

Université de Montréal

**Mécanismes de régulation post-traductionnelle de la sénescence
cellulaire et leurs impacts sur la suppression tumorale**

par

Ana Fernández Ruiz

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de docteur
en biochimie et médecine moléculaire

Juillet 2021

© Ana Fernández Ruiz, 2021

Université de Montréal

Département de biochimie et médecine moléculaire, faculté de médecine

Cette thèse intitulée

**Mécanismes de régulation post-traductionnelle de la sénescence cellulaire et leurs impacts
sur la suppression tumorale**

Présentée par

Ana Fernández Ruiz

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Alain Moreau

Président-rapporteur

Gerardo Ferbeyre

Directeur de recherche

El Bachir Affar

Membre du jury

Corinne Abbadie

Examinatrice externe

Frédéric-Antoine Malette

Représentant du doyen

Résumé

La sénescence est un processus caractérisé par un arrêt stable du cycle cellulaire. Ce mécanisme peut être induit en réponse à de nombreux stress, comme l'activation d'un oncogène, le raccourcissement des télomères ou bien le traitement avec des composés génotoxiques. Cette réponse cellulaire est considérée comme une barrière antitumorale limitant la prolifération des cellules exposées au risque de transformation. La mise en place de la sénescence dépend de profonds changements au niveau moléculaire, dont l'activation d'un programme de dégradation sélective des protéines. Cette dégradation de protéines associée à la sénescence (SAPD) peut expliquer plusieurs caractéristiques des cellules sénescents, notamment la présence de défauts dans la voie de synthèse des ribosomes (SARD). Ces derniers sont liés à un stress nucléolaire qui mène à l'accumulation de certaines protéines ribosomiques dans le noyau, où elles peuvent effectuer des fonctions indépendantes de leur rôle structurale dans les ribosomes. Parmi ces protéines ribosomiques, RPS14/uS11 peut s'accumuler dans le nucléoplasme et réguler le cycle cellulaire en inhibant CDK4. Ces mécanismes de régulation post-traductionnelle -le SAPD ainsi que les conséquences des SARD- contribuent de manière importante au phénotype sénescents. Nous avons émis l'hypothèse que la caractérisation des effecteurs dans ces voies pourrait mener à l'identification de nouvelles protéines importantes pour la sénescence et la suppression tumorale.

Dans un premier temps, nous avons évalué le rôle de la protéine ribosomique RPL22/eL22 dans le cycle cellulaire et la sénescence. Tout comme RPS14, RPL22 a été identifié dans l'analyse de l'interactome de CDK4 lors de la sénescence induite par la perte du facteur de la ribogenèse RSL1D1. Nous avons pensé que RPL22 pourrait agir de manière similaire à RPS14 et ainsi effectuer des fonctions extra-ribosomiques impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Dans le premier article présenté dans cette thèse, nous montrons que la surexpression de RPL22 dans des fibroblastes humains induit un phénotype sénescents et que RPL22 peut lier et inhiber CDK4 afin d'activer la voie de RB. Ensemble, ces données indiquent un rôle suppressif de RPL22 dans le cycle cellulaire.

En second lieu, nous nous sommes penchés sur la caractérisation des effecteurs du programme de dégradation sélective de protéines associé à la sénescence. Ce programme est mené à terme par le système ubiquitine-protéasome, un mécanisme finement régulé par différents types de protéines. Parmi celles-ci, les E3 ubiquitine ligases définissent la spécificité de ce système en

interagissant avec les substrats à dégrader. Nous avons donc pensé que certaines E3 ubiquitine ligases spécifiques pourraient être importantes pour le mécanisme de dégradation protéique associé à la sénescence. Afin d'identifier celles-ci, nous avons effectué un criblage de shARN ciblant des gènes d'E3 ubiquitine ligases dans le contexte de la sénescence induite par les oncogènes. Ceci a mené à l'identification d'ASB14 comme un acteur important de la sénescence. Dans le deuxième article de cette thèse, nous montrons que la perte d'ASB14 produit un contournement de la sénescence induite par l'oncogène *RAS* dans plusieurs modèles cellulaires. ASB14 est une protéine peu caractérisée et nous avons généré des anticorps afin d'analyser son expression. Nous montrons ensuite qu'ASB14 s'exprime fortement dans le pancréas sain, tandis que ses niveaux diminuent dans les tumeurs pancréatiques. Enfin, nous avons identifié les partenaires d'interaction d'ASB14 dans le contexte de la sénescence induite par l'oncogène *RAS*.

Globalement, les travaux présentés dans cette thèse nous ont permis d'identifier deux nouvelles protéines impliquées dans la sénescence cellulaire : la protéine ribosomique RPL22 et l'E3 ubiquitine ligase ASB14. Ces deux protéines contribuent à la régulation post-traductionnelle du phénotype sénescence. D'un côté, RPL22 peut inhiber l'activité de CDK4 afin d'activer la voie de RB et ainsi réguler le cycle cellulaire. D'une autre part, ASB14 est importante pour le maintien du phénotype sénescence et semble avoir un rôle dans la suppression tumorale du pancréas. Nos résultats suggèrent que RPL22 et ASB14 sont importants pour la sénescence et la suppression tumorale.

Mots-clés : Sénescence cellulaire, SARD, RPL22/eL22, CDK4-cycline D1, dégradation protéique, E3 ubiquitine ligases, SAPD, ASB14

Abstract

Cellular senescence is characterized by a stable cell cycle arrest. This process can be induced by a variety of cellular stresses, including oncogene activation, telomere shortening and genotoxic treatments. In fact, senescence is considered an antitumor barrier that prevents cellular transformation. Senescence is associated with widespread molecular changes, including the activation of a selective protein degradation program. This senescence-associated protein degradation (SAPD) could regulate some senescence-associated phenotypes, including the senescence-associated ribosome biogenesis defects (SARD). Senescence-associated ribosome biogenesis defects are linked to a nuclear accumulation of some ribosomal proteins such as RPS14/uS11 capable of carrying out extra-ribosomal functions. In particular, RPS14 can inhibit CDK4 and mediate senescence. Thus, we hypothesize that the proteins implicated in these pathways -SAPD and SARD- could be important for senescence and tumor suppression.

First, we evaluated the ability of the ribosomal protein L22 (RPL22/eL22) to regulate cellular senescence and cell cycle progression. RPL22, as RPS14, was identified as a binding partner for CDK4 in senescent cells induced by depleting the ribosome biogenesis factor RSL1D1. Hence, we thought that RPL22 could act in a manner similar to RPS14. In chapter two, we show that RPL22 overexpression induces a senescent phenotype in human fibroblasts. In addition, we show that RPL22 can interact with CDK4 inhibiting its activity and stimulating the RB tumor suppressor pathway. Taken together, these results indicate a suppressive role of RPL22 in cell cycle progression.

Next, we focused on the characterization of SAPD effectors. This mechanism is mediated by the ubiquitin-proteasome system which is tightly regulated by E3 ubiquitin ligases. Thus, we thought that specific E3 ubiquitin ligases could be important for SAPD and for senescence. In order to discover E3 ubiquitin ligases that contribute to senescence, we performed an unbiased screening using shRNA libraries in Ras-induced senescent cells. This led to the identification of ASB14 as an important mediator of senescence. In chapter three, we show that ASB14 depletion leads to a bypass of Ras-induced senescence. ASB14 is a poorly characterized E3 ligase, and we generated antibodies in order to analyze its expression levels. We show that ASB14 is highly expressed in the normal pancreas whereas its expression is reduced in pancreatic cancer tissues. Finally, we uncovered the interactome of ASB14 in Ras-induced senescent cells.

Overall, we have discovered two new senescence mediators: ribosomal protein L22 and E3 ubiquitin ligase ASB14. These proteins are implicated in the post-translational regulation of the senescent phenotype. RPL22 acts as a CDK4 inhibitor to activate RB pathway and regulate cell cycle arrest and ASB14 is an important mediator of senescence maintenance. Taken together, our results suggest that RPL22 and ASB14 are important for cellular senescence and tumor suppression.

Keywords: Cellular senescence, SARD, RPL22/eL22, CDK4-cyclin D1, protein degradation, E3 ubiquitin ligases, SAPD, ASB14

Table des matières

RÉSUMÉ	3
ABSTRACT	5
TABLE DES MATIÈRES	7
Liste des tableaux.....	10
Liste des figures	11
Liste des abréviations	13
REMERCIEMENTS	21
1. INTRODUCTION.....	27
1.1. INTRODUCTION AU CANCER.....	28
1.1.1. Le cycle cellulaire.....	28
1.1.2. Transformation tumorale	32
1.1.3. Mécanismes de suppression tumorale	37
1.2. LA SÉNESCENCE CELLULAIRE	38
1.2.1. Implications physiologiques de la sénescence cellulaire.....	40
1.2.2. Mécanismes moléculaires de la sénescence cellulaire.....	42
1.2.3. Caractéristiques des cellules sénescents	45
1.2.4. Régulation protéique de la sénescence cellulaire	48
1.3. LES PROTÉINES RIBOSOMIQUES ET LE CYCLE CELLULAIRE.....	52
1.3.1. Les défauts de la biogenèse des ribosomes associés à la sénescence	52
1.3.2. Protéines ribosomiques et leurs rôles dans le cycle cellulaire.....	54
1.3.3. La protéine ribosomique RPL22/eL22	55
1.4. DÉGRADATION DE PROTÉINES	58
1.4.1. Dégradation de protéines associée à la sénescence	58
1.4.2. Le système ubiquitine-protéasome	62
1.4.3. E3 ubiquitine ligases.....	67
1.4.4. Protéines ASB.....	71
1.5. PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	77
1.5.1. Identification de nouvelles protéines ribosomiques comme CKI.....	77
1.5.2. Découverte des E3 ubiquitine ligases impliquées dans la sénescence	78

2. LE RÔLE DE RPL22/EL22 DANS LA SÉNESCENCE ET LA SUPPRESSION TUMORALE	79
2.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1.....	80
2.2. ARTICLE 1	81
2.2.1. Summary.....	82
2.2.2. Introduction.....	83
2.2.3. Materials and methods.....	84
2.2.4. Results	89
2.2.5. Discussion.....	97
2.2.6. Acknowledgements.....	98
2.2.7. Supplementary data	99
2.2.8. References.....	116
3. DÉCOUVERTE DES E3 UBIQUITINE LIGASES IMPLIQUÉES DANS LA SÉNESCENCE	120
3.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 2.....	121
3.2. ARTICLE 2	122
3.2.1. Summary.....	123
3.2.2. Introduction.....	123
3.2.3. Materials and methods.....	125
3.2.4. Results	130
3.2.5. Discussion.....	143
3.2.6. Acknowledgements.....	144
3.2.7. Supplementary data	145
3.2.8. References.....	150
4. DISCUSSION	155
4.1. DISCUSSION DU CHAPITRE 2	156
4.1.1. Résumé des résultats présentés dans le chapitre 2.....	156
4.1.2. RPL22/eL22, le cycle cellulaire et la sénescence.....	157
4.1.3. Protéines ribosomiques en tant que suppresseurs de tumeur.....	162
4.2. DISCUSSION DU CHAPITRE 3	165
4.2.1. Résumé des résultats présentés dans le chapitre 3.....	165
4.2.2. ASB14 et son rôle dans la sénescence cellulaire.....	165

4.2.3. Cibles d'ASB14.....	172
4.2.4. ASB14 et son rôle dans le pancréas.....	175
4.2.5. ASB14 et la suppression tumorale.....	178
5. CONCLUSIONS.....	180
6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	183
ANNEXE	220

Liste des tableaux

Chapitre 1. Introduction

Tableau 1.1 Exemples d'oncogènes impliqués dans des tumeurs chez l'humain	33
Tableau 1.2 Exemples de gènes suppresseurs de tumeur les plus représentatifs chez l'humain ...	34
Tableau 1.3 Composantes des complexes CRL	70
Tableau 1.4 Protéines ASB et leurs rôles principaux	75

Chapitre 2. Article 1

Tableau S2.1 Sequence of shRNAs and qPCR & PCR cloning primers	104
Tableaux S2.2 Statistics source data for qPCR, growth curves, SA- β -gal and IFs.....	105
Tableau S2.3 Less stringent analysis of CDK4(K35M) interactome in RSL1D1 knockdown-induced senescence	113

Chapitre 3. Article 2

Tableau S.3.1 Sequence of qPCR primers and shRNAs	149
---	-----

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

Figure 1.1 Les étapes du cycle cellulaire et leur régulation par les CDK	31
Figure 1.2 Modèle de l'accumulation de mutations lors de la progression tumorale	35
Figure 1.3 Modèle de la progression tumorale d'un cancer solide : exemple du PDAC	36
Figure 1.4 Stimuli déclencheurs de la sénescence cellulaire	39
Figure 1.5 Régulation de la sénescence par les voies p53-p21 et p16-RB.....	43
Figure 1.6 Caractéristiques des cellules sénescents	46
Figure 1.7 La biogenèse des ribosomes chez les cellules eucaryotes	53
Figure 1.8 La voie de signalisation ERK/MAPK.....	59
Figure 1.9 Modèle de la dégradation sélective de protéines associée à la sénescence	61
Figure 1.10 Le système ubiquitine-protéasome et les types d'E3 ubiquitine ligases.....	66
Figure 1.11 La famille de protéines ASB.....	73
Figure 1.12 Structure générale des E3 ubiquitine ligases de la famille ASB.....	74

Chapitre 2. Article 1

Figure 2.1 Graphical abstract	82
Figure 2.2 RPL22/eL22 can interact with CDK4 and/or cyclin D1	90
Figure 2.3. RPL22/eL22 regulates senescence in normal human diploid fibroblasts and decreases proliferation of p53-null PC3 cells.....	92
Figure 2.4 E6 or E7 can bypass RPL22/eL22-induced senescence	94
Figure 2.5 RPL22/eL22 directly binds and inhibits CDK4-cyclin D1 complex.....	96
Figure S2.1 RPL22/eL22 senescent cells do not show strong induction of PML foci, DNA damage foci or SASP	99
Figure S2.2 RPL22/eL22 depletion decreases proliferation of p53-WT IMR90 and p53-null PC3 cells.....	100

Figure S2.3 Unprocessed blots of figure 2.2 and 2.3C	101
Figure S2.4 Unprocessed blots of figure 2.3F and 2.4	102
Figure S2.5 Unprocessed blots of figure 2.5 and supplementary figures 2.1-2.2	103

Chapitre 3. Article 2

Figure 3.1 Asb14 knockdown produces an OIS bypass in MEFs	131
Figure 3.2 ASB14 is highly expressed in pancreatic normal tissues	133
Figure 3.3 ASB14 is under-regulated in pancreatic cancer.....	135
Figure 3.4 ASB14 knockdown allows bypass of OIS in pancreatic normal cells.....	137
Figure 3.5 Identification of ASB14 interactors in Ras-induced senescence	139
Figure 3.6 Analysis of two ASB14 interactors	141
Figure S3.1 OIS bypass mediated by ASB14 knockdown requires RB pathway disruption in human fibroblasts	145
Figure S3.2 Characterization and validation of the ASB14 antibody	146
Figure S.3.3 ASB14 expression in human tissues based on transcriptomics	148

