clare, Alice N. Scott, Rajeeb K. Swain, John W. Copeland, Henry N. Higgs, Roy Bicknell, and Harry Mellor. 2012. 'The Formin FMNL3 Is a Cytoskeletal Regulator of Angiogenesis'. *Journal of Cell Science* 125 (Pt 6): 1420–28. <https://doi.org/10.1242/jcs.091066>.
- Higashida, Chiharu, Takushi Miyoshi, Akiko Fujita, Fabian Ocegüera-Yanez, James Monypenny, Yoshikazu Andou, Shuh Narumiya, and Naoki Watanabe. 2004. 'Actin Polymerization-Driven Molecular Movement of MDia1 in Living Cells'. *Science (New York, N. Y.)* 303 (5666): 2007–10. <https://doi.org/10.1126/science.1093923>.
- Higgs, Henry N., and Kevin J. Peterson. 2005. 'Phylogenetic Analysis of the Formin Homology 2 Domain'. *Molecular Biology of the Cell* 16 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0565>.
- Hitosugi, T., and J. Chen. 2014. 'Post-Translational Modifications and the Warburg Effect'. *Oncogene* 33 (34): 4279–85. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.406>.
- Horstmann, Julia A., Michele Lunelli, Hélène Cazzola, Johannes Heidemann, Caroline K  hne, Pascal Steffen, Sandra Szefs, et al. 2020. 'Methylation of Salmonella Typhimurium Flagella Promotes Bacterial Adhesion and Host Cell Invasion'. *Nature Communications* 11 (1): 2013. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15738-3>.
- Hortobagyi, G. N. 1998. 'Treatment of Breast Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 339 (14): 974–84. <https://doi.org/10.1056/NEJM199810013391407>.
- Hosseini, Hedayatollah, Milan M. S. Obradovi  , Martin Hoffmann, Kathryn L. Harper, Maria Soledad Sosa, Melanie Werner-Klein, Lahiri Kanth Nanduri, et al. 2016. 'Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer'. *Nature* 540 (7634): 552–58. <https://doi.org/10.1038/nature20785>.
- Huang, Jing, Laura Perez-Burgos, Brandon J. Placek, Roopsha Sengupta, Mario Richter, Jean A. Dorsey, Stefan Kubicek, Susanne Opravil, Thomas Jenuwein, and Shelley L. Berger. 2006. 'Repression of P53 Activity by Smyd2-Mediated Methylation'. *Nature* 444 (7119): 629–32. <https://doi.org/10.1038/nature05287>.
- Huang, Jing, Roopsha Sengupta, Aleksandra B. Espejo, Min Gyu Lee, Jean A. Dorsey, Mario Richter, Susanne Opravil, et al. 2007. 'P53 Is Regulated by the Lysine Demethylase LSD1'. *Nature* 449 (7158): 105–8. <https://doi.org/10.1038/nature06092>.
- Humphries, Jonathan D, Megan R Chastney, Janet A Askari, and Martin J Humphries. 2019. 'Signal Transduction via Integrin Adhesion Complexes'. *Current Opinion in Cell Biology, Cell Architecture*, 56 (February): 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.08.004>.
- H  semann, Yves, Jochen B. Geigl, Falk Schubert, Piero Musiani, Manfred Meyer, Elke Burghart, Guido Forni, et al. 2008. 'Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer'. *Cancer Cell* 13 (1): 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.003>.
- Husmann, Dylan, and Or Gozani. 2019. 'Histone Lysine Methyltransferases in Biology and Disease'. *Nature Structural & Molecular Biology* 26 (10): 880–89. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0298-7>.
- Huxley, H. E. 1963. 'Electron Microscope Studies on the Structure of Natural and Synthetic Protein Filaments from Striated Muscle'. *Journal of Molecular Biology* 7 (3): 281–IN30. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80008-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80008-X).
- Hyman, Anthony A., Christoph A. Weber, and Frank J  licher. 2014. 'Liquid-Liquid Phase Separation in Biology'. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30: 39–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013325>.
- Ingouff, Mathieu, Jonathan N. Fitz Gerald, Christophe Guérin, Hélène Robert, Mikael Blom S  rensen, Daniel Van Damme, Danny Geelen, Laurent Blanchoin, and Frédéric Berger. 2005. 'Plant Formin AtFH5 Is an Evolutionarily Conserved Actin Nucleator Involved in Cytokinesis'. *Nature Cell Biology* 7 (4): 374–80. <https://doi.org/10.1038/ncb1238>.
- Ishizaki, Toshimasa, Yosuke Morishima, Muneo Okamoto, Tomoyuki Furuyashiki, Takayuki Kato, and Shuh Narumiya. 2001. 'Coordination of Microtubules and the Actin

- Cytoskeleton by the Rho Effector MDia1'. *Nature Cell Biology* 3 (1): 8–14. <https://doi.org/10.1038/35050598>.
- Jacquemet, Guillaume, Aki Stubb, Rafael Saup, Mitro Miihkinen, Elena Kremneva, Hellyeh Hamidi, and Johanna Ivaska. 2019. 'Filopodome Mapping Identifies P130Cas as a Mechanosensitive Regulator of Filopodia Stability'. *Current Biology* 29 (2): 202–216.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.053>.
- Jambhekar, Ashwini, Abhinav Dhall, and Yang Shi. 2019. 'Roles and Regulation of Histone Methylation in Animal Development'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (10): 625–41. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0151-1>.
- James, Lindsey I., Dalia Barsyte-Lovejoy, Nan Zhong, Liubov Krichevsky, Victoria K. Korboukh, J. Martin Herold, Christopher J. MacNevin, et al. 2013. 'Discovery of a Chemical Probe for the L3MBTL3 Methyllysine Reader Domain'. *Nature Chemical Biology* 9 (3): 184–91. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1157>.
- James, Lindsey I, and Stephen V Frye. 2016. 'Chemical Probes for Methyl Lysine Reader Domains'. *Current Opinion in Chemical Biology, Chemical genetics and epigenetics * Molecular imaging*, 33 (August): 135–41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.004>.
- Janoštiak, Radoslav, Andreea Csilla Pataki, Jan Brábek, and Daniel Rösel. 2014. 'Mechanosensors in Integrin Signaling: The Emerging Role of P130Cas'. *European Journal of Cell Biology, Cell Migration and Invasion in Physiology and Pathology.*, 93 (10): 445–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.002>.
- Jenuwein, Thomas, and C. David Allis. 2001. 'Translating the Histone Code'. *Science* 293 (5532): 1074–80. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>.
- Jiang, Hao, Abhijit Shukla, Xiaoling Wang, Wei-yi Chen, Bradley E. Bernstein, and Robert G. Roeder. 2011. 'Role for Dpy-30 in ES Cell-Fate Specification by Regulation of H3K4 Methylation within Bivalent Domains'. *Cell* 144 (4): 513–25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.020>.
- Jiang, Yuanyuan, Laura Trescott, Joshua Holcomb, Xi Zhang, Joseph Brunzelle, Nualpun Sirinupong, Xiaobing Shi, and Zhe Yang. 2014. 'Structural Insights into Estrogen Receptor α Methylation by Histone Methyltransferase SMYD2, a Cellular Event Implicated in Estrogen Signaling Regulation'. *Journal of Molecular Biology* 426 (20): 3413–25. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.02.019>.
- Jones, D. T. 1999. 'Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-Specific Scoring Matrices'. *Journal of Molecular Biology* 292 (2): 195–202. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3091>.
- Jones, Gregory T., Gerard Tromp, Helena Kuivaniemi, Solveig Gretarsdottir, Annette F. Baas, Betti Giusti, Ewa Strauss, et al. 2017. 'Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies for Abdominal Aortic Aneurysm Identifies Four New Disease-Specific Risk Loci'. *Circulation Research* 120 (2): 341–53. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308765>.
- Kage, Frieda, Anika Steffen, Adolf Ellinger, Carmen Ranftler, Christian Gehre, Cord Brakebusch, Margit Pavelka, Theresia Stradal, and Klemens Rottner. 2017. 'FMNL2 and -3 Regulate Golgi Architecture and Anterograde Transport Downstream of Cdc42'. *Scientific Reports* 7 (1): 9791. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09952-1>.
- Kage, Frieda, Moritz Winterhoff, Vanessa Dimchev, Jan Mueller, Tobias Thalheim, Anika Freise, Stefan Brühmann, et al. 2017a. 'FMNL Formins Boost Lamellipodial Force Generation'. *Nature Communications* 8 (1): 14832. <https://doi.org/10.1038/ncomms14832>.
- . 2017b. 'FMNL Formins Boost Lamellipodial Force Generation'. *Nature Communications* 8 (1): 14832. <https://doi.org/10.1038/ncomms14832>.
- Kamps, Jos J. A. G., Jiaxin Huang, Jordi Poater, Chao Xu, Bas J. G. E. Pieters, Aiping Dong, Jinrong Min, et al. 2015. 'Chemical Basis for the Recognition of Trimethyllysine by Epigenetic Reader Proteins'. *Nature Communications* 6 (1): 8911. <https://doi.org/10.1038/ncomms9911>.

- Katoh, Masuko, and Masaru Katoh. 2003a. 'Identification and Characterization of Human FMNL1, FMNL2 and FMNL3 Genes in Silico'. *International Journal of Oncology* 22 (5): 1161–68.
- . 2003b. 'Identification and Characterization of Human FMNL1, FMNL2 and FMNL3 Genes in Silico'. *International Journal of Oncology* 22 (5): 1161–68. <https://doi.org/10.3892/ijo.22.5.1161>.
- Katsuno-Kambe, Hiroko, Robert G. Parton, Alpha S. Yap, and Jessica L. Teo. 2021. 'Caveolin-1 Influences Epithelial Collective Cell Migration via FMNL2 Formin'. *Biology of the Cell* 113 (2): 107–17. <https://doi.org/10.1111/boc.202000116>.
- Kim, Eunhee, Misuk Kim, Dong-Hun Woo, Yongjae Shin, Jihye Shin, Nakho Chang, Young Taek Oh, et al. 2013. 'Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells'. *Cancer Cell* 23 (6): 839–52. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.008>.
- Kim, Kimberly H., and Charles W. M. Roberts. 2016. 'Targeting EZH2 in Cancer'. *Nature Medicine* 22 (2): 128–34. <https://doi.org/10.1038/nm.4036>.
- Kim, Sangduk, and Woon Ki Paik. 1965. 'Studies on the Origin of ϵ -N-Methyl-L-Lysine in Protein'. *Journal of Biological Chemistry* 240 (12): 4629–34. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)97001-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)97001-8).
- Kim, Woojin, Gregory H. Bird, Tobias Neff, Guoji Guo, Marc A. Kerényi, Loren D. Walensky, and Stuart H. Orkin. 2013. 'Targeted Disruption of the EZH2–EED Complex Inhibits EZH2-Dependent Cancer'. *Nature Chemical Biology* 9 (10): 643–50. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1331>.
- Kitzing, T. M., Y. Wang, O. Pertz, J. W. Copeland, and R. Grosse. 2010. 'Formin-like 2 Drives Amoeboid Invasive Cell Motility Downstream of RhoC'. *Oncogene* 29 (16): 2441–48. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.515>.
- Kleer, Celina G., Qi Cao, Sooryanarayana Varambally, Ronglai Shen, Ichiro Ota, Scott A. Tomlins, Debashis Ghosh, et al. 2003. 'EZH2 Is a Marker of Aggressive Breast Cancer and Promotes Neoplastic Transformation of Breast Epithelial Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (20): 11606–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.1933744100>.
- Klein, Brianna J., Lianhua Piao, Yuanxin Xi, Hector Rincon-Arano, Scott B. Rothbart, Danni Peng, Hong Wen, et al. 2014. 'The Histone-H3K4-Specific Demethylase KDM5B Binds to Its Substrate and Product through Distinct PHD Fingers'. *Cell Reports* 6 (2): 325–35. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.021>.
- Klein, Christoph A. 2009. 'Parallel Progression of Primary Tumours and Metastases'. *Nature Reviews Cancer* 9 (4): 302–12. <https://doi.org/10.1038/nrc2627>.
- Koboldt, Daniel C., Robert S. Fulton, Michael D. McLellan, Heather Schmidt, Joelle Kalicki-Veizer, Joshua F. McMichael, Lucinda L. Fulton, et al. 2012. 'Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumours'. *Nature* 490 (7418): 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>.
- Komatsu, S., D. Ichikawa, S. Hirajima, H. Nagata, Y. Nishimura, T. Kawaguchi, M. Miyamae, et al. 2015. 'Overexpression of SMYD2 Contributes to Malignant Outcome in Gastric Cancer'. *British Journal of Cancer* 112 (2): 357–64. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.543>.
- Komatsu, Shuhei, Issei Imoto, Hitoshi Tsuda, Ken-ich Kozaki, Tomoki Muramatsu, Yutaka Shimada, Satoshi Aiko, et al. 2009. 'Overexpression of SMYD2 Relates to Tumor Cell Proliferation and Malignant Outcome of Esophageal Squamous Cell Carcinoma'. *Carcinogenesis* 30 (7): 1139–46. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp116>.
- Kovar, David R., Elizabeth S. Harris, Rachel Mahaffy, Henry N. Higgs, and Thomas D. Pollard. 2006. 'Control of the Assembly of ATP- and ADP-Actin by Formins and Profilin'. *Cell* 124 (2): 423–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.038>.
- Krause, Matthias, and Alexis Gautreau. 2014a. 'Steering Cell Migration: Lamellipodium Dynamics and the Regulation of Directional Persistence'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (9): 577–90. <https://doi.org/10.1038/nrm3861>.