Chapitre 4. Discussion

Figure 4.1 Mécanismes de régulation du cycle cellulaire par RPL22/eL22	163
Figure 4.2 Superposition des structures de l'isoforme 1 d'ASB14 humain et d'Asb14 murin....	167
Figure 4.3 GATA4 pourrait être un régulateur de l'expression d'ASB14	168
Figure 4.4 Effet de la surexpression d'ASB14 sur la prolifération.....	170
Figure 4.5 Prédiction de la structure du 5'UTR de l'ARNm d'ASB14	176

Liste des abréviations

4-OHT	<i>4-Hydroxytamoxifen</i>
53BP1	<i>p53-Binding Protein 1</i>
5'UTR	<i>5' Untranslated Region</i>
ADM	<i>Acinar-to-Ductal Metaplasia</i>
ADN	<i>Acide déoxyribonucléique</i>
Ago2	<i>Argonaute RISC catalytic component 2</i>
AKT	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
APC/C	<i>Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome</i>
APS	<i>Adapter protein with a pleckstrin homology and SH2 domain</i>
ARF	<i>Alternate Reading Frame</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ARNm	<i>ARN messenger</i>
ARNr	<i>ARN ribosomique</i>
ARNsno	<i>Petit ARN nucléolaire</i>
ARNt	<i>ARN de transfert</i>
ASB	<i>Ankyrin Repeats and SOCS box-containing</i>
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated Serine/Threonine Kinase</i>
ATP	<i>Adénosine triphosphate</i>
ATP5B	<i>ATP synthase F1 subunit beta</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein Serine Threonine Kinase</i>
BARD1	<i>BRCA1-Associated RING Domain 1</i>
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BCLW	<i>B-Cell Lymphoma W</i>
BCR-ABL	<i>Breakpoint Cluster Region-Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene</i>
BIK	<i>Bcl2-Interacting Killer</i>
BMP4	<i>Bone Morphogenetic Protein 4</i>
BRAF	<i>B-RAF proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
BRCA1/2	<i>Breast Cancer 1/2</i>
BTB	<i>Bric-a-brac, Tramtrack, Broad-complex</i>
C/EBP	<i>CCAAT-Enhancer-Binding Protein</i>
CAND1	<i>Cullin-Associated NEDD8-Dissociated protein 1</i>
Cas9	<i>CRISPR-Associated protein 9</i>
c-Cbl	<i>Casitas B lineage Lymphoma</i>
CCDC6	<i>Coiled-Coil Domain Containing 6</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>

CENPA	<i>Centromere Protein A</i>
ChIP-Seq	<i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i>
CHK1	<i>Checkpoint Kinase 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
CIP/KIP	<i>CDK-Interacting Protein / Kinase Inhibitory Protein</i>
CIP1	<i>CDK-Interacting Protein 1</i>
CK2 α	<i>Casein Kinase 2 alpha</i>
CKB	<i>Creatine Kinase B</i>
CKI	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor</i>
CNS	<i>COP9 Signalosome</i>
COP9	<i>Constitutive Photomorphogenesis 9</i>
cPLA	<i>Phospholipase C</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding protein</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRL	<i>Cullin-RING Ligase</i>
CRL2	<i>Cullin 2-RING Ligase</i>
CRL5	<i>Cullin 5 RING Ligase</i>
CXCL1	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 1</i>
CYC1	<i>Cytochrome C1</i>
Da	<i>Dalton</i>
DAPI	<i>4'6-diamidino-2-phenylindole</i>
DARPinS	<i>Designed Ankyrin Repeat Proteins</i>
DCAF	<i>DDB1-CUL4-Associated Factor</i>
DDA3	<i>Differential Display and Activated by p53</i>
DDB1	<i>Damaged DNA-Binding protein 1/Vpr-binding protein</i>
DDR	<i>DNA Damage Response</i>
DDX21	<i>DEAD-Box helicase 21</i>
DLBCL	<i>Diffuse Large B-Cell Lymphoma</i>
DLL1	<i>Delta Like canonical Notch Ligand 1</i>
DMSO	<i>Diméthylsulfoxyde</i>
DNA-SCARS	<i>DNA-Segments with Chromating Alterations Reinforcing Senescence</i>
DUSP	<i>Dual-Specificity Phosphatase</i>
E1A	<i>Adenovirus Early region 1A</i>
E2A	<i>E2A Immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47</i>
E2F	<i>E2F transcription Factor</i>
E2F1	<i>E2F transcription Factor 1</i>
E6AP	<i>E6-Associated Protein</i>
EBP2	<i>EBNA1-Binding Protein 2</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
eIF2A	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A</i>
eIF4B	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4B</i>

eIF4E	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i>
eL22	<i>Large subunit ribosomal protein eL22</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
ERAD	<i>Endoplasmid Reticulum-Associated Protein Degradation</i>
ERBB	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERBB2	<i>Erb-B2 Receptor tyrosine kinase 2</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal- Regulated protein Kinases 1 and 2</i>
ETS	<i>Erythroblast Transformation Specific</i>
FANCD2	<i>Fanconi Anemia Complementation Group D2</i>
FBXW8	<i>F-Box and WD repeat Domain containing 8</i>
FEM1B	<i>Fem-1 Homolog B</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FLNA	<i>Filamin A</i>
FLNB	<i>Filamin B</i>
FNIP1	<i>Folliculin-Interacting Protein 1</i>
FOS	<i>Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>
FOXO	<i>Forkhead box protein O</i>
GADD45A	<i>Growth Arrest and DNA Damage Inducible 45 Alpha</i>
GAP	<i>GTPase-Activating Protein</i>
GATA4	<i>GATA Binding Protein 4</i>
GDP	<i>Guanosine-5'-Diphosphate</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
GPS1	<i>COP9 Signalosome Subunit 1</i>
GTP	<i>Guanosine-5'-Triphosphate</i>
HDM2	<i>Human Double Minute 2</i>
HECT	<i>Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus</i>
HERC	<i>HECT and RCC1-like domain-containing</i>
HIF	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
HP1	<i>Heterochromatin Protein 1</i>
HPA	<i>Human Protein Atlas</i>
HPNE	<i>Human Pancreatic Normal Epithelial cells</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HSP70	<i>70 kDa Heat Shock Protein</i>
IBR	<i>In-Between-RING</i>
ID2	<i>Inhibitor of DNA binding 2</i>
IL1 α	<i>Interleukin 1 alpha</i>
IL-8	<i>Interleukin 8</i>
INK4	<i>Inhibitors of CDK4</i>
IP-MS	<i>Immunoprecipitation-Mass Spectrometry</i>
IRBC	<i>Impaired Ribosome Biogenesis Checkpoint</i>

IRE1	<i>Inositol-Requiring Enzyme 1</i>
I κ B α	<i>NFκB Inhibitor alpha</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
JAK3	<i>Janus Kinase 3</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
JUN	<i>JUN Proto-Oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>
kDa	<i>kilodalton</i>
Lin28B	<i>Lin-28 Homolog B</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCL1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>
MCM2	<i>Minichromosome Maintenance Complex Component 2</i>
MCM6	<i>Minichromosome Maintenance Complex Component 6</i>
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
MEK1/2	<i>MAPK/ERK Kinases 1 and 2</i>
MiDAS	<i>Mitochondrial Dysfunction-Associated Senescence</i>
MLL	<i>Mixed-Lineage Leukemia</i>
MNK	<i>MAP kinase-interacting Kinase</i>
MSCV	<i>Murine Stem Cell Virus</i>
MSK	<i>Mitogen and Stress-activated protein Kinase</i>
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1</i>
MYC	<i>MYC Proto-Oncogene, BHLH transcription factor</i>
MYCBP	<i>MYC Binding-Protein</i>
NAD	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NAE1	<i>NEDD8-Activating Enzyme</i>
NEDD4	<i>Neuronal precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated 4</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Sequence</i>
NOC2L	<i>NOC2 -Like nucleolar associated transcriptional repressor</i>
NOL6	<i>Nucleolar protein 6</i>
NPM	<i>Nucleophosmin</i>
OIS	<i>Oncogene-Induced Senescence</i>
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PanIN	<i>Pancreatic Intraepithelial Neoplasia</i>
PCGF1	<i>Polycomb Group RING Finger 1</i>
PCNA	<i>Proliferative Cell Nuclear Antigen</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>

PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PHB	<i>Prohibitin</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PML	<i>Promyelocytic Leukemia protein</i>
POT1	<i>Protection of Telomeres 1</i>
POTEE	<i>Prostate, Ovary, Testes and Embryo ankyrin domain family member E</i>
PRC1/2	<i>Polycomb Repressive Complexes 1 and 2</i>
Pré-ARNr	<i>ARN préribosomique</i>
PROTACs	<i>Proteolysis Targeting Chimeras</i>
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RAL	<i>Ras-Related protein</i>
RAR	<i>RAS-like GTPase, SOCS-box containing protein</i>
RB	<i>Retinoblastoma protein</i>
RBR	<i>RING-IBR-RING</i>
RBX1/2	<i>RING Box 1/2</i>
RC3H1	<i>RING Finger and CCCH-type domains 1</i>
RCC1	<i>Regulator of Chromosome Condensation 1</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RNF13	<i>RING Finger protein 13</i>
RNF4	<i>RING Finger protein 4</i>
RNP	<i>Ribonucleoprotein Particle</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPIC	<i>Ribosomal Protein Inhibiting CDKs</i>
RPL	<i>Ribosomal Protein Large subunit</i>
RPL11/uL5	<i>Ribosomal Protein L11/Large ribosomal subunit protein uL5</i>
RPL15/eL15	<i>Ribosomal Protein L15/Large ribosomal subunit protein eL15</i>
RPL22/eL22	<i>Ribosomal Protein L22/Large ribosomal subunit protein eL22</i>
RPL22L1	<i>RPL22-like 1</i>
RPL23/uL14	<i>Ribosomal Protein L23/Large ribosomal subunit protein uL14</i>
RPL24/eL24	<i>Ribosomal Protein L24/Large ribosomal subunit protein eL24</i>
RPL29/eL29	<i>Ribosomal Protein L29/Large ribosomal subunit protein eL29</i>
RPL5/uL18	<i>Ribosomal Protein L5/Large ribosomal subunit protein uL18</i>
RPL7/uL30	<i>Ribosomal Protein L7/Large ribosomal subunit protein uL30</i>
RPN1	<i>Ribophorin 1</i>
RPS	<i>Ribosomal Protein Small subunit</i>
RPS14/uS11	<i>Ribosomal Protein S14/Small ribosomal subunit protein uS11</i>
RPS3A/eS1	<i>Ribosomal Protein S3A/Small ribosomal subunit protein eS1</i>
RPS4X/eS4	<i>Ribosomal Protein S4X/Small ribosomal subunit protein eS4</i>

RPS6/eS6	<i>Ribosomal Protein S6/Small ribosomal subunit protein eS6</i>
RSK	<i>Ribosomal S6 Kinase</i>
RSL1D1	<i>Ribosomal L1 Domain-containing protein 1</i>
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
S6K1	<i>Ribosomal Protein S6 Kinase 1</i>
SAHF	<i>Senescence-Associated Heterochromatin Foci</i>
SAPD	<i>Senescence-Associated Protein Degradation</i>
SARD	<i>Senescence-Associated Ribosome biogenesis Defects</i>
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
SA- β -Gal	<i>Senescence-Associated beta-Galactosidase</i>
SCF	<i>Skp1-CUL1-F-box</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SH2	<i>Src Homology 2</i>
shARN	<i>Petit ARN en épingle à cheveux</i>
SKP1/2	<i>S-phase Kinase-associated Protein 1/2</i>
SLC25A1	<i>Solute Carrier Family 25 member 1</i>
SMAD1	<i>SMAD Family Member 1</i>
SMU1	<i>DNA replication regulator and spliceosomal factor</i>
SNAI2	<i>Snail Family Transcriptional Repressor 2</i>
snoRNP	<i>Small nucleolar ribonucleoparticles</i>
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SPIN1	<i>Spindlin 1</i>
SPSB	<i>SPRY domain- and SOCS box-containing domain</i>
SPRY	<i>spl and ryanodine</i>
SRC	<i>SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
SUV39H1	<i>Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1</i>
T-ALL	<i>T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
TASCC	<i>TOR-Autophagy Spacial Coupling Compartment</i>
TBK1/IKKi	<i>TANK-Binding Kinase 1/inhibitor of NFκB Kinase subunit ϵ complex</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIS	<i>Therapy-Induced Senescence</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TOP2	<i>DNA Topoisomerase 2 alpha</i>
TRF2	<i>Telomeric Repeat-binding Factor 2</i>
TXN	<i>Thioredoxin</i>
UBE2O	<i>Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 O</i>
UBF	<i>Upstream Binding transcription Factor</i>
UIM	<i>Ubiquitin-Interacting Motif</i>

uMtCK	<i>Ubiquitous Mitochondrial Creatine Kinase</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
uL18	<i>Large ribosome subunit protein uL18</i>
uL5	<i>Large ribosome subunit protein uL5</i>
uS11	<i>Small ribosome subunit protein uS11</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
WSB	<i>WD-40 containing SOCS box protein</i>
γ H2Ax	<i>Gamma-H2A histone family member X</i>

A mi abuela

*“Scientific research is one of the most exciting and rewarding of occupations.
It is like a voyage of discovery into unknown lands, seeking not for new territory
but for new knowledge. It should appeal to those with a good sense of adventure”
Frederick Sanger*

Remerciements

Pendant mes années de doctorat, j'ai eu la chance d'avoir un entourage qui m'a poussé à arriver jusqu'au bout de cette aventure. J'aimerais consacrer les prochaines lignes à souligner l'apport de ces personnes.

À Gerardo Ferbeyre, mon directeur de thèse

Merci de m'avoir donné l'opportunité d'être dans votre équipe. Vous m'avez donné une chance sans me connaître et grâce à vous je suis devenue la chercheuse que je suis aujourd'hui. Vous avez toujours été compréhensif et bienveillant envers moi et je vous en suis reconnaissante. Merci de votre support et d'avoir cru en moi depuis le premier jour. Cela a été un honneur pour moi de faire partie de votre laboratoire.

À mon jury de thèse,

J'aimerais remercier mon jury de thèse : les docteurs Alain Moreau, El Bachir Affar, Corinne Abbadie et Frédérick-Antoine Mallette. Merci d'avoir accepté d'évaluer mon ouvrage. Les formalités afin de déposer une thèse sont stressantes et je suis reconnaissante de vos réponses rapides et enthousiastes.

À mon comité de thèse,

J'aimerais également remercier mon comité de thèse, composé par les docteurs Luc Desgroseillers et André Tremblay. Merci de votre bonne humeur et de vos commentaires sur mon projet durant ces années.

À la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales (FESP),

Les travaux présentés dans cet ouvrage n'auraient pas été possibles sans le support de la FESP, qui m'a donné du financement afin de poursuivre et de terminer mes études. Merci de toutes les opportunités que vous donnez aux étudiants étrangers.

À l'Institut du Cancer de Montréal,

L'Institut du Cancer de Montréal m'a donné l'opportunité d'assister à mon premier congrès international. Je vous remercie pour cette chance unique qui restera pour toujours dans mes souvenirs. Merci également pour le support que vous offrez aux étudiants au doctorat.