- . 2014b. 'Steering Cell Migration: Lamellipodium Dynamics and the Regulation of Directional Persistence'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (9): 577–90. <https://doi.org/10.1038/nrm3861>.
- Kubicek, Stefan, Roderick J. O'Sullivan, E. Michael August, Eugene R. Hickey, Qiang Zhang, Miguel L. Teodoro, Stephen Rea, et al. 2007. 'Reversal of H3K9me2 by a Small-Molecule Inhibitor for the G9a Histone Methyltransferase'. *Molecular Cell* 25 (3): 473–81. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.017>.
- Kudithipudi, Srikanth, and Albert Jeltsch. 2014. 'Role of Somatic Cancer Mutations in Human Protein Lysine Methyltransferases'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1846 (2): 366–79. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.08.002>.
- Kühn, Sonja, Constanze Erdmann, Frieda Kage, Jennifer Block, Lisa Schwenkmezger, Anika Steffen, Klemens Rottner, and Matthias Geyer. 2015a. 'The Structure of FMNL2–Cdc42 Yields Insights into the Mechanism of Lamellipodia and Filopodia Formation'. *Nature Communications* 6 (May). <https://doi.org/10.1038/ncomms8088>.
- . 2015b. 'The Structure of FMNL2–Cdc42 Yields Insights into the Mechanism of Lamellipodia and Filopodia Formation'. *Nature Communications* 6 (1): 7088. <https://doi.org/10.1038/ncomms8088>.
- Kühn, Sonja, and Matthias Geyer. 2014a. 'Formins as Effector Proteins of Rho GTPases'. *Small GTPases* 5: e29513. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29513>.
- . 2014b. 'Formins as Effector Proteins of Rho GTPases'. *Small GTPases* 5 (3): e983876. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29513>.
- Lachner, Monika, Dónal O'Carroll, Stephen Rea, Karl Mechtler, and Thomas Jenuwein. 2001. 'Methylation of Histone H3 Lysine 9 Creates a Binding Site for HP1 Proteins'. *Nature* 410 (6824): 116–20. <https://doi.org/10.1038/35065132>.
- Lambert, Arthur W., Diwakar R. Pattabiraman, and Robert A. Weinberg. 2017a. 'Emerging Biological Principles of Metastasis'. *Cell* 168 (4): 670–91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>.
- . 2017b. 'Emerging Biological Principles of Metastasis'. *Cell* 168 (4): 670–91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>.
- Lanouette, Sylvain, James A. Davey, Fred Elisma, Zhibin Ning, Daniel Figeys, Roberto A. Chica, and Jean-François Couture. 2015. 'Discovery of Substrates for a SET Domain Lysine Methyltransferase Predicted by Multistate Computational Protein Design'. *Structure* 23 (1): 206–15. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.11.004>.
- Lanouette, Sylvain, Vanessa Mongeon, Daniel Figeys, and Jean-François Couture. 2014. 'The Functional Diversity of Protein Lysine Methylation'. *Molecular Systems Biology* 10 (April): 724. <https://doi.org/10.1002/msb.134974>.
- Lee, Ji Min, Jason S. Lee, Hyunkyung Kim, Kyeongkyu Kim, Hyejin Park, Ji-Young Kim, Seung Hoon Lee, et al. 2012. 'EZH2 Generates a Methyl Degron That Is Recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 Ubiquitin Ligase Complex'. *Molecular Cell* 48 (4): 572–86. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.004>.
- Leeuwen, Fred van, Philip R. Gafken, and Daniel E. Gottschling. 2002. 'Dot1p Modulates Silencing in Yeast by Methylation of the Nucleosome Core'. *Cell* 109 (6): 745–56. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00759-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00759-6).
- Levental, Kandice R., Hongmei Yu, Laura Kass, Johnathon N. Lakins, Mikala Egeblad, Janine T. Erler, Sheri F.T. Fong, et al. 2009. 'Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling'. *Cell* 139 (5): 891–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>.
- Levy, Dan, Chih Long Liu, Ze Yang, Aaron M. Newman, Ash A. Alizadeh, Paul J. Utz, and Or Gozani. 2011. 'A Proteomic Approach for the Identification of Novel Lysine Methyltransferase Substrates'. *Epigenetics & Chromatin* 4 (1): 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-4-19>.
- Li, Chunlai, Shouyu Wang, Zhen Xing, Aifu Lin, Ke Liang, Jian Song, Qingsong Hu, et al. 2017. 'A ROR1–HER3–LncRNA Signalling Axis Modulates the Hippo–YAP Pathway to Regulate Bone Metastasis'. *Nature Cell Biology* 19 (2): 106–19. <https://doi.org/10.1038/ncb3464>.

- Li, Haitao, Wolfgang Fischle, Wooikoon Wang, Elizabeth M. Duncan, Lena Liang, Satoko Murakami-Ishibe, C. David Allis, and Dinshaw J. Patel. 2007. 'Structural Basis for Lower Lysine Methylation State-Specific Readout by MBT Repeats of L3MBTL1 and an Engineered PHD Finger'. *Molecular Cell* 28 (4): 677–91. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.023>.
- Li, Linda Xiaoyan, Lucy X. Fan, Julie Xia Zhou, Jared J. Grantham, James P. Calvet, Julien Sage, and Xiaogang Li. 2017. 'Lysine Methyltransferase SMYD2 Promotes Cyst Growth in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease'. *The Journal of Clinical Investigation* 127 (7): 2751–64. <https://doi.org/10.1172/JCI90921>.
- Li, Linda Xiaoyan, Julie Xia Zhou, James P. Calvet, Andrew K. Godwin, Roy A. Jensen, and Xiaogang Li. 2018a. 'Lysine Methyltransferase SMYD2 Promotes Triple Negative Breast Cancer Progression'. *Cell Death & Disease* 9 (3): 326. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0347-x>.
- . 2018b. 'Lysine Methyltransferase SMYD2 Promotes Triple Negative Breast Cancer Progression'. *Cell Death & Disease* 9 (3): 326. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0347-x>.
- Li, Linda Xiaoyan, Julie Xia Zhou, Xiaodong Wang, Hongbing Zhang, Peter C. Harris, James P. Calvet, and Xiaogang Li. 2020. 'Cross-Talk between CDK4/6 and SMYD2 Regulates Gene Transcription, Tubulin Methylation, and Ciliogenesis'. *Science Advances* 6 (44): eabb3154. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb3154>.
- Li, Yufa, Xiling Zhu, Yuanfeng Zeng, Jianmei Wang, Xiaojing Zhang, Yan-qing Ding, and Li Liang. 2010. 'FMNL2 Enhances Invasion of Colorectal Carcinoma by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition'. *Molecular Cancer Research: MCR* 8 (12): 1579–90. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0081>.
- Liang, Li, Xianzheng Li, Xiaojing Zhang, Zhenbing Lv, Guoyang He, Wei Zhao, Xiaoli Ren, et al. 2013. 'MicroRNA-137, an HMGA1 Target, Suppresses Colorectal Cancer Cell Invasion and Metastasis in Mice by Directly Targeting FMNL2'. *Gastroenterology* 144 (3): 624–635.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.11.033>.
- Liang, Yiran, Hanwen Zhang, Xiaojin Song, and Qifeng Yang. 2020. 'Metastatic Heterogeneity of Breast Cancer: Molecular Mechanism and Potential Therapeutic Targets'. *Seminars in Cancer Biology*, Enigmatic tumor properties associated with metastatic spread, 60 (February): 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.012>.
- Lin, Elaine Y., Joan G. Jones, Ping Li, Liyin Zhu, Kathleen D. Whitney, William J. Muller, and Jeffrey W. Pollard. 2003. 'Progression to Malignancy in the Polyoma Middle T Oncoprotein Mouse Breast Cancer Model Provides a Reliable Model for Human Diseases'. *The American Journal of Pathology* 163 (5): 2113–26.
- Lindroth, Anders M, David Shultis, Zuzana Jasencakova, Jörg Fuchs, Lianna Johnson, Daniel Schubert, Debasis Patnaik, et al. 2004. 'Dual Histone H3 Methylation Marks at Lysines 9 and 27 Required for Interaction with CHROMOMETHYLASE3'. *The EMBO Journal* 23 (21): 4127–33. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600430>.
- Liu, Feng, Dalia Barsyte-Lovejoy, Fengling Li, Yan Xiong, Victoria Korboukh, Xi-Ping Huang, Abdellah Allali-Hassani, et al. 2013. 'Discovery of an in Vivo Chemical Probe of the Lysine Methyltransferases G9a and GLP'. *Journal of Medicinal Chemistry* 56 (21): 8931–42. <https://doi.org/10.1021/jm401480r>.
- Liu, Jiameng, Shan Chen, Yang Chen, Ningbo Geng, and Chongjin Feng. 2019. 'High Expression of FMNL3 Associates with Cancer Cell Migration, Invasion, and Unfavorable Prognosis in Tongue Squamous Cell Carcinoma'. *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 48 (6): 459–67. <https://doi.org/10.1111/jop.12857>.
- Liu, Jianzhao, Yanan Yue, Dali Han, Xiao Wang, Ye Fu, Liang Zhang, Guifang Jia, et al. 2014. 'A METTL3-METTL14 Complex Mediates Mammalian Nuclear RNA N6-Adenosine Methylation'. *Nature Chemical Biology* 10 (2): 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>.

- Liu, Lanxin, Sarah Kimball, Hui Liu, Andreana Holowatyj, and Zeng-Quan Yang. 2015a. 'Genetic Alterations of Histone Lysine Methyltransferases and Their Significance in Breast Cancer'. *Oncotarget* 6 (4): 2466–82. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2967>.
- . 2015b. 'Genetic Alterations of Histone Lysine Methyltransferases and Their Significance in Breast Cancer'. *Oncotarget* 6 (4): 2466–82. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2967>.
- Liu, Shuo, Simone Hausmann, Scott Moore Carlson, Mary Esmeralda Fuentes, Joel William Francis, Renjitha Pillai, Shane Michael Lofgren, et al. 2019. 'METTL13 Methylation of EEF1A Increases Translational Output to Promote Tumorigenesis'. *Cell* 176 (3): 491–504.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.038>.
- Liu, Wen, Bogdan Tanasa, Oksana V. Tyurina, Tian Yuan Zhou, Reto Gassmann, Wei Ting Liu, Kenneth A. Ohgi, et al. 2010a. 'PHF8 Mediates Histone H4 Lysine 20 Demethylation Events Involved in Cell Cycle Progression'. *Nature* 466 (7305): 508–12. <https://doi.org/10.1038/nature09272>.
- . 2010b. 'PHF8 Mediates Histone H4 Lysine 20 Demethylation Events Involved in Cell Cycle Progression'. *Nature* 466 (7305): 508–12. <https://doi.org/10.1038/nature09272>.
- Liu, Yan-Jun, Maël Le Berre, Franziska Lautenschlaeger, Paolo Maiuri, Andrew Callan-Jones, Méline Heuzé, Tohru Takaki, Raphaël Voituriez, and Matthieu Piel. 2015. 'Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells'. *Cell* 160 (4): 659–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.007>.
- Local, Andrea, Hui Huang, Claudio P. Albuquerque, Namit Singh, Ah Young Lee, Wei Wang, Chaochen Wang, et al. 2018. 'Identification of H3K4me1-Associated Proteins at Mammalian Enhancers'. *Nature Genetics* 50 (1): 73–82. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0015-6>.
- Lu, Chao, Siddhant U. Jain, Dominik Hoelper, Denise Bechet, Rosalynn C. Molden, Leili Ran, Devan Murphy, et al. 2016. 'Histone H3K36 Mutations Promote Sarcomagenesis through Altered Histone Methylation Landscape'. *Science* 352 (6287): 844–49. <https://doi.org/10.1126/science.aac7272>.
- Lu, GuiFeng, YaLing Sun, ShengLi An, SaiNan Xin, XiaoLi Ren, Dan Zhang, PingXiang Wu, WenTing Liao, YanQing Ding, and Li Liang. 2015. 'MicroRNA-34a Targets FMNL2 and E2F5 and Suppresses the Progression of Colorectal Cancer'. *Experimental and Molecular Pathology* 99 (1): 173–79. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.06.014>.
- Lukinovic, Valentina, G. Casanova Alexandre, S. Roth Gael, Chuffart Florent, and Reynoird Nicolas. 2020. 'Lysine Methyltransferases Signaling: Histones Are Just the Tip of the Iceberg'. *Current Protein & Peptide Science* 21 (7): 655–74.
- Lukinović, Valentina, Alexandre G. Casanova, Gael S. Roth, Florent Chuffart, and Nicolas Reynoird. 2020. 'Lysine Methyltransferases Signaling: Histones Are Just the Tip of the Iceberg'. *Current Protein & Peptide Science*, January. <https://doi.org/10.2174/1871527319666200102101608>.
- Luo, Minkui. 2018. 'Chemical and Biochemical Perspectives of Protein Lysine Methylation'. *Chemical Reviews* 118 (14): 6656–6705. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00008>.
- Löönd, Fabiana, Stefanie Tiede, and Gerhard Christofori. 2021. 'Breast Cancer as an Example of Tumour Heterogeneity and Tumour Cell Plasticity during Malignant Progression'. *British Journal of Cancer*, April, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01328-7>.
- Ma, Anqi, Wenyu Yu, Fengling Li, Rachel M. Bleich, J. Martin Herold, Kyle V. Butler, Jacqueline L. Norris, et al. 2014. 'Discovery of a Selective, Substrate-Competitive Inhibitor of the Lysine Methyltransferase SETD8'. *Journal of Medicinal Chemistry* 57 (15): 6822–33. <https://doi.org/10.1021/jm500871s>.
- Mace, Peter D., Yann Wallez, Małgorzata K. Dobaczewska, Jeongeun J. Lee, Howard Robinson, Elena B. Pasquale, and Stefan J. Riedl. 2011. 'NSP-Cas Protein Structures Reveal a Promiscuous Interaction Module in Cell Signaling'. *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (12): 1381–87. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2152>.

- Makkinje, Anthony, Richard I. Near, Giuseppe Infusini, Pierre Vanden Borre, Alexander Bloom, Dongpo Cai, Catherine E. Costello, and Adam Lerner. 2009a. 'AND-34/BCAR3 Regulates Adhesion-Dependent P130Cas Serine Phosphorylation and Breast Cancer Cell Growth Pattern'. *Cellular Signalling* 21 (9): 1423–35. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.05.006>.
- . 2009b. 'AND-34/BCAR3 Regulates Adhesion-Dependent P130Cas Serine Phosphorylation and Breast Cancer Cell Growth Pattern'. *Cellular Signalling* 21 (9): 1423–35. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.05.006>.
- Makkinje, Anthony, Pierre Vanden Borre, Richard I. Near, Prayag S. Patel, and Adam Lerner. 2012. 'Breast Cancer Anti-Estrogen Resistance 3 (BCAR3) Protein Augments Binding of the c-Src SH3 Domain to Crk-Associated Substrate (P130cas)'. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (33): 27703–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.389981>.
- Makohon-Moore, Alvin P., Ming Zhang, Johannes G. Reiter, Ivana Bozic, Benjamin Allen, Deepanjan Kundu, Krishnendu Chatterjee, et al. 2017. 'Limited Heterogeneity of Known Driver Gene Mutations among the Metastases of Individual Patients with Pancreatic Cancer'. *Nature Genetics* 49 (3): 358–66. <https://doi.org/10.1038/ng.3764>.
- Mas-Y-Mas, Sarah, Marta Barbon, Catherine Teyssier, Hélène D em en e, João E. Carvalho, Louise E. Bird, Andrey Lebedev, et al. 2016. 'The Human Mixed Lineage Leukemia 5 (MLL5), a Sequentially and Structurally Divergent SET Domain-Containing Protein with No Intrinsic Catalytic Activity'. *PloS One* 11 (11): e0165139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165139>.
- Mayor, Roberto, and Sandrine Etienne-Manneville. 2016. 'The Front and Rear of Collective Cell Migration'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (2): 97–109. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.14>.
- Mazur, Pawel K., Nicolas Reynoird, Purvesh Khatri, Pascal W. T. C. Jansen, Alex W. Wilkinson, Shichong Liu, Olena Barbash, et al. 2014a. 'SMYD3 Links Lysine Methylation of MAP3K2 to Ras-Driven Cancer'. *Nature* 510 (7504): 283–87. <https://doi.org/10.1038/nature13320>.
- Mazur, Pawel K., Nicolas Reynoird, Purvesh Khatri, Pascal W.T.C. Jansen, Alex Wilkinson, Shichong Liu, Olena Barbash, et al. 2014b. 'SMYD3 Links Lysine Methylation of MAP3K2 to Ras-Driven Cancer'. *Nature* 510 (7504): 283–87. <https://doi.org/10.1038/nature13320>.
- McCabe, Michael T., Helai P. Mohammad, Olena Barbash, and Ryan G. Kruger. 2017. 'Targeting Histone Methylation in Cancer'. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)* 23 (5): 292–301. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000283>.
- McDonald, Oliver G., Xin Li, Tyler Saunders, Rakel Tryggvadottir, Samantha J. Mentch, Marc O. Warming, Anna E. Word, et al. 2017. 'Epigenomic Reprogramming during Pancreatic Cancer Progression Links Anabolic Glucose Metabolism to Distant Metastasis'. *Nature Genetics* 49 (3): 367–76. <https://doi.org/10.1038/ng.3753>.
- McGrath, John, and Patrick Trojer. 2015. 'Targeting Histone Lysine Methylation in Cancer'. *Pharmacology & Therapeutics* 150 (June): 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.002>.
- McKay, Daniel J., Stephen Klusza, Taylor J. R. Penke, Michael P. Meers, Kaitlin P. Curry, Stephen L. McDaniel, Pamela Y. Malek, et al. 2015. 'Interrogating the Function of Metazoan Histones Using Engineered Gene Clusters'. *Developmental Cell* 32 (3): 373–86. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.025>.
- Meijer, Danielle, Ton van Agthoven, Peter T. Bosma, Kees Nooter, and Lambert C. J. Dorssers. 2006. 'Functional Screen for Genes Responsible for Tamoxifen Resistance in Human Breast Cancer Cells'. *Molecular Cancer Research* 4 (6): 379–86. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0156>.
- Meng, Xiannan, Jing Liu, Huimin Wang, Peng Chen, and Danbo Wang. 2019. 'MicroRNA-126-5p Downregulates BCAR3 Expression to Promote Cell Migration and Invasion in Endometriosis'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 494: 110486. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110486>.

- Mersich, Akos T., Matthew R. Miller, Halina Chkourko, and Scott D. Blystone. 2010. 'The Formin FRL1 (FMNL1) Is an Essential Component of Macrophage Podosomes'. *Cytoskeleton* 67 (9): 573–85. <https://doi.org/10.1002/cm.20468>.
- Metzger, Eric, Melanie Wissmann, Na Yin, Judith M. Müller, Robert Schneider, Antoine H. F. M. Peters, Thomas Günther, Reinhard Buettner, and Roland Schüle. 2005. 'LSD1 Demethylates Repressive Histone Marks to Promote Androgen-Receptor-Dependent Transcription'. *Nature* 437 (7057): 436–39. <https://doi.org/10.1038/nature04020>.
- Michalak, Ewa Malgorzata, Karim Nacerddine, Alexandra Pietersen, Vincent Beuger, Inka Pawlitzky, Paulien Cornelissen-Steijger, Ellen Wientjens, et al. 2013. 'Polycomb Group Gene Ezh2 Regulates Mammary Gland Morphogenesis and Maintains the Luminal Progenitor Pool'. *STEM CELLS* 31 (9): 1910–20. <https://doi.org/10.1002/stem.1437>.
- Miller, Matthew R., Eric W. Miller, and Scott D. Blystone. 2017. 'Non-Canonical Activity of the Podosomal Formin FMNL1 γ Supports Immune Cell Migration'. *Journal of Cell Science* 130 (10): 1730–39. <https://doi.org/10.1242/jcs.195099>.
- Miller, Todd W., Justin M. Balko, Emily M. Fox, Zara Ghazoui, Anita Dunbier, Helen Anderson, Mitch Dowsett, et al. 2011. 'ER α -Dependent E2F Transcription Can Mediate Resistance to Estrogen Deprivation in Human Breast Cancer'. *Cancer Discovery* 1 (4): 338–51. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0101>.
- Min, Jinrong, Qin Feng, Zhizhong Li, Yi Zhang, and Rui-Ming Xu. 2003. 'Structure of the Catalytic Domain of Human DOT1L, a Non-SET Domain Nucleosomal Histone Methyltransferase'. *Cell* 112 (5): 711–23. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00114-4).
- Mita, Monica M., and Alain C. Mita. 2020. 'Bromodomain Inhibitors a Decade Later: A Promise Unfulfilled?' *British Journal of Cancer* 123 (12): 1713–14. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01079-x>.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1988. 'Cytoskeletal Dynamics and Nerve Growth'. *Neuron* 1 (9): 761–72. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90124-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90124-9).
- Miyamoto, Kei, Vincent Pasque, Jerome Jullien, and John B. Gurdon. 2011. 'Nuclear Actin Polymerization Is Required for Transcriptional Reprogramming of Oct4 by Oocytes'. *Genes & Development* 25 (9): 946–58. <https://doi.org/10.1101/gad.615211>.
- Moore, Kaitlyn E., Scott M. Carlson, Nathan D. Camp, Peggie Cheung, Richard G. James, Katrin F. Chua, Alejandro Wolf-Yadlin, and Or Gozani. 2013a. 'A General Molecular Affinity Strategy for Global Detection and Proteomic Analysis of Lysine Methylation'. *Molecular Cell* 50 (3): 444–56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.005>.
- Moore, Kaitlyn E., Scott M. Carlson, Nathan D. Camp, Peggie Cheung, Richard G. James, Katrin F. Chua, Alejandro Wolf-Yadlin, and Or Gozani. 2013b. 'A General Molecular Affinity Strategy for Global Detection and Proteomic Analysis of Lysine Methylation'. *Molecular Cell* 50 (3): 444–56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.005>.
- Morera, Ludovica, Michael Lübbert, and Manfred Jung. 2016. 'Targeting Histone Methyltransferases and Demethylases in Clinical Trials for Cancer Therapy'. *Clinical Epigenetics* 8: 57. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0223-4>.
- Morschhauser, Franck, Hervé Tilly, Aristeidis Chaidos, Pamela McKay, Tycel Phillips, Sarit Assouline, Connie Lee Batlevi, et al. 2020. 'Tazemetostat for Patients with Relapsed or Refractory Follicular Lymphoma: An Open-Label, Single-Arm, Multicentre, Phase 2 Trial'. *The Lancet Oncology* 21 (11): 1433–42. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30441-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30441-1).
- Munkanatta Godage, Dhanushka N. P., Garrett C. VanHecke, Kusal T. G. Samarasinghe, Han-Zhong Feng, Mark Hiske, Joshua Holcomb, Zhe Yang, Jian-Ping Jin, Charles S. Chung, and Young-Hoon Ahn. 2018. 'SMYD2 Glutathionylation Contributes to Degradation of Sarcomeric Proteins'. *Nature Communications* 9 (1): 4341. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06786-x>.
- Munro, S., N. Khaire, A. Inche, S. Carr, and N. B. La Thangue. 2010. 'Lysine Methylation Regulates the PRb Tumour Suppressor Protein'. *Oncogene* 29 (16): 2357–67. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.511>.