A la Universidad de Málaga,

Le guardo muchísimo cariño a los años en los que fui estudiante de la Universidad de Málaga. Gracias por darme la oportunidad de realizar mi último año de estudios en el extranjero. Ha sido una experiencia que me ha cambiado la vida y sin la cual no estaría aquí, terminando mi doctorado.

Aux plateformes,

Toutes les immunohistochimies ainsi que l'optimisation du marquage ASB14 ont été possibles grâce à Véronique Barrès, Liliane Meunier et Feryel Azzi de la plateforme de pathologie moléculaire du CR-CHUM. Merci de votre intérêt pour mon projet et de vos contributions afin de découvrir le rôle de cette protéine. J'aimerais également remercier Éric Bonneil de la plateforme de protéomique de l'IRIC pour son support avec l'expérience d'IP-MS.

Au laboratoire Ferbeyre,

Depuis mon arrivée dans le laboratoire il y a sept ans, celui-ci est devenu comme une deuxième famille. Nous avons vécu plein de moments ensemble et nous avons été les uns pour les autres dans les bons et dans les mauvais moments. Une forte partie de ce doctorat vient de votre support scientifique et émotionnel! Les lignes qui suivent sont pour vous.

Marie-Camille, nous avons commencé au laboratoire quasiment en même temps et nous avons évolué ensemble. Tu es une scientifique et une enseignante exceptionnelle et la personne dont je fais le plus confiance au laboratoire. Merci pour tes conseils et ta compagnie pendant ces années. Je suis sûre que tu seras une professeure extraordinaire et que nous resterons en contact.

Stéphane, ça va beaucoup me manquer de travailler avec toi! Merci de tes conseils, de ta bonne humeur et de toujours être disponible pour aider les autres. Tu es un exemple de rigueur scientifique et de persévérance. Ton travail dur te fera réussir!

Paloma, ça a été un véritable plaisir de travailler avec toi. Merci de ta gentillesse et de ta compagnie. Je t'ai vu évoluer depuis que tu es arrivée dans le laboratoire et je suis sûre qu'un brillant avenir t'attend. Le laboratoire est chanceux de t'avoir.

Lian, le laboratoire n'est plus le même depuis que tu es partie, tu l'illuminais! J'ai adoré travailler avec toi. Je te remercie également de tes commentaires et de ton temps!

Jordan, on se connaît depuis moins de temps, mais j'ai énormément de choses à te remercier! Merci de m'aider à découvrir les secrets d'ASB14 et ses amis, de tes commentaires et de ton support. Cette dernière année a été beaucoup plus facile grâce à toi. Tu es un excellent scientifique et je suis certaine que tu finiras ton post-doc avec succès.

Véronique, j'ai des très bons souvenirs de quand nous avons travaillé ensemble. Depuis le début, tu as toujours été là pour m'aider avec un sourire. Merci de ta bonne humeur et ton support. En définitive, merci d'être le pilier du laboratoire!

Sebastian, merci de tes conseils durant ces années. Ton travail a fini par te donner une excellente publication que tu mérites. Je te souhaite beaucoup d'autres dans l'avenir!

Camille, merci de ta bonne humeur et de ta gentillesse. Nous avons passé des très bons moments ensemble et je suis sûre que tu vas exceller dans ta maîtrise.

Fred, mon partenaire de paillasse à l'UdeM. J'ai tellement appris de choses auprès de toi durant ces années. Je te remercie pour ta patience, ta bonne humeur et ta manière de voir la vie. Tu m'as inspiré à être une meilleure scientifique.

Mariana, mi amiga querida. Gracias por nuestras sesiones de fondue, que han sido terapéuticas durante mi doctorado. Te admiro muchísimo y tienes aquí una amiga para toda la vida.

Neylen, me ha encantado estar en el laboratorio juntas. Gracias por tu manera de ver la vida y por todas las risas que hemos tenido. Tienes una personalidad brillante y estoy segura de que nos cruzaremos en el viejo continente.

Emma, tu as été quelqu'un d'inspirant dans le laboratoire et ça s'est vraiment senti quand tu es parti! Merci pour tes conseils et pour ta bonne humeur dans le laboratoire.

À la docteure Léa Brakier-Gingras. Depuis que je suis arrivée au laboratoire vous avez toujours eu un sourire et des mots gentils pour moi. Je n'aurais jamais pensé que vous ne seriez pas ici pour la fin de mon doctorat. Vous nous manquez.

Au Département de Biochimie et Médecine Moléculaire,

J'aimerais remercier le personnel du département de Biochimie et Médecine Moléculaire. Merci spécialement à Robert pour toute la vaisselle que tu as lavée pour nous. Merci pour ta bonne humeur et pour tes commentaires positifs qui illuminent nos journées. Tu es essentiel pour le département. Je remercie également Sylvie Beauchemin, sans laquelle j'aurais eu plein de problèmes administratifs qui m'auraient empêché d'arriver jusqu'au doctorat. Merci aux employés de la réception de marchandises pour toujours avoir un sourire en arrivant aux laboratoires. Il s'agit d'un petit geste, mais qui peut améliorer toute une journée. Je remercie également les laboratoires du département, car ils ont toujours été enthousiastes de nous aider. Merci à Philippe Lampron d'avoir organisé les retraites du département ainsi que d'autres événements. Enfin, je remercie le docteur Stéphane Roy de nous avoir permis d'utiliser ses installations de culture cellulaire.

Au Service aux Étudiants,

J'aimerais également remercier le service aux étudiants de l'Université de Montréal et ses ateliers. Quand le doctorat devient fastidieux, c'est un soulagement de pouvoir faire d'autres activités et de se libérer un peu l'esprit. En plus de tout ce que j'ai appris sur la recherche et la biochimie, j'ai eu la chance d'apprendre à parler d'autres langues, à jouer le piano et à améliorer mes dessins. Merci de donner ces opportunités aux étudiants!

A mis profesores,

Un estudiante no llega hasta el doctorado sin haber tenido unos profesores extraordinarios. Me gustaría agradecer a mis profesores de instituto Marilina García, Pedro Ramírez y Marisa Amieva, por haberme acompañado a dar esos primeros pasos en biología y en química. Recuerdo vuestras clases con mucho cariño, y no habría llegado hasta aquí de no haber sido por ese primer contacto con la ciencia. Más tarde, durante mi carrera en Bioquímica, tuve la suerte de tener unos profesores excepcionales, que me contagiaron su pasión por la ciencia y la investigación y que contribuyeron a que aquellos fueran los mejores años de mi vida. Quisiera agradecer especialmente a la doctora Ana María Rodríguez Quesada por sus enseñanzas, por la oportunidad de estar en su laboratorio y por todo su apoyo durante mi estancia en Montreal.

À mes chers amis / A mis queridos amigos,

Pendant ces années, les moments passés en compagnie de mes amis m'ont aidé à tenir le coup et à arriver jusqu'à la fin de ce doctorat. J'aimerais remercier chaleureusement Thibaut, Alexie, Garance et Nicolas. Merci pour tous les chalets, tous les pique-niques, tous les rires... Je suis sûre que nous allons rester en contact et que nous avons encore plein de choses à vivre ensemble.

Una vez me dijeron que los amigos de la universidad son para toda la vida, y efectivamente, cada vez que nos vemos es como si el tiempo no hubiera pasado. Le dedico estas líneas a Carmen, Ama, Rocío, Fran, Claudia, Blanca, Abel y Ale. Gracias por vuestro apoyo y vuestra amistad. No tengo ninguna duda de que nos quedan muchas risas y muchos momentos juntos. Sobre todo, gracias a Carmen por haber estado ahí para mí en todo momento, verte graduarte ha sido una inspiración.

A mi familia,

Sin ninguna duda, este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mis padres, Almudena y José Manuel. Habéis sido mis dos pilares desde el principio. Desde siempre me habéis inculcado las ganas de aprender, la curiosidad y el deseo de siempre llegar más lejos. Es imposible para mí agradecer todo lo que os debo en unas líneas, pero aquí va un intento: Gracias por la ética de trabajo que me habéis dado, sin la cual no habría podido llegar hasta aquí. Gracias por enseñarme que la determinación y el esfuerzo son las mejores herramientas para obtener lo que uno quiere, y, sobre todo, gracias por enseñarme a dar lo mejor de mí misma a cada momento, sin importar el resultado.

Abuela, los mejores recuerdos que tengo de estos últimos años han sido en tu casa, al reunirnos toda la familia para celebrar las navidades. Me encanta cada momento que pasamos juntas. Eres un ejemplo de fortaleza y de determinación, y por eso esta tesis te la dedico a ti.

Susana, Bea y José, gracias por todo el apoyo que me habéis dado, por todas las risas cada vez que nos vemos. Siempre habéis estado ahí para mí, y espero que sepáis que yo también lo estoy para vosotros. No podría tener una familia mejor.

Héctor, aún me acuerdo de la primera vez que te vi y que te agarré en mis brazos. ¡Ya han pasado algunos años! Gracias por tu curiosidad y tu buen humor, que a veces me han recordado

por qué decidí hacer un doctorado. Después de haber escrito este tocho te puedo decir que, aunque algunas cosas parezcan imposibles, con trabajo duro puedes conseguir lo que te propongas. Tienes un futuro brillante por delante y tu “Primana” estará siempre ahí para ti.

À Dimitri,

Il est difficile pour moi de résumer en quelques lignes tout ce que tu m’as apporté pendant ces années. Tout simplement, c’est grâce à ton support inconditionnel que je suis arrivée jusqu’à ici. Merci de ta patience, de ta compréhension et d’avoir cru en moi. Nous avons vécu plein de moments et de rires ensemble. J’ai hâte de découvrir avec toi ceux qui nous attendent par la suite.

1. Introduction

1.1. Introduction au cancer

Dans le corps d'un adulte, les 200 différents types cellulaires qui le composent sont organisés pour se diviser quand la situation le nécessite. Par exemple, pour remplacer des cellules perdues lors d'une blessure ou pour compenser pour celles qui meurent quotidiennement. Ces cycles de division et de mort cellulaire se produisent régulièrement tout au long de la vie d'un être humain. Or, la quantité globale des cellules dans nos corps demeure relativement constante. Ceci est dû aux mécanismes de contrôle de la division cellulaire qui régulent le processus de renouvellement des cellules. Ces mécanismes sont extrêmement importants et permettent le maintien de l'homéostasie dans l'intégralité du corps humain¹.

Cependant, il peut arriver que certaines cellules subissent des altérations sur ces mécanismes de contrôle et se divisent ainsi de manière incontrôlée, produisant des masses cellulaires dans le corps, appelées tumeurs. De plus, la dérégulation de ces mécanismes peut éventuellement mener à la propagation des cellules tumorales dans d'autres tissus, ce qui conduit à la formation de métastases. D'ailleurs, c'est l'acquisition de cette capacité de propagation qui nous permet de classer les tumeurs en deux classes : les tumeurs bénignes, qui demeurent dans leur emplacement d'origine et grandissent très lentement ou pas du tout, et les tumeurs malignes, qui sont à l'origine du cancer. Ces dernières sont constituées par des cellules cancéreuses, qui prolifèrent de manière anarchique et qui ont la capacité de s'étendre aux autres parties du corps en favorisant la formation de métastases^{1,2}.

Le terme cancer englobe plus d'une centaine de maladies qui se différencient selon le tissu d'origine. Au Canada, plus d'un quart des décès par année sont attribués au cancer. En outre, les estimations actuelles prévoient qu'une personne sur deux sera atteinte du cancer au cours de sa vie³. Ces données préoccupantes ont généré un fort intérêt pour la recherche de nouveaux médicaments anticancéreux ainsi que des moyens pour sa prévention. Pour ceci, il est essentiel de comprendre les mécanismes de régulation de la division cellulaire ainsi que les mécanismes de transition d'une cellule saine vers une cellule cancéreuse.

1.1.1. Le cycle cellulaire

Le processus de division d'une cellule requiert la réplication de son matériel génétique puis la répartition de ses composantes entre les deux cellules résultantes. Ce processus est très complexe

et nécessite la coordination d'une centaine de protéines différentes. Pour assurer son bon déroulement, les cellules subissent une série d'étapes préalables à la division cellulaire, organisées selon le cycle cellulaire et connues sous le nom d'interphase¹.

Le cycle cellulaire d'une cellule eucaryote comprend quatre phases. La division cellulaire constitue l'une de ces phases et est nommée phase M. L'interphase est constituée des trois phases restantes : la phase G₁, la phase S et la phase G₂. Lors d'un cycle cellulaire, les quatre phases se succèdent dans un ordre inchangeable : G₁, S, G₂ et M. La réplication du matériel génétique a lieu pendant la phase S. Au cours de la phase G₁, la cellule effectue sa croissance et se prépare pour la réplication de son ADN, tandis que les événements de la phase G₂ préparent la cellule pour la division cellulaire¹.

Les événements de chaque étape du cycle cellulaire sont finement régulés par une famille de kinases : les kinases dépendantes de cyclines, ou CDK (*Cyclin-Dependent Kinases*). Ces protéines forment des complexes avec des cyclines spécifiques qui sont essentielles à la mise en place des événements de chaque étape du cycle de manière ordonnée. Les cyclines, dont l'expression varie durant le cycle cellulaire, déterminent les substrats de phosphorylation des CDK. Les variations dans l'expression des cyclines constituent un moyen de régulation du cycle cellulaire, car elles permettent la formation des différents complexes CDK-cycline selon l'étape du cycle cellulaire à franchir^{1, 4}. Tout d'abord, les signaux extracellulaires pro-prolifératifs induisent l'expression des cyclines de type D (D1, D2 et D3), qui peuvent s'assembler avec CDK4 et CDK6 lors de la phase G₁. Les complexes CDK4/CDK6-cycline D phosphorylent les protéines RB (*Retinoblastoma protein*), p107 et p130, leurs seuls substrats connus. Puis, dans leur état phosphorylé, ces protéines se dissocient des facteurs de transcription E2F (*E2F Transcription Factor*), ce qui favorise leur activité et promeut la transcription de gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire^{5, 6}. Ensuite, les cyclines de type E (E1 et E2) sont induites au début de la phase S et forment les complexes CDK2-cycline E, qui favorisent la transition de la phase G₁ à la phase S en phosphorylant des résidus additionnels sur RB ainsi que d'autres protéines associées à la prolifération cellulaire, comme NPM (*Nucleophosmin*) et p220⁷. Les cyclines de type A (A1 et A2) sont induites dans la phase S afin de favoriser la réplication de l'ADN ainsi que la transition vers la phase G₂. Ces cyclines s'associent à CDK2 pendant la phase S et à CDK1 pendant la phase G₂^{8, 9}. Enfin, l'expression des cyclines de type B (B1 et B2) est induite au début de la phase M. Ces

cyclines s'associent à CDK1 afin de promouvoir la phosphorylation de plusieurs protéines impliquées dans la condensation de la chromatine, la formation du fuseau mitotique et la disruption de l'enveloppe nucléaire¹⁰.