- Murray, K. 1964. 'THE OCCURRENCE OF EPSILON-N-METHYL LYSINE IN HISTONES'. *Biochemistry* 3 (January): 10–15. <https://doi.org/10.1021/bi00889a003>.
- Musselman, Catherine A., Marie-Eve Lalonde, Jacques Côté, and Tatiana G. Kutateladze. 2012. 'Perceiving the Epigenetic Landscape through Histone Readers'. *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (12): 1218–27. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2436>.
- Near, Richard I., Richard S. Smith, Paul A. Toselli, Thomas F. Freddo, Alexander B. Bloom, Pierre Vanden Borre, David C. Seldin, and Adam Lerner. 2009. 'Loss of AND-34/BCAR3 Expression in Mice Results in Rupture of the Adult Lens'. *Molecular Vision* 15: 685–99.
- Near, Richard I., Yujun Zhang, Anthony Makkinje, Pierre Vanden Borre, and Adam Lerner. 2007. 'AND-34/BCAR3 Differs from Other NSP Homologs in Induction of Anti-Estrogen Resistance, Cyclin D1 Promoter Activation and Altered Breast Cancer Cell Morphology'. *Journal of Cellular Physiology* 212 (3): 655–65. <https://doi.org/10.1002/jcp.21059>.
- Nguyen, Hannah, Abdellah Allali-Hassani, Stephen Antonysamy, Shawn Chang, Lisa Hong Chen, Carmen Curtis, Spencer Emtage, et al. 2015. 'LLY-507, a Cell-Active, Potent, and Selective Inhibitor of Protein-Lysine Methyltransferase SMYD2'. *The Journal of Biological Chemistry* 290 (22): 13641–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.626861>.
- Nieto, M. Angela, Ruby Yun-Ju Huang, Rebecca A. Jackson, and Jean Paul Thiery. 2016. 'EMT: 2016'. *Cell* 166 (1): 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>.
- Nik-Zainal, Serena, Helen Davies, Johan Staaf, Manasa Ramakrishna, Dominik Glodzik, Xueqing Zou, Inigo Martincorena, et al. 2016. 'Landscape of Somatic Mutations in 560 Breast Cancer Whole-Genome Sequences'. *Nature* 534 (7605): 47–54. <https://doi.org/10.1038/nature17676>.
- Nishioka, Kenichi, Sergei Chuikov, Kavitha Sarma, Hediye Erdjument-Bromage, C. David Allis, Paul Tempst, and Danny Reinberg. 2002. 'Set9, a Novel Histone H3 Methyltransferase That Facilitates Transcription by Precluding Histone Tail Modifications Required for Heterochromatin Formation'. *Genes & Development* 16 (4): 479–89. <https://doi.org/10.1101/gad.967202>.
- Nowell, P. C. 1976. 'The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations'. *Science* 194 (4260): 23–28. <https://doi.org/10.1126/science.959840>.
- Oh, Myung-Ju, Ton van Agthoven, Ji-Eun Choi, Yeon-Ji Jeong, Young-Hwa Chung, Cheol-Min Kim, and Byung H. Jhun. 2008. 'BCAR3 Regulates EGF-Induced DNA Synthesis in Normal Human Breast MCF-12A Cells'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375 (3): 430–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.040>.
- Oh, Sumin, Je Yeong Ko, Chaeun Oh, and Kyung Hyun Yoo. 2017. 'Targeting the Epigenome as a Novel Therapeutic Approach for Breast Cancer'. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1026: 287–313. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6020-5_14.
- Ohtomo-Oda, Rie, Shuhei Komatsu, Taisuke Mori, Shigeki Sekine, Shoji Hirajima, Seiichi Yoshimoto, Yae Kanai, Eigo Otsuji, Eiji Ikeda, and Hitoshi Tsuda. 2016a. 'SMYD2 Overexpression Is Associated with Tumor Cell Proliferation and a Worse Outcome in Human Papillomavirus-Unrelated Nonmultiple Head and Neck Carcinomas'. *Human Pathology* 49 (March): 145–55. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.08.025>.
- . 2016b. 'SMYD2 Overexpression Is Associated with Tumor Cell Proliferation and a Worse Outcome in Human Papillomavirus-Unrelated Nonmultiple Head and Neck Carcinomas'. *Human Pathology* 49 (March): 145–55. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.08.025>.
- Olsen, Jonathan B., Xing-Jun Cao, Bomie Han, Lisa Hong Chen, Alexander Horvath, Timothy I. Richardson, Robert M. Campbell, Benjamin A. Garcia, and Hannah Nguyen. 2016a. 'Quantitative Profiling of the Activity of Protein Lysine Methyltransferase SMYD2 Using SILAC-Based Proteomics'. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 15 (3): 892–905. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.053280>.

- . 2016b. 'Quantitative Profiling of the Activity of Protein Lysine Methyltransferase SMYD2 Using SILAC-Based Proteomics'. *Molecular & Cellular Proteomics* 15 (3): 892–905. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.053280>.
- Ottewell, Penelope D., and Michelle A. Lawson. 2021. 'Advances in Murine Models of Breast Cancer Bone Disease'. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 7 (March). <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2021.14>.
- Padmanaban, Veena, Ilona Krol, Yasir Suhail, Barbara M. Szczerba, Nicola Aceto, Joel S. Bader, and Andrew J. Ewald. 2019. 'E-Cadherin Is Required for Metastasis in Multiple Models of Breast Cancer'. *Nature* 573 (7774): 439–44. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1526-3>.
- Pagani, Olivia, Elzbieta Senkus, William Wood, Marco Colleoni, Tanja Cufer, Stella Kyriakides, Alberto Costa, Eric P. Winer, Fatima Cardoso, and ESO-MBC Task Force. 2010. 'International Guidelines for Management of Metastatic Breast Cancer: Can Metastatic Breast Cancer Be Cured?' *Journal of the National Cancer Institute* 102 (7): 456–63. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq029>.
- Paget, Stephen. 1889. 'THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST.' *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 3421, 133 (3421): 571–73. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49915-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49915-0).
- Pal, Bhupinder, Toulia Bouras, Wei Shi, François Vaillant, Julie M. Sheridan, Naiyang Fu, Kelsey Breslin, et al. 2013. 'Global Changes in the Mammary Epigenome Are Induced by Hormonal Cues and Coordinated by Ezh2'. *Cell Reports* 3 (2): 411–26. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.020>.
- Paluch, Ewa K, and Erez Raz. 2013. 'The Role and Regulation of Blebs in Cell Migration'. *Current Opinion in Cell Biology* 25 (5): 582–90. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.05.005>.
- Pandya, Pahini, Jose L. Orgaz, and Victoria Sanz-Moreno. 2017. 'Modes of Invasion during Tumour Dissemination'. *Molecular Oncology* 11 (1): 5–27. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12019>.
- Parsons, J. Thomas, Alan Rick Horwitz, and Martin A. Schwartz. 2010. 'Cell Adhesion: Integrating Cytoskeletal Dynamics and Cellular Tension'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (9): 633–43. <https://doi.org/10.1038/nrm2957>.
- Pastushenko, Ievgenia, Audrey Brisebarre, Alejandro Sifrim, Marco Fioramonti, Tatiana Revenco, Soufiane Boumahdi, Alexandra Van Keymeulen, et al. 2018. 'Identification of the Tumour Transition States Occurring during EMT'. *Nature* 556 (7702): 463–68. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0040-3>.
- Paul, Aditya, and Thomas Pollard. 2008. 'The Role of the FH1 Domain and Profilin in Formin-Mediated Actin-Filament Elongation and Nucleation'. *Current Biology* 18 (1): 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.11.062>.
- Paul, Colin D., Panagiotis Mistriotis, and Konstantinos Konstantopoulos. 2017. 'Cancer Cell Motility: Lessons from Migration in Confined Spaces'. *Nature Reviews. Cancer* 17 (2): 131–40. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.123>.
- Pawson, Tony. 2004. 'Specificity in Signal Transduction: From Phosphotyrosine-SH2 Domain Interactions to Complex Cellular Systems'. *Cell* 116 (2): 191–203. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01077-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01077-8).
- Perillo, Bruno, Alfonso Tramontano, Antonio Pezone, and Antimo Migliaccio. 2020. 'LSD1: More than Demethylation of Histone Lysine Residues'. *Experimental & Molecular Medicine* 52 (12): 1936–47. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00542-2>.
- Perou, Charles M., Therese Sørli, Michael B. Eisen, Matt van de Rijn, Stefanie S. Jeffrey, Christian A. Rees, Jonathan R. Pollack, et al. 2000. 'Molecular Portraits of Human Breast Tumours'. *Nature* 406 (6797): 747–52. <https://doi.org/10.1038/35021093>.
- Pfisterer, Simon G., Gergana Gateva, Peter Horvath, Juho Pirhonen, Veijo T. Salo, Leena Karhinen, Markku Varjosalo, Sampsa J. Ryhänen, Pekka Lappalainen, and Elina Ikonen. 2017. 'Role for Formin-like 1-Dependent Acto-Myosin Assembly in Lipid Droplet Dynamics and Lipid Storage'. *Nature Communications* 8 (1): 14858. <https://doi.org/10.1038/ncomms14858>.

- Pollard, T. D. 1986. 'Rate Constants for the Reactions of ATP- and ADP-Actin with the Ends of Actin Filaments'. *The Journal of Cell Biology* 103 (6 Pt 2): 2747–54. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.6.2747>.
- Pollard, Thomas D. 2016. 'Actin and Actin-Binding Proteins'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>.
- Polte, T. R., and S. K. Hanks. 1995. 'Interaction between Focal Adhesion Kinase and Crk-Associated Tyrosine Kinase Substrate P130Cas'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (23): 10678–82.
- Prall, Owen W. J., Boris Sarcevic, Elizabeth A. Musgrove, Colin K. W. Watts, and Robert L. Sutherland. 1997. 'Estrogen-Induced Activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S Phase Progression Is Accompanied by Increased Cyclin D1 Expression and Decreased Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Association with Cyclin E-Cdk2 *'. *Journal of Biological Chemistry* 272 (16): 10882–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10882>.
- Prat, Aleix, and Charles M. Perou. 2011. 'Deconstructing the Molecular Portraits of Breast Cancer'. *Molecular Oncology* 5 (1): 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>.
- Pring, Martin, Marie Evangelista, Charles Boone, Changsong Yang, and Sally H. Zigmond. 2003. 'Mechanism of Formin-Induced Nucleation of Actin Filaments'. *Biochemistry* 42 (2): 486–96. <https://doi.org/10.1021/bi026520j>.
- Pruyne, David. 2016. 'Revisiting the Phylogeny of the Animal Formins: Two New Subtypes, Relationships with Multiple Wing Hairs Proteins, and a Lost Human Formin'. *PLoS ONE* 11 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164067>.
- Pylayeva, Yuliya, Kelly M. Gillen, William Gerald, Hilary E. Beggs, Louis F. Reichardt, and Filippo G. Giancotti. 2009. 'Ras- and PI3K-Dependent Breast Tumorigenesis in Mice and Humans Requires Focal Adhesion Kinase Signaling'. *The Journal of Clinical Investigation* 119 (2): 252–66. <https://doi.org/10.1172/JCI37160>.
- Qin, Ye, Shauna N. Vasilatos, Lin Chen, Hao Wu, Zhishen Cao, Yumei Fu, Min Huang, et al. 2019. 'Inhibition of Histone Lysine-Specific Demethylase 1 Elicits Breast Tumor Immunity and Enhances Antitumor Efficacy of Immune Checkpoint Blockade'. *Oncogene* 38 (3): 390–405. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0451-5>.
- Quail, DF, and JA Joyce. 2013. 'Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis'. *Nature Medicine* 19 (11): 1423–37. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.
- Rankin, Erinn B., and Amato J. Giaccia. 2016. 'Hypoxic Control of Metastasis'. *Science (New York, N.Y.)* 352 (6282): 175–80. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4405>.
- Rasmussen, Tara L., Yanlin Ma, Chong Yon Park, June Harriss, Stephanie A. Pierce, Joseph D. Dekker, Nicolas Valenzuela, et al. 2015. 'Smyd1 Facilitates Heart Development by Antagonizing Oxidative and ER Stress Responses'. *PLOS ONE* 10 (3): e0121765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121765>.
- Rea, Stephen, Frank Eisenhaber, Dónal O'Carroll, Brian D. Strahl, Zu-Wen Sun, Manfred Schmid, Susanne Opravil, et al. 2000. 'Regulation of Chromatin Structure by Site-Specific Histone H3 Methyltransferases'. *Nature* 406 (6796): 593–99. <https://doi.org/10.1038/35020506>.
- Ren, X. L., G. Y. He, X. M. Li, Hui Men, L. Z. Yi, G. F. Lu, S. N. Xin, et al. 2016. 'MicroRNA-206 Functions as a Tumor Suppressor in Colorectal Cancer by Targeting FMNL2'. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 142 (3): 581–92. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-2053-8>.
- Ren, X. L., Y. D. Qiao, J. Y. Li, X. M. Li, D. Zhang, X. J. Zhang, X. H. Zhu, et al. 2018. 'Cortactin Recruits FMNL2 to Promote Actin Polymerization and Endosome Motility in Invadopodia Formation'. *Cancer Letters* 419 (April): 245–56. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.023>.
- Reynoird, Nicolas, Pawel K. Mazur, Timo Stellfeld, Natasha M. Flores, Shane M. Lofgren, Scott M. Carlson, Elisabeth Brambilla, et al. 2016a. 'Coordination of Stress Signals by the Lysine Methyltransferase SMYD2 Promotes Pancreatic Cancer'. *Genes & Development* 30 (7): 772–85. <https://doi.org/10.1101/gad.275529.115>.

- . 2016b. 'Coordination of Stress Signals by the Lysine Methyltransferase SMYD2 Promotes Pancreatic Cancer'. *Genes & Development* 30 (7): 772–85. <https://doi.org/10.1101/gad.275529.115>.
- Ridley, Anne J. 2015. 'Rho GTPase Signalling in Cell Migration'. *Current Opinion in Cell Biology*, Cell adhesion and migration, 36 (October): 103–12. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.005>.
- Riggins, Rebecca B., Lawrence A. Quilliam, and Amy H. Bouton. 2003. 'Synergistic Promotion of C-Src Activation and Cell Migration by Cas and AND-34/BCAR3'. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (30): 28264–73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303535200>.
- Riggio, Alessandra I., Katherine E. Varley, and Alana L. Welm. 2021. 'The Lingering Mysteries of Metastatic Recurrence in Breast Cancer'. *British Journal of Cancer* 124 (1): 13–26. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01161-4>.
- Romero, Stéphane, Christophe Le Clainche, Dominique Didry, Coumaran Egile, Dominique Pantaloni, and Marie-France Carlier. 2004. 'Formin Is a Processive Motor That Requires Profilin to Accelerate Actin Assembly and Associated ATP Hydrolysis'. *Cell* 119 (3): 419–29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.039>.
- Rothbart, Scott B., and Stephen B. Baylin. 2020. 'Epigenetic Therapy for Epithelioid Sarcoma'. *Cell* 181 (2): 211. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.042>.
- Rufanova, Victoriya A., Anna Alexanian, Tetsuro Wakatsuki, Adam Lerner, and Andrey Sorokin. 2009. 'Pyk2 Mediates Endothelin-1 Signaling via P130Cas/BCAR3 Cascade and Regulates Human Glomerular Mesangial Cell Adhesion and Spreading'. *Journal of Cellular Physiology* 219 (1): 45–56. <https://doi.org/10.1002/jcp.21649>.
- Ruthenburg, Alexander J., Haitao Li, Thomas A. Milne, Scott Dewell, Robert K. McGinty, Melanie Yuen, Beatrix Ueberheide, et al. 2011. 'Recognition of a Mononucleosomal Histone Modification Pattern by BPTF via Multivalent Interactions'. *Cell* 145 (5): 692–706. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.053>.
- Saddic, Louis A., Lisandra E. West, Aaron Aslanian, John R. Yates, Seth M. Rubin, Or Gozani, and Julien Sage. 2010. 'Methylation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor by SMYD2'. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (48): 37733–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.137612>.
- Sagot, Isabelle, Avital A. Rodal, James Moseley, Bruce L. Goode, and David Pellman. 2002. 'An Actin Nucleation Mechanism Mediated by Bni1 and Profilin'. *Nature Cell Biology* 4 (8): 626–31. <https://doi.org/10.1038/ncb834>.
- Saitoh, Masao. 2018. 'Involvement of Partial EMT in Cancer Progression'. *The Journal of Biochemistry* 164 (4): 257–64. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy047>.
- Sajjad, Amna, Tatyana Novoyatleva, Silvia Vergarajauregui, Christian Troidl, Ralph T. Schermuly, Haley O. Tucker, and Felix B. Engel. 2014. 'Lysine Methyltransferase Smyd2 Suppresses P53-Dependent Cardiomyocyte Apoptosis'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843 (11): 2556–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.06.019>.
- Sakai, R., A. Iwamatsu, N. Hirano, S. Ogawa, T. Tanaka, H. Mano, Y. Yazaki, and H. Hirai. 1994. 'A Novel Signaling Molecule, P130, Forms Stable Complexes in Vivo with v-Crk and v-Src in a Tyrosine Phosphorylation-Dependent Manner.' *The EMBO Journal* 13 (16): 3748–56. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06684.x>.
- Sakamoto, Luis Henrique Toshihiro, Rosangela Vieira de Andrade, Maria Sueli Soares Felipe, Andrea Barretto Motoyama, and Fabio Pittella Silva. 2014. 'SMYD2 Is Highly Expressed in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia and Constitutes a Bad Prognostic Factor'. *Leukemia Research* 38 (4): 496–502. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.01.013>.
- Sawada, Yasuhiro, Masako Tamada, Benjamin J. Dubin-Thaler, Oksana Cherniavskaya, Ryuichi Sakai, Sakae Tanaka, and Michael P. Sheetz. 2006. 'Force Sensing by Mechanical Extension of the Src Family Kinase Substrate P130Cas'. *Cell* 127 (5): 1015–26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.044>.
- Schenk, Tino, Weihsu Claire Chen, Stefanie Göllner, Louise Howell, Liqing Jin, Katja Hebestreit, Hans-Ulrich Klein, et al. 2012. 'Inhibition of the LSD1 (KDM1A)

- Demethylase Reactivates the All- Trans -Retinoic Acid Differentiation Pathway in Acute Myeloid Leukemia'. *Nature Medicine* 18 (4): 605–11. <https://doi.org/10.1038/nm.2661>.
- Schirenbeck, Antje, Till Bretschneider, Rajesh Arasada, Michael Schleicher, and Jan Faix. 2005. 'The Diaphanous-Related Formin DDia2 Is Required for the Formation and Maintenance of Filopodia'. *Nature Cell Biology* 7 (6): 619–25. <https://doi.org/10.1038/ncb1266>.
- Schönichen, André, and Matthias Geyer. 2010. 'Fifteen Formins for an Actin Filament: A Molecular View on the Regulation of Human Formins'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Includes Special Section on Formins, 1803 (2): 152–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.014>.
- Schrecengost, Randy S., Rebecca B. Riggins, Keena S. Thomas, Michael S. Guerrero, and Amy H. Bouton. 2007a. 'Breast Cancer Antiestrogen Resistance-3 Expression Regulates Breast Cancer Cell Migration through Promotion of P130Cas Membrane Localization and Membrane Ruffling'. *Cancer Research* 67 (13): 6174–82. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3455>.
- . 2007b. 'Breast Cancer Antiestrogen Resistance-3 Expression Regulates Breast Cancer Cell Migration through Promotion of P130Cas Membrane Localization and Membrane Ruffling'. *Cancer Research* 67 (13): 6174–82. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3455>.
- Schuh, Melina. 2011. 'An Actin-Dependent Mechanism for Long Range Vesicle Transport'. *Nature Cell Biology* 13 (12): 1431–36. <https://doi.org/10.1038/ncb2353>.
- Schuh, Natasha R., Michael S. Guerrero, Randy S. Schrecengost, and Amy H. Bouton. 2010. 'BCAR3 Regulates Src/P130 Cas Association, Src Kinase Activity, and Breast Cancer Adhesion Signaling'. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (4): 2309–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.046631>.
- Seltzer, Sean, Mark Corrigan, and Seamus O'Reilly. 2020. 'The Clinicomolecular Landscape of de Novo versus Relapsed Stage IV Metastatic Breast Cancer'. *Experimental and Molecular Pathology* 114 (June): 104404. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104404>.
- Seth, Abhinav, Chinatsu Otomo, and Michael K. Rosen. 2006. 'Autoinhibition Regulates Cellular Localization and Actin Assembly Activity of the Diaphanous-Related Formins FRL α and MDia1'. *Journal of Cell Biology* 174 (5): 701–13. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605006>.
- Severson, Aaron F., David L. Baillie, and Bruce Bowerman. 2002. 'A Formin Homology Protein and a Profilin Are Required for Cytokinesis and Arp2/3-Independent Assembly of Cortical Microfilaments in *C. Elegans*'. *Current Biology: CB* 12 (24): 2066–75. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01355-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01355-6).
- Sgroi, Dennis C. 2010. 'Preinvasive Breast Cancer'. *Annual Review of Pathology* 5: 193–221. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092306>.
- Shao, H.-J., Q. Li, T. Shi, G.-Z. Zhang, and F. Shao. 2019. 'LINC00707 Promotes Cell Proliferation and Invasion of Colorectal Cancer via MiR-206/FMNL2 Axis'. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 23 (9): 3749–59. https://doi.org/10.26355/eurrev_201905_17801.
- Shekhar, Shashank, Mikael Kerleau, Sonja Kühn, Julien Pernier, Guillaume Romet-Lemonne, Antoine Jégou, and Marie-France Carlier. 2015. 'Formin and Capping Protein Together Embrace the Actin Filament in a Ménage à Trois'. *Nature Communications* 6 (1): 8730. <https://doi.org/10.1038/ncomms9730>.
- Shi, L., J.-W. Huo, S.-S. Chen, J.-X. Xue, W.-Y. Gao, X.-Y. Li, Y.-H. Song, H.-T. Xu, X.-W. Zhu, and K. Chen. 2019. 'MicroRNA-22 Targets FMNL2 to Inhibit Melanoma Progression via the Regulation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway and Epithelial-Mesenchymal Transition'. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 23 (12): 5332–42. https://doi.org/10.26355/eurrev_201906_18200.

- Shi, Yujiang, Fei Lan, Caitlin Matson, Peter Mulligan, Johnathan R. Whetstone, Philip A. Cole, Robert A. Casero, and Yang Shi. 2004. 'Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1'. *Cell* 119 (7): 941–53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>.
- Sirinupong, Nualpun, Joseph Brunzelle, Ernada Doko, and Zhe Yang. 2011. 'Structural Insights into the Autoinhibition and Posttranslational Activation of Histone Methyltransferase SmyD3'. *Journal of Molecular Biology* 406 (1): 149–59. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.12.014>.
- Song, Da, Jingqin Lan, Yaqi Chen, Anyi Liu, Qi Wu, Chongchong Zhao, Yongdong Feng, et al. 2021. 'NSD2 Promotes Tumor Angiogenesis through Methylating and Activating STAT3 Protein'. *Oncogene*, March. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01747-z>.
- Song, Jianping, Yanfeng Liu, Qian Chen, Jinhuan Yang, Zhengchen Jiang, Hao Zhang, Zhaojian Liu, and Bin Jin. 2019. 'Expression Patterns and the Prognostic Value of the SMYD Family Members in Human Breast Carcinoma Using Integrative Bioinformatics Analysis'. *Oncology Letters* 17 (4): 3851–61. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10054>.
- Spellmon, Nicholas, Joshua Holcomb, Laura Trescott, Nualpun Sirinupong, and Zhe Yang. 2015. 'Structure and Function of SET and MYND Domain-Containing Proteins'. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (1): 1406–28. <https://doi.org/10.3390/ijms16011406>.
- Steenkiste, Elizabeth M, Jason D Berndt, Carissa Pilling, Christopher Simpkins, and Jonathan A Cooper. 2021a. 'A Cas-BCAR3 Co-Regulatory Circuit Controls Lamellipodia Dynamics'. Edited by Margaret C Frame. *ELife* 10 (June): e67078. <https://doi.org/10.7554/eLife.67078>.
- Steenkiste, Elizabeth M., Jason D. Berndt, Carissa Pilling, Christopher Simpkins, and Jonathan A. Cooper. 2021b. 'A Cas-BCAR3 Co-Regulatory Circuit Controls Lamellipodia Dynamics'. *ELife* 10 (June): e67078. <https://doi.org/10.7554/eLife.67078>.
- Stender, Joshua D., Gabriel Pascual, Wen Liu, Minna U. Kaikkonen, Kevin Do, Nathanael J. Spann, Michael Boutros, Norbert Perrimon, Michael G. Rosenfeld, and Christopher K. Glass. 2012. 'Control of Proinflammatory Gene Programs by Regulated Trimethylation and Demethylation of Histone H4K20'. *Molecular Cell* 48 (1): 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.020>.
- Strahl, Brian D., and C. David Allis. 2000. 'The Language of Covalent Histone Modifications'. *Nature* 403 (6765): 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>.
- Stuckey, Jacob I., Bradley M. Dickson, Nancy Cheng, Yanli Liu, Jacqueline L. Norris, Stephanie H. Cholensky, Wolfram Tempel, et al. 2016. 'A Cellular Chemical Probe Targeting the Chromodomains of Polycomb Repressive Complex 1'. *Nature Chemical Biology* 12 (3): 180–87. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007>.
- Sun, Guobin, Suzanne Y. S. Cheng, Min Chen, Chinten James Lim, and Catherine J. Pallen. 2012. 'Protein Tyrosine Phosphatase α Phosphotyrosyl-789 Binds BCAR3 to Position Cas for Activation at Integrin-Mediated Focal Adhesions'. *Molecular and Cellular Biology* 32 (18): 3776–89. <https://doi.org/10.1128/MCB.00214-12>.
- Sun, Jun-Jie, Hong-Lin Li, Hui Ma, Yang Shi, Li-Rong Yin, and Su-Jie Guo. 2019a. 'SMYD2 Promotes Cervical Cancer Growth by Stimulating Cell Proliferation'. *Cell & Bioscience* 9: 75. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0340-9>.
- . 2019b. 'SMYD2 Promotes Cervical Cancer Growth by Stimulating Cell Proliferation'. *Cell & Bioscience* 9: 75. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0340-9>.
- Svitkina, T. M., and G. G. Borisy. 1999. 'Arp2/3 Complex and Actin Depolymerizing Factor/Cofilin in Dendritic Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia'. *The Journal of Cell Biology* 145 (5): 1009–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.5.1009>.
- Swain, Sandra M., José Baselga, Sung-Bae Kim, Jungsil Ro, Vladimir Semiglazov, Mario Campone, Eva Ciruelos, et al. 2015. 'Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer'. *New England Journal of Medicine* 372 (8): 724–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1413513>.