Tandis que les cyclines promeuvent l'activité des CDK, il existe également des protéines capables de réguler négativement ces kinases. Ces dernières sont connues comme des inhibiteurs de CDK ou CKI (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*). Les CKI se classifient traditionnellement en deux catégories : les CKI de type CIP/KIP (*CDK-Interacting, Protein / Kinase Inhibitory Protein*) et celles de type INK4 (*Inhibitors of CDK4*). D'une part, les protéines CIP/KIP agissent en tant que régulateurs négatifs de plusieurs complexes CDK-cycline différents. Cette famille est composée de trois protéines : p21^{CIP1}, p27^{KIP1} et p57^{KIP2}. Notamment, p21^{CIP1} est une cible transcriptionnelle de p53 qui joue un rôle clé dans l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN et d'autres types de stress. Dans ce contexte, p21^{CIP1} peut inhiber les complexes CDK4/CDK6-cycline D, CDK2-cycline E et CDK2/CDK1-cycline A. De plus, p21^{CIP1} peut bloquer l'activité de PCNA (*Proliferative Cell Nuclear Antigen*) et inhiber la synthèse d'ADN¹¹. D'une autre part, les protéines INK4 interviennent spécifiquement sur les complexes CDK4-cycline D et CDK6-cycline D¹². Cette famille contient les protéines p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d}. Parmi celles-ci, la protéine p16^{INK4a} est l'un des suppresseurs de tumeur les plus étudiés. En effet, l'inactivation du locus *CDKN2A*, qui code pour p16^{INK4a}, est particulièrement fréquente dans les tumeurs humains¹³. Enfin, dans des contextes particuliers, certaines protéines ribosomiques peuvent également agir en tant que CKI¹⁴⁻¹⁶. Ces protéines, connues également comme RPIC (*Ribosomal Protein Inhibiting CDK*) constituent une nouvelle classe de CKI, car elles peuvent lier les complexes CDK4-cycline D, mais aussi CDK4 et cycline D de manière indépendante. Les RPIC seront plus abordées ultérieurement.

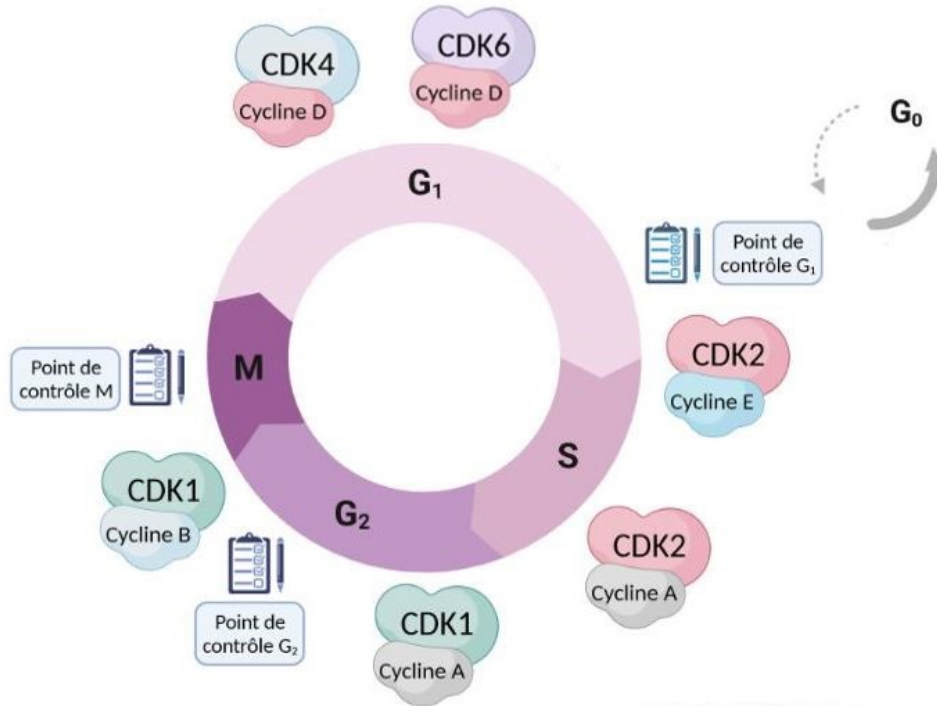


Figure 1.1: Les étapes du cycle cellulaire et leur régulation par les CDK

La progression du cycle cellulaire est régulée par l'action de différents complexes CDK-cycline. Les complexes CDK4-cycline D et CDK6-cycline D sont importants pour la progression à travers de la phase G₁. Pendant le point de contrôle G₁, les mécanismes de la cellule vérifient si les conditions sont propices pour la réplication de l'ADN. Dans le cas positif, la cellule sera engagée vers la poursuite du cycle cellulaire. Or, dans le cas négatif (par exemple, s'il y a une quantité importante de dommages à l'ADN), la cellule arrêtera son cycle cellulaire dans la phase réversible G₀. Ensuite, les complexes CDK2-cycline E sont importants pour la transition de la phase G₁ à la phase S, tandis que les complexes CDK2-cycline A sont importants pour les événements de la phase S. Puis, les complexes CDK1-cycline A agissent lors de la phase G₂. Le point de contrôle G₂/M assure que seulement les cellules ayant un matériel génétique bien répliqué et bien réparé s'engagent dans la division cellulaire. Les complexes CDK1-cycline B sont spécifiques pour la transition G₂/M et déclenchent l'assemblage du fuseau mitotique. Enfin, un dernier point de contrôle est effectué entre la métaphase et l'anaphase afin d'assurer une ségrégation des chromosomes adéquate^{1, 4}.

En plus de l'existence de différents complexes CDK-cycline et des CKI, la progression adéquate de chaque étape du cycle cellulaire est assurée par la présence de points de contrôle, dans lesquels l'intégrité du matériel génétique et de la machinerie de réplication sont vérifiées. Ces points de contrôle définissent si une cellule est en mesure de continuer son cycle cellulaire ou non.

Dans le cas négatif, des mécanismes pour empêcher la progression du cycle cellulaire ainsi que pour effectuer des corrections seront induits¹. Les points de contrôle du cycle cellulaire sont étroitement liés aux mécanismes de réparation de l'ADN et à l'activité des CKI, lesquels sont souvent altérés dans le cancer¹⁷.

1.1.2. Transformation tumorale

Le processus de transition d'une cellule saine vers une cellule cancéreuse est connu sous le nom de transformation. Elle implique des changements génétiques qui produiront des altérations dans les voies impliquées dans le contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire¹⁷. Ces changements génétiques peuvent se trouver sous différentes formes, notamment des mutations ponctuelles, des substitutions, des délétions, des amplifications, des fusions de gènes, des réarrangements chromosomiques ou des changements épigénétiques². Ainsi, le cancer est considéré comme une maladie génétique, dont les mutations peuvent être héritées ou acquises par le biais de facteurs environnementaux reliés au mode de vie de l'individu¹⁸. Ces changements génétiques peuvent soit activer des gènes pro-prolifératifs et pro-survie, désignés comme oncogènes, soit inactiver des gènes inhibant la prolifération cellulaire, aussi connus comme gènes suppresseurs de tumeur².

Les oncogènes sont donc des formes anormales de gènes impliquées dans la prolifération cellulaire et sa régulation. Les mutations dans ces gènes contribuent à une surstimulation des voies de signalisation favorisant la prolifération cellulaire ou altérant les mécanismes de réparation de l'ADN, entre autres. Les protéines oncogéniques sont réparties en cinq grandes classes selon leur activité : elles peuvent agir comme des facteurs de croissance, des récepteurs des facteurs de croissance, des transducteurs de signaux cellulaires, des régulateurs de l'apoptose ou des facteurs de transcription^{19, 20}. Parmi les oncogènes plus connus, nous pouvons citer l'oncogène *RAS*, muté dans environ 30% des cancers chez l'humain. Ce gène code pour la protéine RAS, une petite protéine G qui transporte des signaux provenant des récepteurs membranaires tyrosine kinase, comme les FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptors*), les ERBB (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et les PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptors*). Certaines mutations peuvent maintenir la protéine RAS dans son état actif de manière permanente (*RAS^{G12D}*, *RAS^{G12V}*, *RAS^{G12C}*), ce qui conduit à la perte de contrôle de la signalisation associée à cette protéine²¹.

Tableau 1.1 : Exemples d'oncogènes impliqués dans des tumeurs chez l'humain.

Gène	Fonction de la protéine	Altération en cancers	Incidence
RAS	Petite GTPase impliquée dans la transduction de signaux des récepteurs membranaires des facteurs de croissance	Mutation ponctuelle	Muté dans 30% des cancers (colon, pancréas, poumon, etc.) ²¹
RAF	Sérine/thréonine kinase impliquée dans la transduction des signaux de la voie ERK1/2	Activation constitutive	Mélanome, thyroïde, colorectal ²²
SRC	Tyrosine kinase. Favorise des voies pro-prolifératives, pro-survie et pro-angiogéniques	Activation constitutive	Colorectal, foie, poumon, sein ²³
BCL2	Protéine anti-apoptotique. Empêche l'homo-dimérisation de certains facteurs pro-apoptotiques	Activation constitutive	Lymphome à cellules B ²⁴
BCR-ABL	Tyrosine kinase. Favorise l'activation des voies JAK/STAT et MAPK	Translocation et fusion qui résultent en activation constitutive	Leucémie myéloïde chronique ²⁵
MYC	Facteur de transcription. Induit l'expression de gènes pro-prolifératifs et régule la réplication de l'ADN.	Amplification, translocation, dérégulation	Altéré dans une multitude de cancers (sein, estomac, poumon, etc.) ²⁶
EGFR	Récepteur tyrosine kinase de facteurs de croissance de la famille EGF	Amplification, surexpression	Poumon, colorectal, glioblastome, carcinome épidermoïde ²⁷
FGF-4	Facteur de croissance de la famille FGF	Synthèse constitutive	Estomac, sein ²⁸

D'un autre côté, les gènes suppresseurs de tumeur génèrent des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et l'inhibition de la prolifération. Ils sont ainsi responsables du blocage de la progression du cycle cellulaire, en arrêtant celui-ci ou en induisant la mort cellulaire programmée²⁰. Le gène *TP53*, qui code pour le facteur de transcription p53, est l'un des gènes

suppresseurs de tumeurs les plus importants²⁹. La protéine p53 joue un rôle clé dans l'activation des systèmes de suppression tumorale en réponse à différents types de stress³⁰. L'importance du gène *TP53* dans la suppression tumorale est soulignée par sa forte fréquence d'inactivation dans les cancers humains. En effet, les altérations génétiques du gène TP53 sont les plus communément trouvées dans les cancers humains, avec un taux de mutation de plus du 50%^{31, 32}. Un autre suppresseur de tumeur important est le gène qui code pour la protéine RB, qui joue un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire³³. Le gène *CDKN2A* est également considéré comme un gène suppresseur de tumeur et est souvent altéré dans plusieurs types de cancer^{13, 34-36}.

Tableau 1.2 : Exemples de gènes suppresseurs de tumeur les plus représentatifs chez l'humain.

Gène	Fonction de la protéine	Altération en cancers	Incidence
<i>RB</i>	Régulation de la progression du cycle cellulaire (phase G ₁ /S); remodelage de la chromatine	Mutations ponctuelles, délétions, perte de fonction	Rétinoblastome, mésothéliome, lymphome de Burkitt ³⁷
<i>TP53</i>	Facteur de transcription impliqué dans le cycle cellulaire, apoptose, sénescence, réparation de l'ADN, etc.	Perte de fonction, délétions, génération de dominants négatifs	Muté dans une multitude de cancers (ovarien, colorectal, pancréas, etc.) ³¹
<i>CDKN2A</i>	Code pour p16 ^{INK4a} , un inhibiteur de CDK4/6 et pour p14 ^{ARF} , un inhibiteur de HDM2	Délétions, mutations ponctuelles, hyper-méthylation du promoteur	Mélanome, glioblastome, pancréas ¹³
<i>PTEN</i>	Phosphatase qui régule négativement la signalisation de la voie PI3K/AKT	Mutations ponctuelles, délétions, perte de fonction	Prostate, endométrial, glioblastoma, poumon, sein ³⁸
<i>VHL</i>	E3 ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation des HIF (<i>Hypoxia-Inducible Factors</i>)	Mutation ponctuelle et inactivation	Syndrome de Von Hippel-Lindau, cerveau, rein, pancréas, etc. ³⁹
<i>BRCA1/2</i>	Réparation de cassures double-brin de l'ADN	Mutation ponctuelle et inactivation	Sein, ovaire ⁴⁰

Les cellules n'ont besoin que d'un nombre limité d'anomalies génétiques pour provoquer leur transformation, dont le minimum oscille entre 4 et 6². Ceci révèle également que la dérégulation d'un nombre limité de voies cellulaires semble être suffisante pour l'acquisition d'un phénotype cancéreux. En règle générale, les premières altérations génétiques pro-oncogéniques forment des lésions précancéreuses. Celles-ci constituent des tumeurs bénignes, dont leur prolifération sera limitée par les processus cellulaires de suppression tumorale. Cependant, l'accumulation de nouvelles altérations génétiques permet le contournement de ces mécanismes et par conséquent, la progression des lésions bénignes vers des tumeurs malignes.

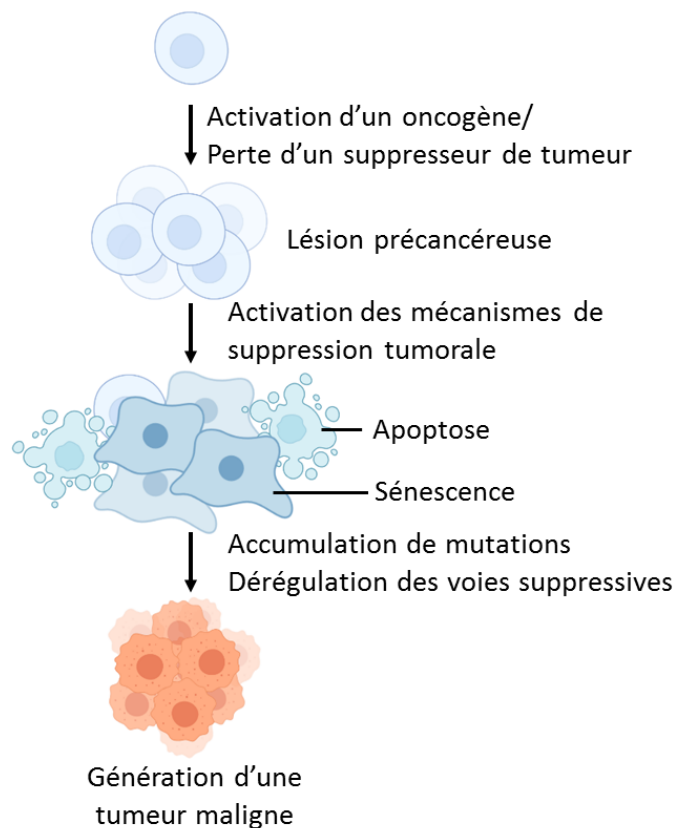


Figure 1.2 : Modèle de l'accumulation de mutations lors de la progression tumorale.

Suivant les mutations activatrices sur des oncogènes (comme RAS^{G12V}) ou bien la perte de protéines suppressives de tumeur (comme RB ou PTEN), les cellules ont une activité proliférative accrue qui génère un stress répliatif et l'apparition des lésions précancéreuses. En conséquence, les mécanismes de suppression tumorale (apoptose et sénescence cellulaire) sont activés. Lors de la progression tumorale, l'accumulation d'autres mutations favorise le contournement de ces mécanismes et par conséquent, la progression des lésions bénignes vers des tumeurs malignes. Figure adaptée de (41).