- Sweis, Ramzi F., Zhi Wang, Mikkel Algire, Cheryl H. Arrowsmith, Peter J. Brown, Gary G. Chiang, Jun Guo, et al. 2015. 'Discovery of A-893, A New Cell-Active Benzoxazinone Inhibitor of Lysine Methyltransferase SMYD2'. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 6 (6): 695–700. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.5b00124>.
- Takeya, Ryu, Kenichiro Taniguchi, Shuh Narumiya, and Hideki Sumimoto. 2008. 'The Mammalian Formin FHOD1 Is Activated through Phosphorylation by ROCK and Mediates Thrombin-Induced Stress Fibre Formation in Endothelial Cells'. *The EMBO Journal* 27 (4): 618–28. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.7>.
- Tang, Haoran, Ang Li, Jing Bi, Douwe M. Veltman, Tobias Zech, Heather J. Spence, Xinzi Yu, et al. 2013. 'Loss of Scar/WAVE Complex Promotes N-WASP- and FAK-Dependent Invasion'. *Current Biology: CB* 23 (2): 107–17. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.059>.
- Tang, Weihong, Athanasios Saratzis, Jack Pattee, Jacqueline Smith, Nathan Pankratz, Olivia C. Leavy, Weihua Guan, et al. 2020. 'Replication of Newly Identified Genetic Associations Between Abdominal Aortic Aneurysm and SMYD2, LINC00540, PCIF1/MMP9/ZNF335, and ERG'. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 59 (1): 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2019.02.017>.
- Taverna, Sean D., Haitao Li, Alexander J. Ruthenburg, C. David Allis, and Dinshaw J. Patel. 2007. 'How Chromatin-Binding Modules Interpret Histone Modifications: Lessons from Professional Pocket Pickers'. *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (11): 1025. <https://doi.org/10.1038/nsmb1338>.
- Temimi, Abbas H. K. Al, Y. Vijayendar Reddy, Paul B. White, Hong Guo, Ping Qian, and Jasmin Mecinović. 2017. 'Lysine Possesses the Optimal Chain Length for Histone Lysine Methyltransferase Catalysis'. *Scientific Reports* 7 (1): 16148. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16128-4>.
- Teo, Jessica L., Guillermo A. Gomez, Saroja Weeratunga, Elizabeth M. Davies, Ivar Noordstra, Srikanth Budnar, Hiroko Katsuno-Kambe, et al. 2020. 'Caveolae Control Contractile Tension for Epithelia to Eliminate Tumor Cells'. *Developmental Cell* 54 (1): 75-91.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.002>.
- 'The Cancer Genome Atlas Program'. 2018. CgvMiniLanding. Nciglobal,ncicenterprise. 13 June 2018. <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>.
- Theriot, Julie A., and Timothy J. Mitchison. 1991. 'Actin Microfilament Dynamics in Locomoting Cells'. *Nature* 352 (6331): 126–31. <https://doi.org/10.1038/352126a0>.
- Thomenius, Michael J., Jennifer Totman, Darren Harvey, Lorna H. Mitchell, Thomas V. Riera, Kat Cosmopoulos, Alexandra R. Grassian, et al. 2018. 'Small Molecule Inhibitors and CRISPR/Cas9 Mutagenesis Demonstrate That SMYD2 and SMYD3 Activity Are Dispensable for Autonomous Cancer Cell Proliferation'. *PLoS One* 13 (6): e0197372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197372>.
- Thompson, Morgan E., Ernest G. Heimsath, Timothy J. Gauvin, Henry N. Higgs, and F. Jon Kull. 2013. 'Structure of the FMNL3 FH2/Actin Complex Provides Insight into Formin-Mediated Actin Nucleation and Elongation'. *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (1): 111–18. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2462>.
- Thuault, Sylvie, Claire Mamelonet, Joëlle Salameh, Kevin Ostacolo, Brice Chanez, Danièle Salaün, Emilie Baudalet, Stéphane Audebert, Luc Camoin, and Ali Badache. 2020. 'A Proximity-Labeling Proteomic Approach to Investigate Invadopodia Molecular Landscape in Breast Cancer Cells'. *Scientific Reports* 10 (April): 6787. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63926-4>.
- Tikhmyanova, Nadezhda, Joy L. Little, and Erica A. Golemis. 2010. 'Cas Proteins in Normal and Pathological Cell Growth Control'. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67 (7): 1025–48. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0213-1>.
- Tisi, Dominic, Elisabetta Chiarparin, Emiliano Tamanini, Puja Pathuri, Joseph E. Coyle, Adam Hold, Finn P. Holding, et al. 2016. 'Structure of the Epigenetic Oncogene

- MMSET and Inhibition by N-Alkyl Sinefungin Derivatives'. *ACS Chemical Biology* 11 (11): 3093–3105. <https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00308>.
- Toghill, Bradley J., Athanasios Saratzis, Peter J. Freeman, Nicolas Sylvius, UKAGS collaborators, and Matthew J. Bown. 2018. 'SMYD2 Promoter DNA Methylation Is Associated with Abdominal Aortic Aneurysm (AAA) and SMYD2 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells'. *Clinical Epigenetics* 10: 29. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0460-9>.
- Tornillo, Giusy, Paola Defilippi, and Sara Cabodi. 2014. 'Cas Proteins: Dodgy Scaffolding in Breast Cancer'. *Breast Cancer Research : BCR* 16. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0443-5>.
- Tracy, Christopher, Junco S. Warren, Marta Szulik, Li Wang, June Garcia, Aman Makaju, Kristi Russell, Mickey Miller, and Sarah Franklin. 2018. 'The Smyd Family of Methyltransferases: Role in Cardiac and Skeletal Muscle Physiology and Pathology'. *Current Opinion in Physiology* 1 (February): 140–52. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2017.10.001>.
- Tsukada, Yu-ichi, Jia Fang, Hediye Erdjument-Bromage, Maria E. Warren, Christoph H. Borchers, Paul Tempst, and Yi Zhang. 2006. 'Histone Demethylation by a Family of JmjC Domain-Containing Proteins'. *Nature* 439 (7078): 811–16. <https://doi.org/10.1038/nature04433>.
- Turajlic, Samra, and Charles Swanton. 2016. 'Metastasis as an Evolutionary Process'. *Science* 352 (6282): 169–75. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2784>.
- Tyanova, Stefka, Tikira Temu, and Juergen Cox. 2016. 'The MaxQuant Computational Platform for Mass Spectrometry-Based Shotgun Proteomics'. *Nature Protocols* 11 (12): 2301–19. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>.
- Uhlén, Mathias, Linn Fagerberg, Björn M. Hallström, Cecilia Lindskog, Per Oksvold, Adil Mardinoglu, Åsa Sivertsson, et al. 2015. 'Tissue-Based Map of the Human Proteome'. *Science* 347 (6220). <https://doi.org/10.1126/science.1260419>.
- Vaillant, Dominique C., Sarah J. Copeland, Chris Davis, Susan F. Thurston, Nezar Abdennur, and John W. Copeland. 2008. 'Interaction of the N- and C-Terminal Autoregulatory Domains of FRL2 Does Not Inhibit FRL2 Activity*'. *Journal of Biological Chemistry* 283 (48): 33750–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803156200>.
- Vanden Borre, Pierre, Richard I. Near, Anthony Makkinje, Gustavo Mostoslavsky, and Adam Lerner. 2011. 'BCAR3/AND-34 Can Signal Independent of Complex Formation with CAS Family Members or the Presence of P130Cas'. *Cellular Signalling* 23 (6): 1030–40. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.01.018>.
- Venet, David, Danaï Fimereli, Françoise Rothé, Bram Boeckx, Marion Maetens, Samira Majjaj, Ghizlane Rouas, et al. 2020. 'Phylogenetic Reconstruction of Breast Cancer Reveals Two Routes of Metastatic Dissemination Associated with Distinct Clinical Outcome'. *EBioMedicine* 56 (June). <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102793>.
- Vervoort, Virginie S., Séverine Roselli, Robert G. Oshima, and Elena B. Pasquale. 2007. 'Splice Variants and Expression Patterns of SHEP1, BCAR3 and NSP1, a Gene Family Involved in Integrin and Receptor Tyrosine Kinase Signaling'. *Gene* 391 (1–2): 161–70. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.12.016>.
- Vicente-Manzanares, Miguel, and Alan Rick Horwitz. 2011. 'Adhesion Dynamics at a Glance'. *Journal of Cell Science* 124 (23): 3923–27. <https://doi.org/10.1242/jcs.095653>.
- Voelkel, Tobias, Christian Andresen, Andreas Unger, Steffen Just, Wolfgang Rottbauer, and Wolfgang A. Linke. 2013. 'Lysine Methyltransferase Smyd2 Regulates Hsp90-Mediated Protection of the Sarcomeric Titin Springs and Cardiac Function'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (4): 812–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.09.012>.
- Wakayama, Yuki, Shigetomo Fukuhara, Koji Ando, Michiyuki Matsuda, and Naoki Mochizuki. 2015. 'Cdc42 Mediates Bmp-Induced Sprouting Angiogenesis through Fmnl3-Driven Assembly of Endothelial Filopodia in Zebrafish'. *Developmental Cell* 32 (1): 109–22. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.024>.