L'accumulation de nouvelles altérations permet aux tumeurs malignes d'acquies d'autres propriétés qui favorisent leur survie ainsi que leur capacité à envahir les tissus environnants.⁴²⁻⁴⁴ Ceci est particulièrement vrai dans le cas des cancers solides, comme l'adénocarcinome canalaire pancréatique, dont les étapes de progression de la transformation sont bien caractérisées⁴⁵. L'accumulation de ces altérations génétiques résulte en des pertes ou gains de fonctions cellulaires, qui nous permettent de définir des caractéristiques communes des cellules cancéreuses. De nos jours, nous savons que les cellules cancéreuses, en plus d'avoir un haut taux de prolifération, possèdent des mécanismes de survie qui leur permettent de se diviser sans limites (immortalisation), d'échapper aux mécanismes de mort cellulaire programmée et de résister aux signaux antiprolifératifs externes¹⁷.

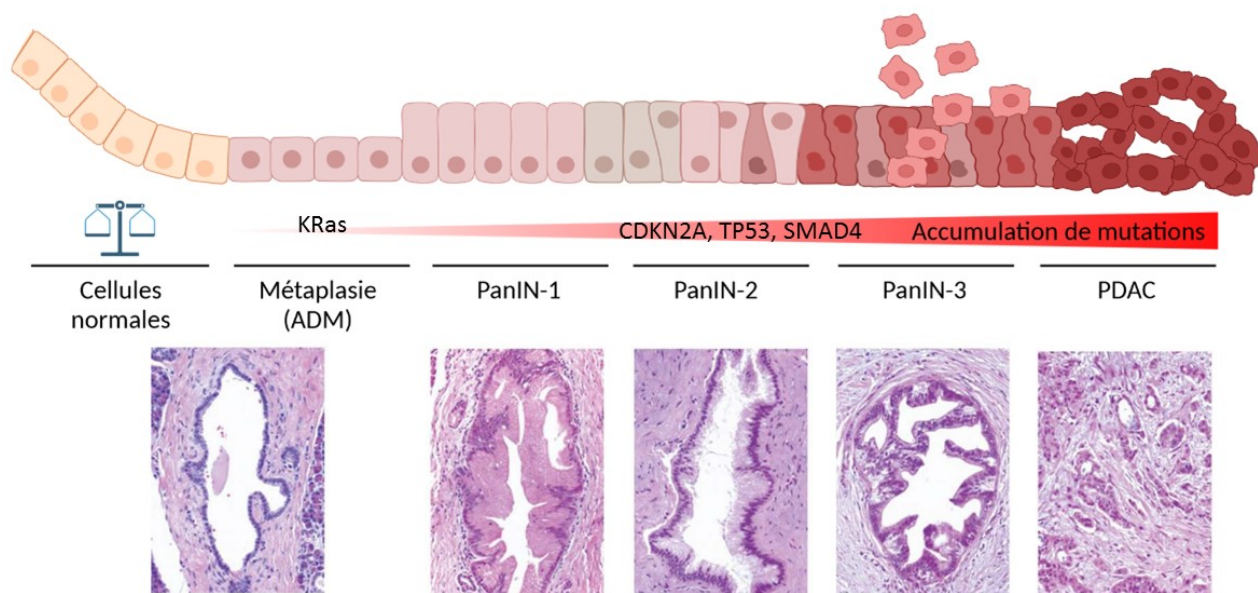


Figure 1.3 : Modèle de la progression tumorale d'un cancer solide : exemple du PDAC

L'initiation d'un processus de transformation oncogénique commence par une mutation génétique qui déclenche le premier événement de métaplasie. Dans le cas de l'adénocarcinome canalaire pancréatique (désormais PDAC : *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*), les cellules acinaires du pancréas exocrine peuvent acquies un premier défaut génétique à cause de différents facteurs de risque environnementaux, qui comprennent les dommages tissulaires, l'inflammation, etc. Ceci initie un processus de différenciation vers un phénotype plus canalaire (ADM, *Acinar-to-Ductal Metaplasia*). L'acquisition de ces caractéristiques plus « épithéliales » rendent ces cellules plus susceptibles aux stress et aux altérations pro-oncogéniques, notamment les mutations activatrices de l'oncogène *KRAS* ($KRAS^{G12D}$ ou $KRAS^{G12V}$),

détectées dans plus du 95% des PDAC. L'accumulation d'autres mutations ou le stress environnemental soutenu peuvent mener au développement de lésions précancéreuses, connues comme néoplasies intra-épithéliales pancréatiques de bas grade, ou PanIN (*Pancreatic Intraepithelial Neoplasia*) de type 1 et 2. L'accumulation subséquente de mutations dans d'autres gènes, notamment des gènes suppresseurs de tumeur comme *CDKN2A*, *TP53* et *SMAD4* conduit au développement des tumeurs *in situ* (PanIN de type 3 ou PanIN de haut grade), puis des tumeurs invasives (PDAC)⁴⁶. Les images des canaux pancréatiques colorés à l'hématoxyline-éosine ont été adaptées de (47).

1.1.3. Mécanismes de suppression tumorale

Le processus de transformation oncogénique est donc favorisé par l'accumulation de nouvelles altérations génétiques. Puisque les cellules sont constamment exposées à une multitude de stimuli qui favorisent l'apparition de nouvelles mutations (comme le stress oxydatif, le raccourcissement de télomères inhérent aux divisions cellulaires, les radiations, etc.)⁴⁸, elles possèdent des mécanismes afin de contenir un éventuel processus de transformation tumorale. Ces mécanismes sont connus comme mécanismes intrinsèques de suppression tumorale. Brièvement, les mécanismes de suppression tumorale visent à empêcher la transmission des mutations pro-oncogéniques, en promouvant la mort cellulaire programmée (apoptose) ou l'arrêt prolifératif des cellules susceptibles de devenir cancéreuses (sénescence)³⁰. Lors de la mort cellulaire programmée, ou apoptose, les cellules se « suicident » de manière contrôlée et sécuritaire pour les cellules environnantes, pour ensuite être éliminées par le système immunitaire³⁰. D'un autre côté, les cellules susceptibles de transformation oncogénique peuvent subir un mécanisme d'arrêt à long terme du cycle cellulaire, connu comme sénescence cellulaire^{30, 49}. Étant donné l'importance du processus de sénescence cellulaire pour cette thèse, la prochaine section y sera consacrée.

1.2. La sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire est un processus défini par un arrêt stable et à long terme de la prolifération cellulaire. Une des particularités de ce phénomène est le maintien de la viabilité et de l'activité métabolique des cellules qui enclenchent cette réponse⁵⁰. La sénescence fut décrite pour la première fois en 1961 par Leonard Hayflick et Paul Moorhead, qui observèrent que les fibroblastes maintenus en culture cellulaire ont un nombre défini de divisions cellulaires^{51, 52}. Cette limite, ou horloge biologique, est connue de nos jours comme étant la limite de Hayflick et c'est ce dernier qui lança l'hypothèse que l'existence de cette limite pourrait constituer une expression du vieillissement au niveau cellulaire⁵¹. Aujourd'hui, nous savons que le processus qu'il avait observé n'était nul autre que la sénescence réplivative, un type de sénescence dans lequel l'arrêt de la prolifération est dû à une érosion progressive des télomères au fil des divisions cellulaires^{53, 54}. La longueur des télomères agit donc comme une horloge moléculaire, déterminant la limite de Hayflick. Curieusement, les travaux de Leonard Hayflick subissent un processus de révision dur et même si ses résultats furent reproduits par d'autres laboratoires, il n'en demeure pas moins que certains scientifiques voient cette réponse cellulaire comme étant un artéfact et restent sceptiques quant à la pertinence de ce phénomène d'un point de vue biologique. En effet, la sénescence cellulaire est un processus hétérogène et difficile à discerner avec des marqueurs bien définis. Cependant, dans les dernières années sa pertinence d'un point de vue physiologique a été prouvé et plusieurs groupes visent à investiguer le rôle des cellules sénescents dans différents états pathophysiologiques^{50, 55}.

La sénescence cellulaire peut également être induite de manière prématurée (avant la limite de Hayflick) par des stimuli autres que le raccourcissement de télomères⁵⁰. Ceux-ci sont variés et la plupart ont en commun la capacité de générer des situations de stress ou encore de favoriser le processus d'initiation de la transformation oncogénique chez les cellules atteintes⁵³. L'activation d'oncogènes ou la perte de gènes de suppresseurs de tumeur, le stress oxydant ou encore les traitements génotoxiques en sont quelques exemples⁵⁰. Dans certaines situations, la sénescence cellulaire pourrait donc agir comme une barrière antitumorale en réponse à ces stimuli^{30, 49}. Le rôle de la sénescence cellulaire dans la suppression tumorale a généré beaucoup d'intérêt dans les dernières années et sera discuté dans la section suivante.

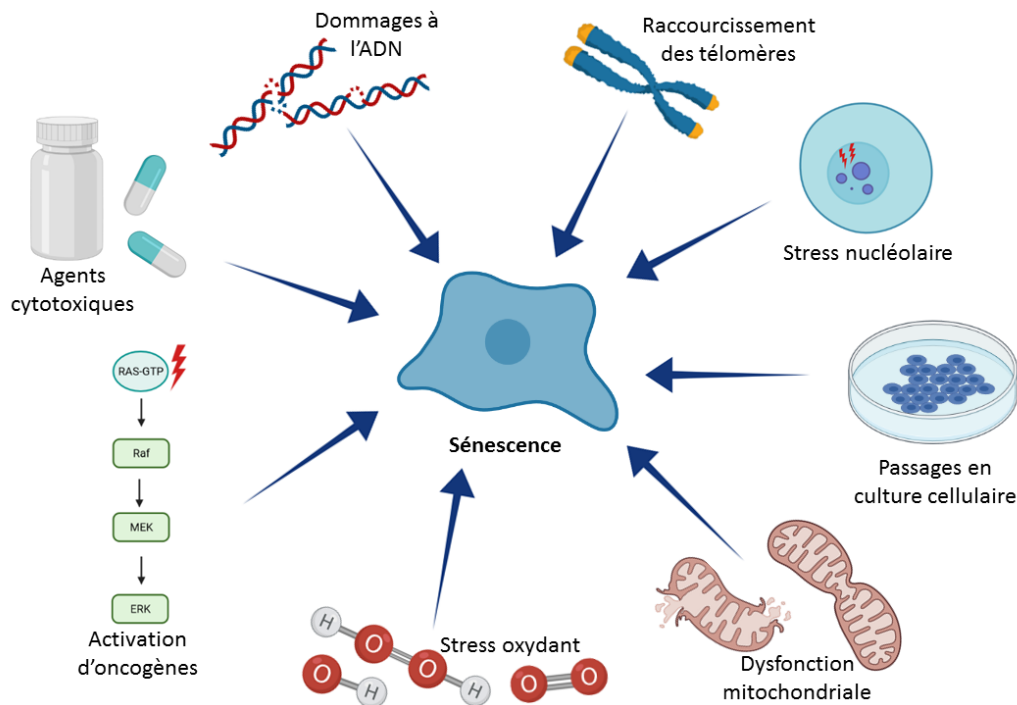


Figure 1.4 : Stimuli déclencheurs de la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire peut être déclenchée en réponse à plusieurs stimuli. Le raccourcissement de télomères au fil des divisions cellulaires est à l'origine de la sénescence répllicative. Quand les télomères deviennent trop courts et donc dysfonctionnels, la réponse aux dommages à l'ADN (désormais DDR, *DNA Damage Response*) est activée de manière soutenue, ce qui produit une activation de p53 et l'induction de la sénescence^{56, 57}. De la même manière, les passages successifs en culture cellulaire sont reliés au raccourcissement de télomères. En outre, les conditions de culture cellulaire peuvent générer un stress oxydatif, notamment chez des modèles cellulaires murins (plus sensibles à l'accumulation de dommages à l'ADN), ce qui peut également déclencher le phénotype sénescence⁵⁸. Le stress oxydatif peut également produire des cassures de brins d'ADN et accélérer le raccourcissement des télomères, contribuant aussi à l'induction de la sénescence⁵⁹. Les agents génotoxiques, comme les composés chimio-thérapeutiques sont également des puissants inducteurs de la sénescence⁶⁰⁻⁶². La sénescence prématurée peut également être déclenchée par une signalisation forte et/ou soutenue des voies pro-prolifératives, qui est favorisée par les altérations sur des oncogènes (comme les mutations activatrices de *RAS*)⁶³, la perte des suppresseurs de tumeur (comme les mutations inactivatrices de *PTEN*; *Phosphatase and TENSin homolog*)⁶⁴, la stimulation continue avec des cytokines (comme l'interféron- β)⁶⁵ et la surexpression de récepteurs des facteurs de croissance (comme *ERBB2*)⁶⁶. D'un autre côté, l'activation des suppresseurs de tumeurs (comme p53, p16^{INK4a}, RB ou p21^{CIP1}) peut également induire la sénescence, ce qui est en accord avec le rôle de ce processus dans la suppression tumorale⁴⁹. Les mitochondries dysfonctionnelles contribuent à l'induction de

la sénescence, en générant des ROS (*Reactive Oxygen Species*) et en activant la voie p53, ce qui est connu comme MiDAS (*Mitochondrial Dysfunction-Associated Senescence*)^{67,68}. Enfin, les composés ciblant les voies de synthèse des ARN ribosomiques (ARNr) comme le CX-5461, peuvent générer un stress nucléolaire, qui altère la biogenèse des ribosomes et déclenche la sénescence cellulaire^{16, 69, 70}.

1.2.1. Implications physiologiques de la sénescence cellulaire

Les cellules sénescents peuvent affecter de manière très diverse la globalité d'un organisme vivant. Les effets de la sénescence cellulaire dans des contextes spécifiques ont été définis comme étant bénéfiques dans certaines situations, mais mauvais pour d'autres^{49, 71}. De plus, certaines fonctions biologiques des cellules sénescents sont dépendantes de leurs sécrétions. En effet, les cellules sénescents possèdent un profil sécrétoire riche en cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, métalloprotéinases, lipides et facteurs angiogéniques qui est connu comme SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*)⁷². Ce dernier est responsable de plusieurs des effets négatifs causés par la sénescence, mais aussi de certains de ses facteurs bénéfiques^{73, 74}.

D'une part, la sénescence cellulaire constitue un mécanisme de suppression tumorale dans les cellules susceptibles de devenir carcinogéniques^{30, 49}. En effet, les altérations génétiques favorisant la transformation, comme l'activation d'un oncogène, promeuvent un type de sénescence connu sous le nom de sénescence induite par les oncogènes (désormais OIS, *Oncogene-Induced Senescence*)⁶³. Les cellules sénescents s'accumulent donc dans des foyers des tumeurs bénignes ou des lésions précancéreuses. En revanche, elles sont absentes des tumeurs malignes ou des cancers plus avancés⁷⁵⁻⁷⁹. Ceci suggère que les cellules présentes dans les tumeurs plus agressives ont trouvé des moyens afin de contourner la sénescence cellulaire et poursuivre ainsi leur processus de transformation. Ceci est rendu possible par l'acquisition de nouvelles mutations génétiques qui compromettraient le programme sénescents⁸⁰⁻⁸². En outre, les cellules sénescents sécrètent certaines chimiokines capables d'attirer des acteurs du système immunitaire aux foyers des lésions précancéreuses, promouvant ainsi l'immunité antitumorale^{74, 83-86}. Parmi les cellules immunitaires impliquées dans ce processus, les cellules NK (*Natural Killer*), les cellules T et les macrophages interviennent en éliminant les cellules sénescents^{86, 87}. Ceci résulterait en une élimination des cellules portant des anomalies qui les font devenir susceptibles de subir une transformation oncogénique. L'élimination des cellules sénescents par le système immunitaire constitue donc un mécanisme important afin de limiter la progression tumorale.^{71, 84}. Par ailleurs,

la sénescence peut également être induite en réponse à des traitements chimio-thérapeutiques, comme la radiation ou les agents génotoxiques. Ce type de sénescence a été identifié dans des tumeurs après des traitements de chimiothérapie et est connu comme TIS (*Therapy-Induced Senescence*)⁶². En fait, la réinduction de la sénescence dans les cellules cancéreuses et leur subséquente élimination constitue une des stratégies antitumorales le plus étudiées de nos jours. Cette approche est connue sous le nom de stratégie *one-two punch*⁸⁸⁻⁹⁰.

Ces dernières années, la sénescence a également été associée à la formation de certaines structures anatomiques et au remodelage tissulaire lors de l'embryogénèse. Ce type de sénescence est connu comme sénescence développementale et a lieu dans des structures embryonnaires, comme le mésonéphros⁹¹⁻⁹³. Contrairement à d'autres types de sénescence, la sénescence développementale est dépourvue des dommages à l'ADN. L'induction de la sénescence développementale dans les cellules de ces structures est suivie de leur élimination ciblée par des macrophages, ce qui favorise le remodelage tissulaire lors du développement embryonnaire. Enfin, les cellules sénescents semblent également jouer un rôle dans les processus de cicatrisation, en recrutant des cellules immunitaires et des facteurs de remodelage à des endroits ciblés⁹⁴.

D'un autre côté, les cellules sénescents peuvent également contribuer à la progression tumorale. Paradoxalement, les cytokines et facteurs pro-inflammatoires du SASP peuvent contribuer à la formation d'un microenvironnement tumoral propice à la transformation des cellules saines^{95, 96}, à la formation de métastases⁹⁷⁻⁹⁹ ainsi qu'à la reprogrammation en cellules souches¹⁰⁰⁻¹⁰². Cette dernière est notamment associée à la résistance aux thérapies anti-cancéreuses^{103, 104}. En effet, l'accumulation des cellules sénescents dû à l'absence de leur élimination de manière régulée semble être pernicieuse^{50, 105}. Par ailleurs, les cellules sénescents s'accumulent durant le vieillissement d'un organisme et contribuent aux effets pathologiques associés à celui-ci¹⁰⁶. De plus, les facteurs du SASP contribuent à l'établissement d'un environnement pro-inflammatoire, plus connu dans la littérature comme *inflammageing*^{49, 107, 108}. L'*inflammageing* est défini comme un processus global d'inflammation associé au vieillissement. Il constitue l'une des causes principales de la dégénérescence et de la perte d'homéostasie tissulaire chez les individus âgés. Il est alors considéré comme un facteur de risque pour le développement de maladies chroniques associées au vieillissement. Dès lors, l'accumulation de cellules sénescents peut contribuer au développement de nombreuses pathologies, telles que la formation de plaques athérome dans les

vaisseaux sanguins^{109, 110}, le développement de diabète de type 2^{111, 112}, la neuro-inflammation associée aux maladies de Parkinson ou d'Alzheimer¹¹³⁻¹¹⁶, la fibrose pulmonaire idiopathique^{117, 118}, etc. L'élimination spécifique de ces cellules dans des modèles génétiques de souris reproduisant ces diverses pathologies montrent des résultats très encourageants, en augmentant sensiblement la longévité des animaux ainsi qu'en limitant le développement de pathologies associées au vieillissement^{119, 120}. Par ailleurs, les cellules sénescents participent également à la survenue de pathologies indépendantes du vieillissement, comme l'obésité¹¹⁶, la rétinopathie diabétique¹²¹ ou la maladie à coronavirus (COVID-19)¹²². Il a également été montré que l'élimination des cellules sénescents dans des modèles murins diminue significativement les troubles associés à ces pathologies^{116, 121}. Ces observations ont généré beaucoup d'intérêt en pharmacologie afin d'identifier des composés capables d'induire spécifiquement la mort des cellules sénescents. Ces composés sont connus comme sénolytiques.

1.2.2. Mécanismes moléculaires de la sénescence cellulaire

En accord avec son rôle dans la suppression tumorale, la sénescence cellulaire est régulée par les voies suppressives p53-p21^{CIP1} et RB-p16^{INK4a}^{123, 124}. Ces dernières sont interconnectées entre elles et sont finement régulées par une multitude d'effecteurs. L'activation de ces voies induit des changements majeurs dans l'expression génique, principalement par le biais des protéines p53 et RB.

La voie p53-p21^{CIP1} est davantage impliquée dans l'établissement de la sénescence cellulaire alors que la voie de p16^{INK4a}-RB est plutôt associée au maintien du processus à long terme¹²⁵. Les voies p53-p21^{CIP1} et de p16^{INK4a}-RB convergent dans l'inhibition de la phosphorylation de la protéine RB, ce qui conduit à son activation. La protéine RB dans sa forme active est alors capable de lier les facteurs de transcription de la famille E2F et d'empêcher l'expression des gènes pro-prolifératifs sous leur contrôle^{5, 6, 126}. De plus, les complexes RB-E2F sont séquestrés dans les corps nucléaires de PML par la protéine PML (*Promyelocytic Leukemia*), elle-même une cible transcriptionnelle de p53¹²⁷, ce qui contribue à l'inhibition des facteurs E2F¹²⁵. En outre, RB favorise la compaction épigénétique des gènes cibles des facteurs E2F, en s'associant avec l'histone méthyltransférase SUV39H1 (*Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1*) et la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), ce qui produit des zones d'hétérochromatine peu accessibles. Ces régions avec des zones chromatiniennes denses contribuent à l'irréversibilité du

processus de sénescence cellulaire et sont nommés foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF)^{125, 128, 129}. Ce remodelage épigénétique permet que les cellules sénescentes restent en arrêt prolifératif même en présence de signaux mitogéniques.

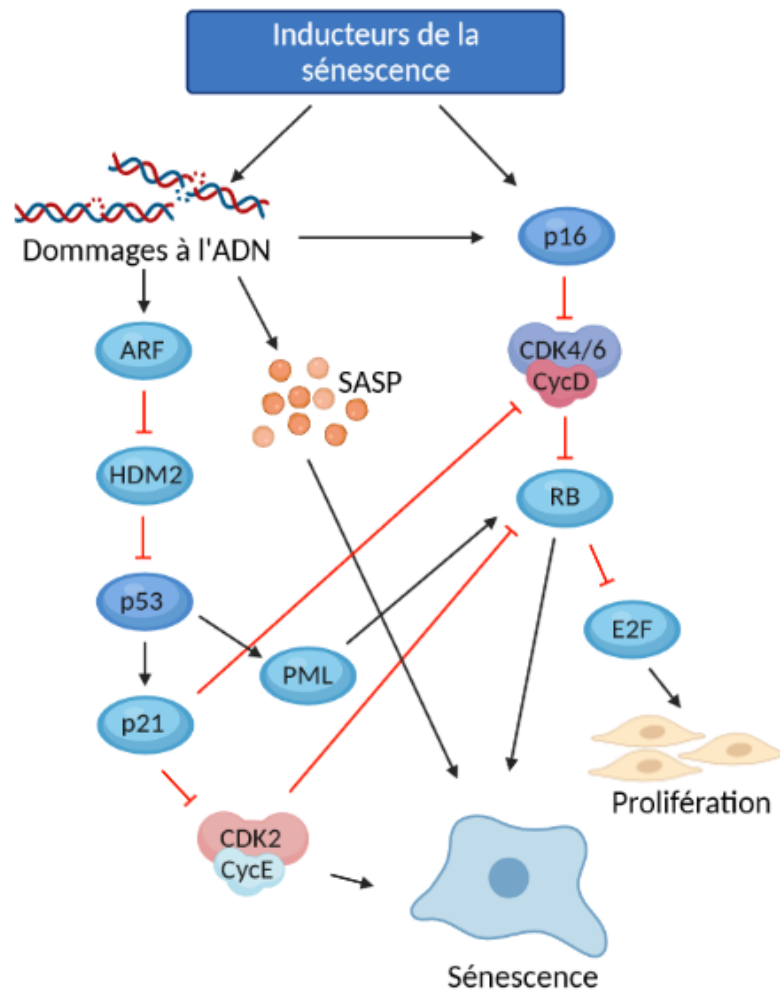


Figure 1.5 : Régulation de la sénescence par les voies p53-p21^{CIP1} et p16^{INK4a}-RB

Les stimuli inducteurs de la sénescence entraînent des dommages à l'ADN, ce qui mène à l'accumulation du variant γ H2Ax (γ -H2A histone family member X) et de la protéine 53BP1 (*p53-Binding Protein 1*) dans la chromatine. Ceci active la voie de la DDR, qui déclenche une cascade de signalisation qui implique les kinases ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated Serine/Threonine Kinase*) et ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein Serine Threonine Kinase*) puis CHK1 (*Checkpoint Kinase 1*) et CHK2 (*Checkpoint Kinase 2*) afin d'activer p53^{130, 131}. p53 induit la transcription du CKI p21^{CIP1}¹³², de PML ainsi que d'autres cibles transcriptionnelles impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire. Les dommages à l'ADN produisent

également l'activation des protéines p38 et PKC (*Protein Kinase C*), qui peuvent induire l'expression de p16^{INK4a}. De plus, ATM et ATR favorisent l'expression de GATA4 (*GATA Binding Protein 4*), un activateur de NF-κB (*Nuclear Factor kappa B*), un facteur de transcription responsable de l'induction d'une multitude du SASP. D'une autre part, les protéines codées par le locus *CDKN2A*, p16^{INK4a} et ARF (*Alternate Reading Frame*) jouent également un rôle important dans la sénescence^{124, 133}. Dans des conditions physiologiques, ce locus est réprimé épi-génétiquement par les complexes PRC1/2 (*Polycomb Repressive Complexes 1/2*), qui génèrent des marques de chromatine répressive H3K27me3¹³⁴. Lors de l'induction de la sénescence, le locus *INK4/ARF* est réactivé par l'inhibition des complexes PRC^{134, 135} ou par l'activité de déméthylases^{136, 137}. La protéine ARF est un inhibiteur de l'E3 ubiquitine ligase de p53, HDM2/MDM2 (*Human Double Minute 2/ Mouse Double Minute 2*) et son action contribue ainsi à l'activation de la voie p53¹³⁸. De son côté, p16^{INK4a} est un inhibiteur de CDK4/6 et son action empêche la phosphorylation de RB. Dans son état hypo-phosphorylé, RB peut contribuer à l'arrêt du cycle cellulaire en réprimant l'expression des facteurs de transcription E2F, des régulateurs de l'expression des gènes pro-prolifératifs¹²⁴. RB peut également interagir avec PML, ce qui produit la séquestration des complexes RB-E2F dans les corps nucléaires de PML et contribue à l'inhibition des facteurs E2F. Enfin, le SASP peut favoriser l'induction de la sénescence dans les cellules environnantes, processus connu comme sénescence paracrine. Les flèches noires indiquent une activation et les lignes rouges indiquent une inhibition. Figure adaptée de (139).

L'induction de la sénescence est souvent le résultat de l'accumulation des dommages à l'ADN. Dans le cas de la sénescence répllicative, le raccourcissement des télomères produit la perte des protéines de liaison aux télomères TRF2 (*Telomeric Repeat-binding Factor 2*) et POT1 (*Protection of Telomeres 1*), qui participent à l'inhibition des kinases ATM et ATR respectivement. Quand les télomères sont suffisamment courts, ces kinases sont inhibées et la DDR est déclenchée dans l'ADN télomérique^{56, 140}. Dans le cas de la sénescence induite par les oncogènes, les dommages à l'ADN sont formés à la suite des perturbations dans la réplication de l'ADN lors de la phase d'hyper-prolifération. En effet, l'expression de certains oncogènes, comme *RAS*, *BRAF* (*B-RAF proto-oncogene, serine/threonine kinase*) ou *E2F1* (*E2F transcription Factor 1*) induit une phase d'hyper-prolifération avant la mise en place de l'arrêt du cycle cellulaire. Le stress hyper-prolifératif provoque une hyperactivation de la machinerie de réplication de l'ADN, ce qui mène à une accumulation d'origines de réplication. Puisque ces dernières sont produites très rapidement, elles provoquent des blocages dans les fourches de réplication ainsi que des perturbations dans la synthèse des nouveaux brins d'ADN, qui favorisent l'activation de la DDR¹⁴¹⁻¹⁴³. De plus, l'expression des oncogènes favorise l'accumulation de ROS¹⁴⁴. Ces derniers ont des propriétés

mitogéniques et stimulent la survenue de la phase d'hyper-prolifération¹⁴⁵. En outre, les ROS contribuent à l'activation de la DDR en promouvant l'oxydation de bases azotées, ce qui génère des lésions sur l'ADN¹⁴⁶. D'une autre part, la sénescence développementale est indépendante de la formation des dommages à l'ADN et des suppresseurs de tumeur p53 et p16^{INK4a}. Ce type de sénescence dépend plutôt de p21^{CIP1}, dont l'expression est induite dans ce contexte par l'activité de TGFβ (*Transforming Growth Factor beta*) et de FOXO (*Forkhead box protein O*)^{91, 92}.

Enfin, l'expression des gènes du SASP dépend de l'expression de deux facteurs de transcription majeurs : NF-κB¹⁴⁷ et C/EBP-β¹⁴⁸ (*CCAAT-Enhancer-Binding Protein*). La mise en place de ce phénotype sécrétoire requiert également la présence de dommages à l'ADN persistants ne pouvant être réparés¹⁴⁹. De plus, les acteurs de la voie de la DDR, ATM et ATR, sont nécessaires à l'accumulation du facteur de transcription GATA4, un médiateur important de la sénescence. En effet, dans des conditions physiologiques, la protéine p62 interagit avec GATA4 afin de réguler sa dégradation par autophagie. Lors de l'induction de la sénescence, GATA4 est stabilisé et favorise l'activité de NF-κB, ce qui contribue à l'établissement et au maintien du SASP indépendamment des voies p53-p21^{CIP1} et RB-p16^{INK4a}. L'expression de GATA4 est donc nécessaire pour l'entrée en sénescence et pour le développement du SASP¹⁵⁰.

1.2.3. Caractéristiques des cellules sénescentes

Malgré le progrès des connaissances dans le domaine de la sénescence cellulaire, différents aspects de ce phénomène restent encore mal caractérisés. Les marqueurs associés à cette réponse cellulaire peuvent varier selon le type de stimulus qui induit ce phénotype ou encore le type de cellules qui subit ce processus. De plus, plusieurs biomarqueurs utilisés afin d'identifier la sénescence ne sont pas spécifiques à cette dernière et peuvent être détectés dans d'autres conditions, d'où la nécessité de combiner plusieurs de ces marqueurs afin d'identifier les cellules sénescentes¹⁵¹⁻¹⁵³.