- Wallez, Yann, Peter D. Mace, Elena B. Pasquale, and Stefan J. Riedl. 2012a. 'NSP-CAS Protein Complexes'. *Genes & Cancer* 3 (5–6): 382–93. <https://doi.org/10.1177/1947601912460050>.
- . 2012b. 'NSP-CAS Protein Complexes: Emerging Signaling Modules in Cancer'. *Genes & Cancer* 3 (5–6): 382–93. <https://doi.org/10.1177/1947601912460050>.
- . 2012c. 'NSP-CAS Protein Complexes: Emerging Signaling Modules in Cancer'. *Genes & Cancer* 3 (5–6): 382–93. <https://doi.org/10.1177/1947601912460050>.
- Wallez, Yann, Stefan J. Riedl, and Elena B. Pasquale. 2014a. 'Association of the Breast Cancer Antiestrogen Resistance Protein 1 (BCAR1) and BCAR3 Scaffolding Proteins in Cell Signaling and Antiestrogen Resistance'. *The Journal of Biological Chemistry* 289 (15): 10431–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.541839>.
- . 2014b. 'Association of the Breast Cancer Antiestrogen Resistance Protein 1 (BCAR1) and BCAR3 Scaffolding Proteins in Cell Signaling and Antiestrogen Resistance'. *The Journal of Biological Chemistry* 289 (15): 10431–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.541839>.
- Wang, Li, Ling Li, Hailong Zhang, Xiao Luo, Jingquan Dai, Shaolian Zhou, Justin Gu, et al. 2011. 'Structure of Human SMYD2 Protein Reveals the Basis of P53 Tumor Suppressor Methylation'. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (44): 38725–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.262410>.
- Wang, P., M. Royer, and R. L. Houtz. 1995. 'Affinity Purification of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit Epsilon N-Methyltransferase'. *Protein Expression and Purification* 6 (4): 528–36. <https://doi.org/10.1006/prev.1995.1070>.
- Wang, Ru, Yayun Zhu, Xiaoxu Liu, Xiaoqin Liao, Jianjun He, and Ligang Niu. 2019. 'The Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Patients with Different Metastatic Sites in Stage IV Breast Cancer'. *BMC Cancer* 19 (1): 1091. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6311-z>.
- Wang, Rui, Mei Huang, Linting Li, Tomonori Kaneko, Courtney Voss, Liang Zhang, Jiang Xia, and Shawn S. C. Li. 2018. 'Affinity Purification of Methyllysine Proteome by Site-Specific Covalent Conjugation'. *Analytical Chemistry* 90 (23): 13876–81. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02796>.
- Wang, Wanli, Shicheng Xu, Ying Di, Zhiyong Zhang, Qingshan Li, Kun Guo, Yi Lv, and Bo Wang. 2021. 'Novel Role of LINC01013/MiR-6795-5p/FMNL3 Axis in the Regulation of Hepatocellular Carcinoma Stem Cell Features'. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 53 (6): 652–62. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmab040>.
- Wang, Xiaojia, Xiyang Shao, Jian Huang, Lei Lei, Yuan Huang, Yabing Zheng, Wenming Cao, and Zhanhong Chen. 2021. 'Exploring the Concepts and Practices of Advanced Breast Cancer Treatment: A Narrative Review'. *Annals of Translational Medicine* 9 (8): 721–721. <https://doi.org/10.21037/atm-21-1458>.
- Wang, Y. L. 1985. 'Exchange of Actin Subunits at the Leading Edge of Living Fibroblasts: Possible Role of Treadmilling'. *The Journal of Cell Biology* 101 (2): 597–602. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.2.597>.
- Wang, Yan, Hua Zhang, Yupeng Chen, Yimin Sun, Fen Yang, Wenhua Yu, Jing Liang, et al. 2009. 'LSD1 Is a Subunit of the NuRD Complex and Targets the Metastasis Programs in Breast Cancer'. *Cell* 138 (4): 660–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.050>.
- Wang, Ying, Antti Arjonen, Jeroen Pouwels, Haisen Ta, Patrick Pausch, Gert Bange, Ulrike Engel, et al. 2015. 'Formin-like 2 Promotes B1-Integrin Trafficking and Invasive Motility Downstream of PKC α '. *Developmental Cell* 34 (4): 475–83. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.015>.
- Waterhouse, Andrew, Martino Bertoni, Stefan Bienert, Gabriel Studer, Gerardo Tauriello, Rafal Gumienny, Florian T. Heer, et al. 2018. 'SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes'. *Nucleic Acids Research* 46 (W1): W296–303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.

- Weilbaecher, Katherine N., Theresa A. Guise, and Laurie K. McCauley. 2011. 'Cancer to Bone: A Fatal Attraction'. *Nature Reviews. Cancer* 11 (6): 411–25. <https://doi.org/10.1038/nrc3055>.
- Weirich, Sara, Maren Kirstin Schuhmacher, Srikanth Kudithipudi, Cristiana Lungu, Andrew D. Ferguson, and Albert Jeltsch. 2020. 'Analysis of the Substrate Specificity of the SMYD2 Protein Lysine Methyltransferase and Discovery of Novel Non-Histone Substrates'. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 21 (1–2): 256–64. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900582>.
- Wilkinson, Alex W., Jonathan Diep, Shaobo Dai, Shuo Liu, Yaw shin Ooi, Dan Song, Tie-Mei Li, et al. 2019. 'SETD3 Is an Actin Histidine Methyltransferase That Prevents Primary Dystocia'. *Nature* 565 (7739): 372–76. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0821-8>.
- Wilson, Ashley L., Randy S. Schrecengost, Michael S. Guerrero, Keena S. Thomas, and Amy H. Bouton. 2013a. 'Breast Cancer Antiestrogen Resistance 3 (BCAR3) Promotes Cell Motility by Regulating Actin Cytoskeletal and Adhesion Remodeling in Invasive Breast Cancer Cells'. *PloS One* 8 (6): e65678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065678>.
- . 2013b. 'Breast Cancer Antiestrogen Resistance 3 (BCAR3) Promotes Cell Motility by Regulating Actin Cytoskeletal and Adhesion Remodeling in Invasive Breast Cancer Cells'. *PloS One* 8 (6): e65678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065678>.
- Woodrum, D T, S A Rich, and T D Pollard. 1975. 'Evidence for Biased Bidirectional Polymerization of Actin Filaments Using Heavy Meromyosin Prepared by an Improved Method.' *Journal of Cell Biology* 67 (1): 231–37. <https://doi.org/10.1083/jcb.67.1.231>.
- Woychik, Richard P., Richard L. Maas, Rolf Zeller, Thomas F. Vogt, and Philip Leder. 1990. "'Formins": Proteins Deduced from the Alternative Transcripts of the Limb Deformity Gene'. *Nature* 346 (6287): 850–53. <https://doi.org/10.1038/346850a0>.
- Wu, Jiaquan, Tony Cheung, Christie Grande, Andrew D. Ferguson, Xiahui Zhu, Kelly Theriault, Erin Code, Cynthia Birr, Nick Keen, and Huawei Chen. 2011. 'Biochemical Characterization of Human SET and MYND Domain-Containing Protein 2 Methyltransferase'. *Biochemistry* 50 (29): 6488–97. <https://doi.org/10.1021/bi200725p>.
- Wu, Lei, Fan Kou, Zhenyu Ji, Baihui Li, Bailu Zhang, Yan Guo, and Lili Yang. 2021. 'SMYD2 Promotes Tumorigenesis and Metastasis of Lung Adenocarcinoma through RPS7'. *Cell Death & Disease* 12 (5): 439. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03720-w>.
- Wu, Pei-Hsun, Anjil Giri, Sean X. Sun, and Denis Wirtz. 2014. 'Three-Dimensional Cell Migration Does Not Follow a Random Walk'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (11): 3949–54.
- Wu, Yanxia, Zhihua Shen, Keke Wang, Yanping Ha, Hong Lei, Yanan Jia, Ranran Ding, et al. 2017. 'High FMNL3 Expression Promotes Nasopharyngeal Carcinoma Cell Metastasis: Role in TGF-B1-Induced Epithelia-to-Mesenchymal Transition'. *Scientific Reports* 7 (February): 42507. <https://doi.org/10.1038/srep42507>.
- Xing, Zhen, Aifu Lin, Chunlai Li, Ke Liang, Shouyu Wang, Yang Liu, Peter K. Park, et al. 2014. 'LncRNA Directs Cooperative Epigenetic Regulation Downstream of Chemokine Signals'. *Cell* 159 (5): 1110–25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.013>.
- Xu, Guiliang, Guilin Liu, Sidong Xiong, Haiyan Liu, Xi Chen, and Biao Zheng. 2015. 'The Histone Methyltransferase Smyd2 Is a Negative Regulator of Macrophage Activation by Suppressing Interleukin 6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) Production'. *The Journal of Biological Chemistry* 290 (9): 5414–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.610345>.
- Xu, Kexin, Zhenhua Jeremy Wu, Anna C. Groner, Housheng Hansen He, Changmeng Cai, Rosina T. Lis, Xiaoqi Wu, et al. 2012. 'EZH2 Oncogenic Activity in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Is Polycomb-Independent'. *Science* 338 (6113): 1465–69. <https://doi.org/10.1126/science.1227604>.

- Xu, Shutong, Jian Wu, Bingfa Sun, Chen Zhong, and Jianping Ding. 2011. 'Structural and Biochemical Studies of Human Lysine Methyltransferase Smyd3 Reveal the Important Functional Roles of Its Post-SET and TPR Domains and the Regulation of Its Activity by DNA Binding'. *Nucleic Acids Research* 39 (10): 4438–49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr019>.
- Xu, Wenchao, Fulian Chen, Xiao Fei, Xiaoqing Yang, and Xiaofei Lu. 2018. 'Overexpression of SET and MYND Domain-Containing Protein 2 (SMYD2) Is Associated with Tumor Progression and Poor Prognosis in Patients with Papillary Thyroid Carcinoma'. *Medical Science Monitor: International Journal of Experimental and Clinical Research* 24 (October): 7357–65. <https://doi.org/10.12659/MSM.910168>.
- Yamada, Kenneth M., and Michael Sixt. 2019. 'Mechanisms of 3D Cell Migration'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (12): 738–52. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0172-9>.
- Yan, Yan, Meng Su, and Baoli Qin. 2020. 'CircHIPK3 Promotes Colorectal Cancer Cells Proliferation and Metastasis via Modulating of MiR-1207-5p/FMNL2 Signal'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 524 (4): 839–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.055>.
- Yang, Changsong, Lubov Czech, Silke Gerboth, Shin-ichiro Kojima, Giorgio Scita, and Tatyana Svitkina. 2007. 'Novel Roles of Formin MDia2 in Lamellipodia and Filopodia Formation in Motile Cells'. *PLoS Biology* 5 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050317>.
- Yang, Jing, Parker Antin, Geert Berx, Cédric Blanpain, Thomas Brabletz, Marianne Bronner, Kyra Campbell, et al. 2020. 'Guidelines and Definitions for Research on Epithelial–Mesenchymal Transition'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (6): 341–52. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>.
- Yang, S. S., X. M. Li, M. Yang, X. L. Ren, J. L. Hu, X. H. Zhu, F. F. Wang, et al. 2017. 'FMNL2 Destabilises COMMD10 to Activate NF- κ B Pathway in Invasion and Metastasis of Colorectal Cancer'. *British Journal of Cancer* 117 (8): 1164–75. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.260>.
- Yang, Xing-Yi, Jun-Jie Liao, and Wu-Rong Xue. 2019. 'FMNL1 Down-Regulation Suppresses Bone Metastasis through Reducing TGF-B1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)'. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 117 (September): 109126. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109126>.
- Yates, Lucy R., Stian Knappskog, David Wedge, James H. R. Farmery, Santiago Gonzalez, Inigo Martincorena, Ludmil B. Alexandrov, et al. 2017. 'Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse'. *Cancer Cell* 32 (2): 169-184.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.005>.
- Yayoshi-Yamamoto, Shinri, Ichiro Taniuchi, and Takeshi Watanabe. 2000. 'FRL, a Novel Formin-Related Protein, Binds to Rac and Regulates Cell Motility and Survival of Macrophages'. *Molecular and Cellular Biology* 20 (18): 6872–81.
- Yi, Xin, Xue-Jun Jiang, and Ze-Min Fang. 2019a. 'Histone Methyltransferase SMYD2: Ubiquitous Regulator of Disease'. *Clinical Epigenetics* 11 (1): 112. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0711-4>.
- . 2019b. 'Histone Methyltransferase SMYD2: Ubiquitous Regulator of Disease'. *Clinical Epigenetics* 11 (1): 112. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0711-4>.
- Yoshida, Kunito, and Thierry Soldati. 2006. 'Dissection of Amoeboid Movement into Two Mechanically Distinct Modes'. *Journal of Cell Science* 119 (18): 3833–44. <https://doi.org/10.1242/jcs.03152>.
- Yu, Yi, and Larry A. Feig. 2002. 'Involvement of R-Ras and Ral GTPases in Estrogen-Independent Proliferation of Breast Cancer Cells'. *Oncogene* 21 (49): 7557–68. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205961>.
- Zeng, Yi, Rongfang Qiu, Yang Yang, Tianyang Gao, Yu Zheng, Wei Huang, Jie Gao, et al. 2019a. 'Regulation of EZH2 by SMYD2-Mediated Lysine Methylation Is Implicated in