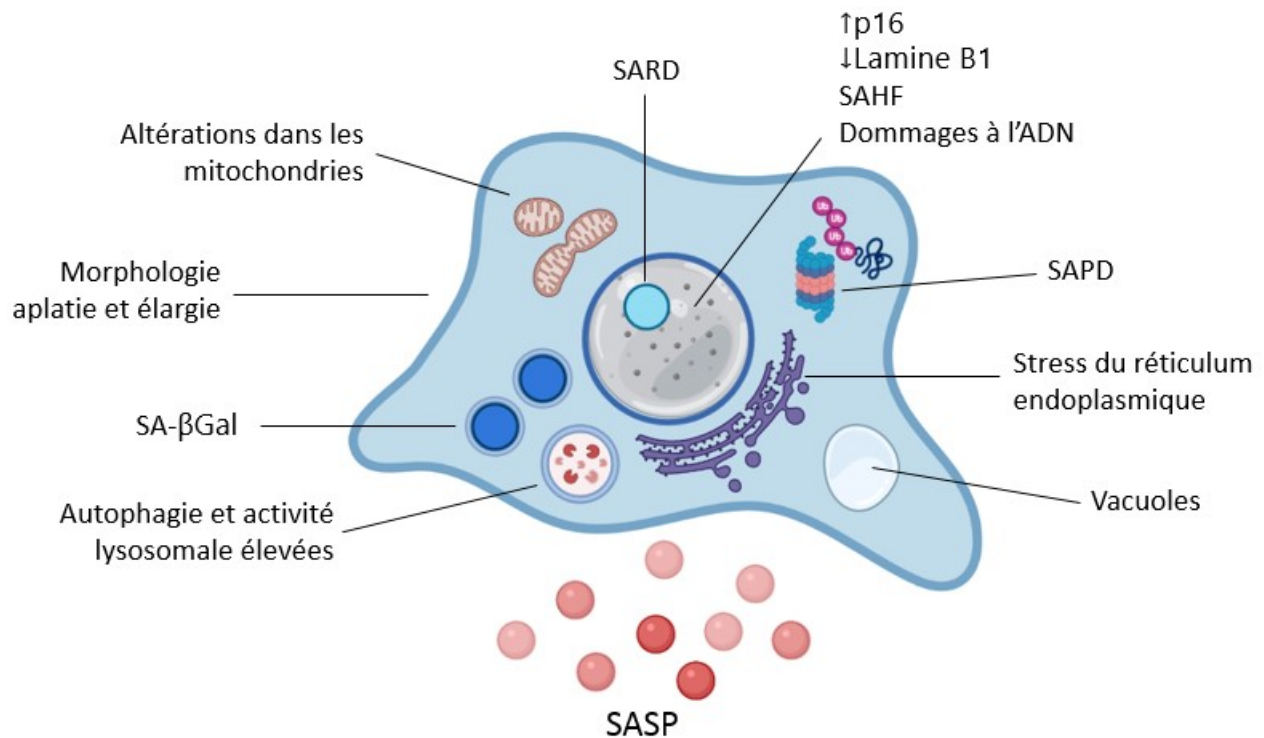


Figure 1.6 : Caractéristiques des cellules sénescentes

Ces caractéristiques ne sont pas exclusives aux cellules sénescentes ni universelles de toutes les types de sénescence. La caractérisation des cellules sénescentes devrait s’effectuer par une combinaison de ces marqueurs. Les SARD (*Senescence-Associated Ribosome biogenesis Defects*) et le SAPD (*Senescence-Associated Protein Degradation*) seront traités plus en profondeur dans les sections suivantes.

La caractéristique principale des cellules sénescentes est l’arrêt du cycle cellulaire. En effet, les cellules sénescentes perdent leur capacité à proliférer suivant l’inhibition des kinases dépendantes de cyclines^{123, 124, 154}. Cet arrêt du cycle cellulaire arrive généralement dans la phase G_1/S , mais quelques travaux décrivent que les cellules sénescentes peuvent également arrêter leur cycle cellulaire dans la phase G_2 ^{155, 156}. Étant donné le caractère hétérogène de la sénescence, il est important de différencier ce processus des autres types d’arrêt du cycle cellulaire, comme la quiescence. Lors de la quiescence, les cellules déclenchent un arrêt transitoire du cycle cellulaire dans la phase G_0 en réponse à des conditions défavorables pour la division cellulaire, comme l’absence de nutriments ou de facteurs de croissance. En conséquence, ces cellules subissent une diminution de toute activité métabolique et énergétique et demeurent dans un état latent jusqu’à ce

que les conditions environnementales soient de nouveau adéquates. D'un autre côté, bien que les cellules sénescents ne prolifèrent plus, elles continuent d'exhiber une forte activité métabolique. De plus, le remodelage épigénétique des cellules sénescents les empêche de proliférer même en présence de signaux mitogéniques⁵⁰.

Les cellules sénescents présentent une morphologie particulière caractérisée par un aspect aplati et élargi et qui peut être facilement identifiable au microscope⁴⁹. Elles arborent également une accumulation des vacuoles ainsi qu'un unique nucléole de grande taille¹⁶. En outre, les cellules sénescents présentent une activité accrue de l'enzyme β -galactosidase lysosomiale, connue dans la littérature comme activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal)¹⁰⁶. L'analyse de l'activité SA- β -gal est utilisée comme un des marqueurs principaux de la sénescence, par le biais d'un essai dans lequel un sucre synthétique, le X-gal, est administré aux cellules. Ce sucre synthétique peut être métabolisé à un pH acide par l'enzyme β -galactosidase des cellules sénescents, produisant finalement un composé de coloration bleue qui permet l'identification visuelle des cellules sénescents. Or, d'autres cellules ayant une forte activité lysosomiale, comme des macrophages ou des ostéoclastes, peuvent également être colorées par cet essai^{157, 158}, ce qui renforce l'importance de l'utilisation de plusieurs marqueurs afin d'identifier les cellules sénescents.

Du point de vue moléculaire, l'activation du locus *CDKN2A*, qui produit les protéines p16^{INK4a} et ARF, est souvent utilisé comme marqueur de sénescence^{124, 133, 159}. L'analyse de l'expression de p16^{INK4a} est couramment utilisée une comme marqueur de la sénescence, car ses niveaux d'expression sont très bas, voire indétectables, dans les cellules et tissus normaux, mais fortement induits dans les cellules sénescents et les tissus chez des individus âgés^{133,159}. Toutefois, il ne s'agit pas d'un biomarqueur infailible car il existe d'autres formes de sénescence cellulaire indépendantes de l'induction de p16^{INK4a}¹⁶⁰⁻¹⁶² ainsi que des cellules non-sénescents qui expriment des hauts niveaux de cette protéine¹⁶³.

D'autres composants des voies de signalisation p53-p21^{CIP1} et p16^{INK4a}-RB sont également utilisés comme marqueurs des cellules sénescents. En ce qui concerne la voie p53-p21^{CIP1}, son activation est généralement évaluée par l'induction et/ou la stabilisation de p53 ainsi que par les niveaux de ses cibles transcriptionnelles en aval, comme p21^{CIP1}¹⁶⁴, GADD45A¹⁶⁵ (*Growth Arrest and DNA Damage Inducible 45 Alpha*), PML¹²⁷, etc. Quant à la voie de p16^{INK4a}-RB, l'analyse des

niveaux des cibles des facteurs de transcription E2F¹⁶⁶, comme le marqueur de prolifération MCM6 (*Minichromosome Maintenance Complex Component 6*) ou la protéine de l'enveloppe nucléaire lamine B1¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ peuvent servir d'indicateurs de son activation. De plus, la voie p16^{INK4a}-RB favorise la formation de SAHF¹⁶⁶, qui peuvent être visualisés en examinant la réorganisation structurale de l'ADN nucléaire par une coloration au DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) ou en détectant les zones d'hétérochromatine par le biais d'anticorps liant les composants des SAHF, comme les tri-méthylations de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) et les protéines HP1^{166, 170}. Par ailleurs, en plus de SAHF, les cellules sénescents sont caractérisées au niveau nucléaire par la présence des corps de PML¹²⁵ et par des foci de dommages à l'ADN persistants¹⁷¹. Ces derniers, plus connus sous le nom de DNA-SCARS (*DNA-Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence*) constituent des structures nucléaires qui peuvent être observées en analysant les protéines 53BP1, γ H2Ax ainsi que l'activation des protéines ATM, CHK2 et p53 par immunofluorescence. Puis, la caractérisation des cellules sénescents peut également s'effectuer par l'analyse de l'expression des gènes du SASP, comme IL6 (*Interleukin 6*), IL8⁷⁴ (*Interleukin 8*), IL1 α ¹⁷² (*Interleukin 1 alpha*), CXCL1¹⁷³ (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 1*), PAI-1¹⁷⁴ (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*), etc.

Enfin, les cellules sénescents présentent des changements dans leur métabolisme, qui demeure actif malgré l'arrêt du cycle cellulaire. Le métabolisme mitochondrial semble avoir un rôle important dans la sénescence cellulaire puisque plusieurs études montrent que les cellules sénescents présentent une augmentation de la quantité des mitochondries^{68, 175-177}. Toutefois, ces dernières possèdent des altérations dans leur structure et leur fonction¹⁷⁸. En effet, les cellules sénescents possèdent plusieurs marqueurs de dysfonction mitochondriale, tels qu'un déséquilibre dans le potentiel de la membrane mitochondriale, une plus forte génération d'espèces réactives d'oxygène^{68, 179, 180} ainsi qu'une augmentation des événements de fission et de fusion entre les mitochondries^{181, 182}.

1.2.4. Régulation protéique de la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire est finement régulée par des mécanismes transcriptionnels, mais pas uniquement. Le contrôle de la synthèse et de la dégradation de protéines joue un rôle essentiel pour le processus de sénescence et ajoute un niveau supplémentaire de complexité à la régulation de celui-ci. Les mécanismes de régulation protéique commencent pendant la biogenèse de protéines.

Ce processus implique les ribosomes et les facteurs de traduction, qui coopèrent pour effectuer une traduction fidèle de l'information génétique afin de produire des chaînes polypeptidiques fonctionnelles. De plus, pendant ce processus, les molécules d'ARN messenger (ARNm) qui pourraient donner lieu à des protéines altérées sont reconnues et éliminées par des systèmes de surveillance. Les protéines nouvellement créées interagissent ensuite avec des chaperonnes moléculaires, qui contribuent à leur repliement approprié. La fonction des chaperonnes est spécialement importante, car elles empêchent l'agrégation des chaînes peptidiques. Ainsi, les cellules expriment constitutivement un ensemble de chaperonnes afin de limiter l'accumulation de protéines mal-conformées. Néanmoins, les cellules sont constamment susceptibles de subir des stimuli stressants qui pourraient compromettre la structure et la fonction des protéines. Les protéines qui deviennent défailtantes doivent donc être supprimées par les systèmes de dégradation protéique^{183, 184}. Tous les mécanismes ci-mentionnés présentent des altérations dans les cellules sénescences¹⁸⁵⁻¹⁹⁰.

La sénescence cellulaire est caractérisée par des altérations dans les processus de synthèse protéique¹⁸⁸. Ces derniers dépendent fortement de la régulation de la production des ribosomes. La biogenèse de ces organelles est un processus très complexe qui implique plusieurs étapes de synthèse et de maturation des précurseurs des ARNr et leur subséquent assemblage avec les protéines ribosomiques¹⁹¹. La biogenèse des ribosomes, aussi nommée ribogénèse, a majoritairement lieu dans le nucléole, un compartiment localisé dans le noyau des cellules eucaryotes. Ce processus est souvent plus actif dans les situations où la synthèse protéique est élevée, comme chez les cellules cancéreuses¹⁹². D'un autre côté, les cellules sénescences présentent une diminution de l'activité de biogénèse des ribosomes, qui serait due à des défauts dans les voies de production et de maturation des ARNr¹⁶. Ce processus a été nommé SARD (*Senescence-Associated Ribosome biogenesis Defects*) et ses implications seront traitées plus en profondeur dans la section suivante. Malgré les défauts dans les voies de synthèse des ribosomes, les ribosomes des cellules sénescences semblent être plus efficaces et sont moins susceptibles d'ajouter des extensions d'acides aminés aux peptides en cours de synthèse¹⁹³, un processus connu comme trans-lecture traductionnelle, ou *readthrough*. De plus, certaines protéines impliquées dans le processus de traduction, comme eIF4B (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4B*), S6K1 (*Ribosomal Protein S6 Kinase 1*) ou eIF2a (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A*), semblent être induites ou activées pendant la sénescence cellulaire^{194, 195}. Or, plusieurs éléments de la voie de biogénèse

des ARNt¹⁹⁶ (ARN de transfert) ainsi que certains facteurs d'élongation de la traduction ont une expression réduite dans les cellules sénescents^{197, 198}.

Les effets des altérations mentionnées ci-dessus sur le taux de synthèse des protéines ne sont pas bien caractérisés. D'un côté, Su Wu et collègues ont montré une diminution de la synthèse globale des protéines dans un modèle d'OIS chez des fibroblastes sénescents de souris¹⁹⁹. Néanmoins, Young et collègues ont observé que les fibroblastes humains sénescents (également par OIS) contiennent plus de protéines et consomment plus d'acides aminés que leurs contreparties non-sénescents²⁰⁰. Dörr et collègues ont également noté des taux de synthèse protéique plus élevés dans un contexte de TIS²⁰¹. En outre, Takauji et collègues ont reporté que l'inhibition de la synthèse protéique empêche l'établissement de la TIS et retarde la mise en place de la sénescence replicative²⁰². Dans notre laboratoire, nous n'avons pas trouvé de différences significatives parmi les taux de traduction globale des cellules sénescents et proliférantes¹⁹³. Or, l'augmentation de la synthèse de certaines protéines lors du processus de sénescence, comme les facteurs du SASP, a bien été caractérisée⁷⁴.

Par ailleurs, les différents stress subis par les cellules sénescents ainsi que la forte synthèse de facteurs sécrétés par le SASP les rendent plus susceptibles d'accumuler des protéines mal repliées, ce qui déclenche un état de stress protéique^{189, 203}. Ainsi, les acteurs de la voie contrôlant le stress protéotoxique UPR (*Unfolded Protein Response*) sont souvent induits dans les cellules sénescents¹⁸⁹. La voie d'UPR contribue donc au contrôle qualité du protéome et ainsi, à l'homéostasie protéique. Les trois branches de l'UPR semblent avoir un rôle dans la sénescence et peuvent être activées selon le type de sénescence ou le contexte cellulaire^{189, 203}. En effet, plusieurs marqueurs de l'UPR sont directement impliqués dans la mise en place de la sénescence cellulaire, comme les senseurs de stress protéique ATF6^{204, 205} (*Activating Transcription Factor 6*) et IRE1²⁰⁶ (*Inositol-Requiring Enzyme 1*). Les cellules sénescents présentent également une augmentation de la taille du réticulum endoplasmique²⁰⁷ et de l'expression de plusieurs de ses chaperonnes associées²⁰⁸.