- Tumorigenesis'. *Cell Reports* 29 (6): 1482-1498.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.004>.
- . 2019b. 'Regulation of EZH2 by SMYD2-Mediated Lysine Methylation Is Implicated in Tumorigenesis'. *Cell Reports* 29 (6): 1482-1498.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.004>.
- Zeng, Yuan-Feng, Yi-Sheng Xiao, Yong Liu, Xiao-Jiang Luo, Li-Dan Wen, Qian Liu, and Min Chen. 2018. 'Formin-like 3 Regulates RhoC/FAK Pathway and Actin Assembly to Promote Cell Invasion in Colorectal Carcinoma'. *World Journal of Gastroenterology* 24 (34): 3884–97. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i34.3884>.
- Zeng, Yuan-Feng, Yi-Sheng Xiao, Ming-Zhi Lu, Xiao-Jiang Luo, Guo-Zhu Hu, Ke-Yu Deng, Xiao-Mu Wu, and Hong-Bo Xin. 2015. 'Increased Expression of Formin-like 3 Contributes to Metastasis and Poor Prognosis in Colorectal Carcinoma'. *Experimental and Molecular Pathology* 98 (2): 260–67. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.03.008>.
- Zhang, Mei-Fang, Qiu-Li Li, Yu-Feng Yang, Yun Cao, and Chris Zhiyi Zhang. 2020. 'FMNL1 Exhibits Pro-Metastatic Activity via CXCR2 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma'. *Frontiers in Oncology* 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.564614>.
- Zhang, Weilong, Yuansheng Lin, Xiaoni Liu, Xue He, Ye Zhang, Wei Fu, Zuozhen Yang, et al. 2018. 'Prediction and Prognostic Significance of BCAR3 Expression in Patients with Multiple Myeloma'. *Journal of Translational Medicine* 16 (1): 363. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1728-8>.
- Zhang, Xi, Kaori Tanaka, Jiusheng Yan, Jing Li, Danni Peng, Yuanyuan Jiang, Zhe Yang, Michelle C. Barton, Hong Wen, and Xiaobing Shi. 2013. 'Regulation of Estrogen Receptor α by Histone Methyltransferase SMYD2-Mediated Protein Methylation'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (43): 17284–89. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307959110>.
- Zhao, Shuai, C. David Allis, and Gang Greg Wang. 2021. 'The Language of Chromatin Modification in Human Cancers'. *Nature Reviews Cancer*, May, 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00357-x>.
- Zheng, Weihong, Glorymar Ibáñez, Hong Wu, Gil Blum, Hong Zeng, Aiping Dong, Fengling Li, et al. 2012. 'Sinefungin Derivatives as Inhibitors and Structure Probes of Protein Lysine Methyltransferase SETD2'. *Journal of the American Chemical Society* 134 (43): 18004–14. <https://doi.org/10.1021/ja307060p>.
- Zhou, Huan-Xiang. 2012. 'Intrinsic Disorder: Signaling via Highly Specific but Short-Lived Association'. *Trends in Biochemical Sciences* 37 (2): 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.002>.
- Zhu, Jiang, Mazhar Adli, James Y. Zou, Griet Verstappen, Michael Coyne, Xiaolan Zhang, Timothy Durham, et al. 2013. 'Genome-Wide Chromatin State Transitions Associated with Developmental and Environmental Cues'. *Cell* 152 (3): 642–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.033>.
- Zhu, Xi-Ling, Li Liang, and Yan-Qing Ding. 2008. 'Overexpression of FMNL2 Is Closely Related to Metastasis of Colorectal Cancer'. *International Journal of Colorectal Disease* 23 (11): 1041–47. <https://doi.org/10.1007/s00384-008-0520-2>.
- Zhu, Xi-Ling, Yuan-Feng Zeng, Jian Guan, Yu-Fa Li, Yong-Jian Deng, Xiu-Wu Bian, Yan-Qing Ding, and Li Liang. 2011. 'FMNL2 Is a Positive Regulator of Cell Motility and Metastasis in Colorectal Carcinoma'. *The Journal of Pathology* 224 (3): 377–88. <https://doi.org/10.1002/path.2871>.
- Zuo, Shan-Ru, Xiao-Cong Zuo, Yang He, Wei-Jin Fang, Chun-Jiang Wang, Heng Zou, Pan Chen, et al. 2018. 'Positive Expression of SMYD2 Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Primary Hepatocellular Carcinoma'. *Journal of Cancer* 9 (2): 321–30. <https://doi.org/10.7150/jca.22218>.

Résumé en Français long (1700-4000 caractères)

La méthylation des lysines est une modification post-traductionnelle participant à une régulation dynamique et précise des voies de signalisation cellulaire. Initialement caractérisée au sein des histones et associée à différents mécanismes épigénétiques, la méthylation des lysines est aujourd'hui connue pour affecter l'ensemble du protéome. Au cours des vingt dernières années, les exemples démontrant le rôle essentiel de cette signalisation au cours de processus biologiques fondamentaux se sont multipliés. Par conséquent, la dérégulation des différents acteurs de cette signalisation a été causalement impliquée dans de nombreuses pathologies humaines, telles que les maladies neurodégénératives et les cancers.

Au sein de cette signalisation, nous retrouvons les acteurs pouvant influencer sur l'abondance de cette marque, c'est-à-dire les lysine-méthyltransférases, apposant le groupe méthyl sur la lysine, et les lysine-déméthylases, assurant son éviction. Le signal porté par le groupe méthyl est généralement transduit en réponse biologique par différentes classes de protéines, pouvant spécifiquement interagir avec cette modification, que l'on appelle les lecteurs.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la lysine méthyltransférase SMYD2. Cette enzyme, du fait de sa nature promiscuiste, c'est-à-dire pouvant accommoder un grand nombre de substrats, représentait un défi particulièrement intéressant. Par ailleurs, les différents rapports faisant état de sa dérégulation au cours de la tumorigénèse, en particulier mammaire, laissaient transparaître son fort potentiel thérapeutique. Le leitmotiv qui a rythmé les différentes étapes de ma thèse s'est donc orchestré autour de l'étude du rôle de SMYD2 au cours de la progression du cancer du sein.

J'ai pu observer *in vivo* que SMYD2 n'influence pas la croissance tumorale primaire, mais était en revanche un facteur essentiel durant la dissémination métastatique du cancer du sein. L'exploration des différents substrats de SMYD2 par protéomique a permis de mettre en évidence la protéine BCAR3 comme acteur principal dans cette fonction pro-métastatique. Mécanistiquement, j'ai montré que la méthylation de BCAR3 sert de point d'ancrage à une famille de remodeleurs du cytosquelette d'actine, les FMNLs. *Via* des analyses structurales, l'existence d'un nouveau domaine de lecture des lysines méthylées, situé sur le domaine régulateur des FMNLs, a été mis en évidence. Cet ancrage à BCAR3 méthylé régule la localisation des FMNLs en les concentrant au niveau du lamellipode, une structure essentielle à la migration mésenchymateuse. J'ai pu montrer par la suite que cette signalisation contribue à promouvoir les capacités invasives des cellules tumorales

mammaires et accélérer leur dissémination métastatique *in vivo*. Enfin, le potentiel thérapeutique de l'inhibition pharmacologique de SMYD2 a été démontré dans le cadre de la prévention des métastases. L'inhibition de SMYD2 dans différents modèles, notamment de xénogreffes dérivées de patientes, permettait en effet de prévenir la colonisation métastatique des cellules tumorales.

Au cours de ma thèse, j'ai donc caractérisé une signalisation par méthylation des lysines complète, un axe impliquant les protéines SMYD2-BCAR3-FMNLs, et son rôle central dans la dissémination métastatique mammaire. Le nouveau domaine de lecture de la méthylation sur les formines FMNLs fera l'objet d'analyses structurales plus poussées afin de mettre au point des molécules pouvant bloquer cette fonction, telles que des peptidomimétiques. L'utilisation de la méthylation de BCAR3 comme biomarqueur dans les cancers agressifs sera également à l'étude. Enfin, le potentiel thérapeutique et préventif de l'inhibition de SMYD2 dans la lutte contre les métastases sera poursuivi dans des analyses précliniques et translationnelles.

Résumé en Anglais long (1700-4000 caractères)

Lysine methylation is a post-translational modification participating to finely regulate cell signaling pathways. While initially restricted as a histone modification and associated to epigenetic phenomena, lysine methylation has been recently recognized as a modification broadly affecting the proteome. In the last years, there were a growing amount of evidence highlighting the essential role of this modification in many fundamental processes. Thus, the deregulation of actors regulating lysine methylation is a frequent event in human pathologies, as neurodegenerative diseases, and cancers.

Actors of lysine methylation signaling include lysine methyltransferases, the writers, that can transfer the methyl moiety on lysine residues, and lysine demethylases, the erasers, that have the capacity to remove the methyl. The biological meaning of lysine methylation generally relies on the ability of some proteins, called readers, to specifically dock to the methylated lysine and to transduce a proper response.

During my thesis, I focused my interest in the lysine methyltransferase SMYD2. Structural studies told us that SMYD2 is a promiscuous enzyme able to potentially accommodate a wide range of substrates. Moreover, several reports have suggested that SMYD2 expression is deregulated during tumorigenesis and particularly during breast cancer. Therefore the outline of my work was to decipher the role of SMYD2 during breast cancer progression.

First, I observed that SMYD2 did not affect primary tumor growth in a mouse model of breast cancer. Rather, SMYD2 was essential to efficiently drive breast cancer metastatic dissemination. I explored the lysine methylome of SMYD2 using SILAC-proteomics and I found the protein BCAR3 as a genuine substrate of SMYD2 and a decisive mediator of this pro-metastatic function. Mechanistically, I showed that BCAR3 methylation acts as a docking site of a family of actin remodellers, the formins FMNLs. Structural studies highlighted the presence of a potential new lysine methyl binding (reader) domain of lysine methylation, located on regulatory domains of FMNLs. Indeed, the anchoring to methylated BCAR3 regulated FMNLs' ability to accumulate in lamellipodia, a cellular structure essential for mesenchymal cell migration. Then, I found that this signalization promoted cell migration and invasiveness of breast cancer cells, ultimately accelerating metastatic dissemination. Finally, I demonstrated the therapeutic interest to inhibit SMYD2 with as small molecule as SMYD2 inhibition in different in vivo models, including patient-derived xenograft, efficiently prevented metastatic dissemination.

Overall, I characterized a new lysine methylation signaling – SMYD2 / BCAR3 / FMNLs axis – involved in breast cancer metastasis. The novel lysine methyl binding domain will be

analyzed more thoroughly with additional structural studies in order to design small molecules that could block it, like peptidomimetics. Moreover, we will challenge the idea that BCAR3 methylation might be used as a prognostic or predictive biomarker of cancer aggressiveness. Finally, the therapeutic potential of SMYD2 inhibition to fight metastasis will be followed-up in preclinical and translational studies.

Résumé en Français grand public (<1000 caractères)

Dans les cellules, les protéines sont constituées de chaînes d'acides aminés, eux-mêmes fréquemment modifiés par différentes réactions chimiques. Par exemple, la lysine, un de ces acides aminés, peut être modifiée par méthylation. Cette modification est effectuée par une classe d'enzyme spécifique que l'on appelle les lysine-méthyltransférases. Dans les cancers la méthylation devient anarchique, et représente donc une cible prometteuse afin de stopper la progression tumorale.

Au cours de ma thèse je me suis intéressé à l'une de ces lysine-méthyltransférases. SMYD2 de son nom. J'ai pu mettre en évidence que SMYD2 est essentielle dans la dissémination des métastases du cancer du sein. A l'intérieur des cellules cancéreuses j'ai découvert que SMYD2 permettait d'installer un programme complexe leur permettant de se déplacer de façon très efficace. Ainsi, en bloquant SMYD2 je suis parvenu à stopper la migration des cellules cancéreuses et donc leur capacité à former des métastases.

Résumé en Anglais grand public (<1000 caractères)

In cells, proteins are made as long amino acid chains, and frequently modified by various chemical reactions. For example, lysine is one of those amino acids, that can be modified by methylation. This modification is added by a specific class of enzyme called lysine methyltransferases. Methylation is frequently anarchic in cancers and represents therefore an attractive target to stop tumoral progression.

During my thesis, I was interested to the lysine methyltransferase called SMYD2. I found that SMYD2 is crucial to drive metastatic dissemination of breast tumors. Inside breast cancer cells I discovered that SMYD2 installed a complex molecular program enabling cells to move and travel in the organism very efficiently. Thus, by blocking SMYD2 I succeed to stop cancer cell migration and their capacity to form metastasis.