Enfin, les processus de dégradation des protéines constituent la dernière phase de régulation protéique. La dégradation protéique est un processus finement régulé et essentiel pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, puisqu'il permet d'éliminer les protéines défectueuses ou celles qui ont déjà accompli leurs fonctions. Les systèmes de dégradation protéique permettent également le

recyclage des acides aminés des protéines dégradées¹⁸³. Pendant la sénescence cellulaire, il existe une forte dégradation protéique globale et spécifique²⁰⁹. Notamment, la sénescence induite par l'oncogène Ras et la sénescence replicative sont caractérisées par un profil de dégradation protéique sélective qui est nommé SAPD (*Senescence-Associated Protein Degradation*)^{209, 210}. La dégradation de protéines chez les mammifères est menée à terme par l'entremise de deux processus différents : l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome¹⁸³. Ces deux systèmes sont très actifs dans les cellules sénescents²⁰⁹ et ils garantissent la gestion du stress protéique ainsi que la disponibilité d'acides aminés pour les processus de synthèse protéique. Étant donné leur importance pour cette thèse, les processus de dégradation protéique et le SAPD seront abordés ultérieurement.

1.3. Les protéines ribosomiques et le cycle cellulaire

1.3.1. Les défauts de la biogenèse des ribosomes associés à la sénescence

La biogenèse des ribosomes, ou ribogenèse, est un processus très complexe qui nécessite l'action coordonnée d'une centaine d'effecteurs différents. Plus précisément, il requiert l'action des trois ARN polymérases ainsi qu'environ 200 facteurs d'assemblage ribosomiques et 200 petits ARN nucléolaires (ARNsno) différents. De plus, il s'agit d'un des processus cellulaires les plus exigeants en termes de consommation énergétique. La biogenèse des ribosomes est donc très bien coordonnée afin d'assurer la production des quantités appropriées de chaque composant du ribosome à des moments précis. Par ailleurs, la production de nouveaux ribosomes est étroitement liée à la croissance et la division cellulaire¹⁹¹.

Les ribosomes des mammifères sont de grands complexes ribonucléoprotéiques composés de deux sous-unités : la sous-unité 40S et la sous-unité 60S. Ces dernières sont elles-mêmes composées d'ARNr et de protéines ribosomiques qui interagissent et forment des ribonucléoprotéines. Chez les organismes eucaryotes, la sous-unité 40S est constituée par l'ARNr 18S et des protéines nommées RPS (*Ribosomal Protein Small subunit*). Il existe 33 protéines différentes appartenant à cette famille chez les eucaryotes. D'un autre côté, la sous-unité 60S a une plus grande taille et contient les ARNr 28S, 5.8S et 5S ainsi que les protéines RPL (*Ribosomal Protein Large subunit*), famille contenant 42 membres différents. Il y a environ 300 copies de gènes codant pour des ARNr chez l'humain qui sont organisés en groupes de répétitions et répartis sur des chromosomes différents²¹¹. Pendant la biogenèse des ribosomes, les ARNr vont subir une série d'étapes séquentielles de modifications, clivages et pliages avant d'être assemblés aux protéines ribosomiques. Le processus pourrait donc se diviser en cinq étapes différentes : la synthèse des ARN pré-ribosomiques (pré-ARNr) et des protéines ribosomiques, le clivage endo- et exonucléolytique des pré-ARNr, l'ajout des modifications aux pré-ARNr suivi du repliement des pré-ARNr, pour ainsi procéder à l'assemblage des pré-ARNr avec les protéines ribosomiques et enfin, le transport des pré-ribosomes au cytoplasme²¹². La biogenèse des ribosomes a donc lieu dans le nucléole, dans le noyau et dans le cytoplasme.

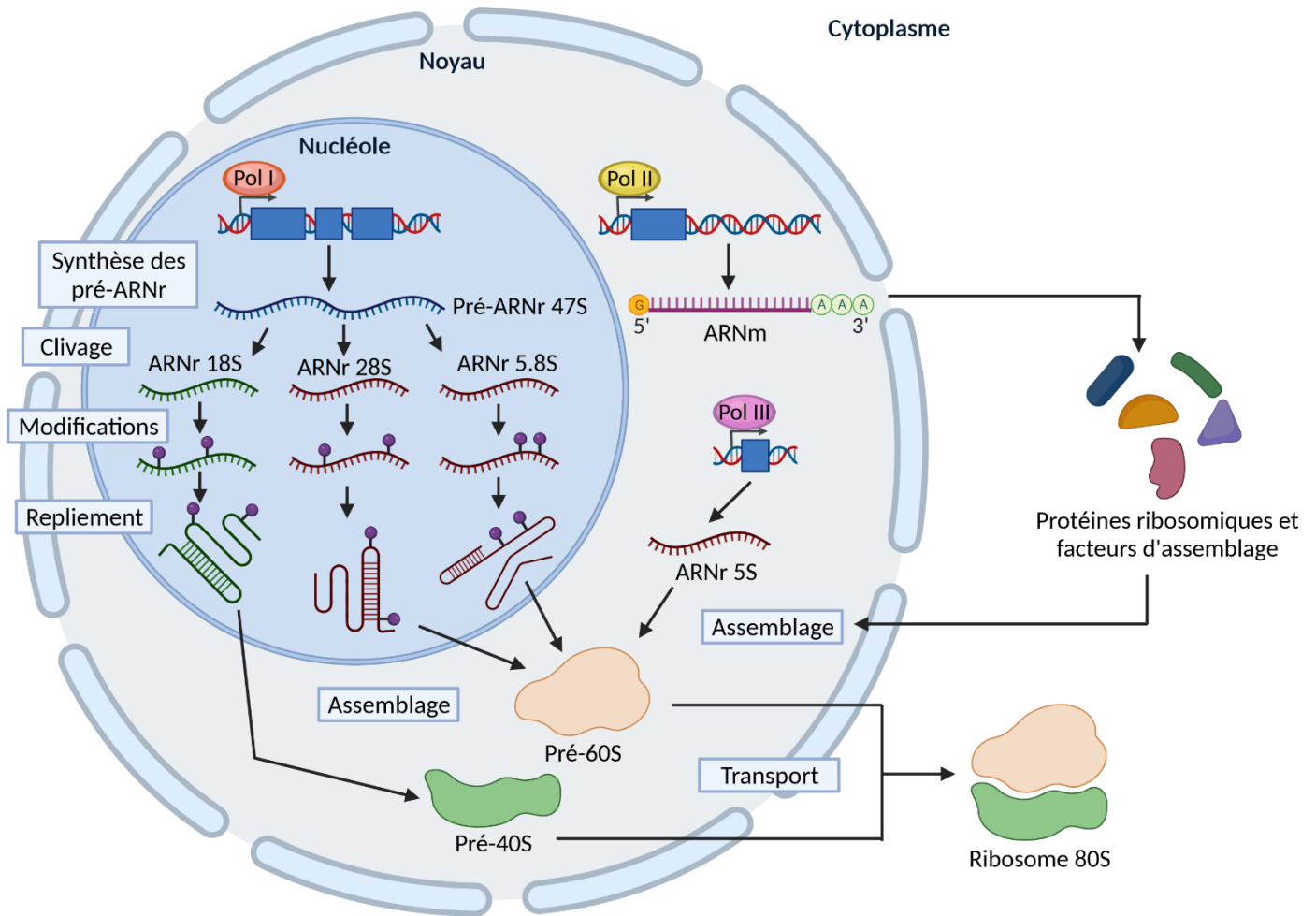


Figure 1.7 : La biogenèse des ribosomes chez les cellules eucaryotes

La biogenèse des ribosomes commence par la transcription des différents composants qui sont impliqués dans ce processus, ce qui implique les trois ARN polymérases (Pol I-Pol III). L'ARN polymérase I (Pol I) transcrit un précurseur nommé pré-ARNr 47S, qui subira plusieurs étapes de clivage et des modifications afin de produire les ARNr 18S, 28S et 5.8S. Ces ARNr seront transportés au nucléoplasme afin d'être incorporés aux sous-unités ribosomiques pré-40S (vert) et pré-60S (orange). D'un autre côté, l'ARN polymérase III (Pol III) transcrit l'ARNr 5S dans le nucléoplasme. Ce dernier sera ensuite incorporé à la sous-unité ribosomique pré-60S. En outre, les protéines ribosomiques, les facteurs d'assemblage et les ARNsno (pas représentés) sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II). Ces protéines sont synthétisées dans le cytoplasme et transportées vers le noyau afin de procéder à l'assemblage. Enfin, les sous-unités pré-40S et pré-60S sont exportées au cytoplasme, où d'autres structures seront formées (pas représenté). Figure adaptée de (213)

Lors de la sénescence cellulaire, les mécanismes de biogenèse des ribosomes sont altérés. En fait, le nucléole, où la plupart des étapes de la ribogenèse ont lieu, peut agir comme un senseur de stress²¹⁴. Il a été constaté que pendant des situations de stress cellulaire, le nucléole subit des changements dramatiques dans sa structure et son contenu qui inhibent sa fonction^{215, 216}. C'est le cas des cellules sénescents, qui présentent plusieurs marqueurs de stress nucléolaire, notamment la présence d'un seul et grand nucléole dans leur noyau^{217, 218} ainsi qu'une accumulation de la protéine ribosomique RPL29/eL29 (*Ribosomal Protein L29/Large ribosomal subunit protein eL29*) dans celui-ci, ce qui est un indicateur de défauts de la maturation des ARNr^{16, 219}. En effet, l'action de certains stimuli inducteurs de la sénescence produit des perturbations dans les voies de production des ARNr, ce qui produit une diminution drastique de leur synthèse. En conséquence, l'accumulation des ARNr précurseurs génère un stress nucléolaire et ainsi, une diminution dans la production de ribosomes. Ces altérations ont été désignées comme des défauts de la biogenèse des ribosomes associés à la sénescence ou SARD. Par ailleurs, certains facteurs protéiques de la ribogenèse, comme RSL1D1 (*Ribosomal L1 Domain-containing protein 1*), DDX21 (*DEAD-Box helicase 21*) et EBP2 (*EBNA1-Binding Protein 2*) sont activement dégradés dans les cellules sénescents²¹⁰ et leur perte d'expression suffit à induire la sénescence dans des modèles cellulaires primaires¹⁶. Cette dégradation sélective de protéines contribue à l'établissement des SARD et de la sénescence et sera davantage détaillée dans la section suivante.

Les défauts de la biogenèse des ribosomes associés à la sénescence permettent aux protéines ribosomiques et aux ribonucléoprotéines de s'accumuler dans le noyau et d'effectuer des fonctions extra-ribosomiques²²⁰. Effectivement, certaines protéines ribosomiques peuvent exercer des fonctions détournées de la ribogenèse et de la traduction et avoir un rôle dans la progression du cycle cellulaire. Elles peuvent alors communiquer le stress nucléolaire à la cellule en favorisant l'activation des voies suppressives p53-p21^{CIP1} et p16^{INK4a}-RB^{14, 192}.

1.3.2. Protéines ribosomiques et leurs rôles dans le cycle cellulaire

Les protéines ribosomiques ont un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire. Traditionnellement, l'implication de ces protéines dans les processus de prolifération et de croissance a été associée à leurs fonctions structurales au sein du ribosome. Par exemple, la perte de fonction de certains gènes codant des protéines ribosomiques, comme RPL29/eL29²²¹ ou RPS6/eS6 (*Ribosomal Protein S6/Small ribosome subunit protein eS6*)²²² réduit la capacité de

prolifération dans différents contextes. Ceci a été attribué au fait que la perte de certaines protéines ribosomiques pourrait affecter le bon assemblage des ribosomes, ce qui renforcerait le rôle clé de la biogenèse de ribosomes dans la prolifération cellulaire.

Cependant, plusieurs protéines ribosomiques ont des fonctions pro- ou antiprolifératives qui sont indépendantes de leur rôle structural. Tel que décrit plus haut, les protéines ribosomiques peuvent s'accumuler hors du ribosome suivant un stress nucléolaire. En conséquence, ces protéines peuvent effectuer des fonctions détournées de leur rôle structural dans les ribosomes²²⁰. Par exemple, certaines protéines ribosomiques spécifiques peuvent contribuer à la tumorigénèse^{223, 224} et ont une expression accrue dans plusieurs types de cancers²²⁵⁻²²⁹. Or, les mutations ou les délétions de gènes codant pour des protéines ribosomiques sont assez fréquentes dans les cancers humains²³⁰. Ceci suggère une implication de plusieurs protéines ribosomiques dans la suppression tumorale¹⁹². Effectivement, certaines protéines ribosomiques ont été associées à l'activation de la voie p53-p21^{CIP1}²³¹⁻²⁴⁰, ce qui permet dès lors de déclencher des réponses suppressives comme l'arrêt du cycle cellulaire ou encore l'apoptose en réponse au stress nucléolaire²⁴¹. Les protéines ribosomiques peuvent réguler l'activité de p53 de plusieurs manières différentes soit par leur capacité d'inhiber son E3 ubiquitine ligase, MDM2/HDM2^{235, 238-240, 242, 243} ou bien en favorisant sa traduction par interaction avec son ARNm^{244, 245}. Les protéines ribosomiques peuvent également affecter le cycle cellulaire de manière indépendante de p53²⁴⁶⁻²⁴⁸. Notamment, lors de l'induction de la sénescence par la déplétion du facteur de la ribogenèse RSL1D1, la protéine ribosomique RPS14/uS11 (*Ribosomal Protein S14/Small ribosome subunit protein uS11*) peut s'accumuler en dehors des ribosomes et inhiber CDK4, contribuant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire¹⁶. De plus, l'expression ectopique de RPS14/uS11 induit une sénescence dépendante de l'activation de RB et indépendante de la voie p53-p21^{CIP1}¹⁶. Par ailleurs, d'autres protéines ribosomiques ont montré des effets sur l'activité des CDK^{220, 249}. Le rôle d'une autre protéine ribosomique, RPL22/eL22 (*Ribosomal Protein L22/Large ribosomal subunit protein eL22*), dans la régulation du cycle cellulaire a été identifié durant ce doctorat. Ses fonctions principales seront détaillées dans le paragraphe suivant.

1.3.3. La protéine ribosomique RPL22/eL22

RPL22/eL22 (désormais, RPL22) est une protéine de liaison des ARN qui fait partie de la sous-unité ribosomique 60S²⁵⁰⁻²⁵². Dans une cellule, RPL22 se trouve au sein des ribosomes ainsi

que dans le nucléole²⁵². Cependant, lors d'une infection virale, RPL22 migre vers le nucléoplasme²⁵¹. Le rôle de RPL22 n'est pas bien caractérisé et son activité n'est pas essentielle pour l'assemblage des ribosomes ou la synthèse protéique²⁵⁰. Néanmoins, RPL22 peut exercer des fonctions extra-ribosomiques et jouer un rôle dans la formation de complexes ribonucléoprotéiques (RNP)^{251, 253, 254}. Notamment, plusieurs études ont montré que RPL22 peut interagir avec des ARN et des protéines virales^{251, 254, 255}. Ceci suggère un rôle particulier de RPL22 dans l'infection virale. En outre, RPL22 peut également interagir avec le complexe de l'enzyme télomérase²⁵⁶ et avec l'histone H1²⁵⁷, mais ses fonctions en association avec ces protéines restent inconnues.

L'inactivation du gène *Rpl22* n'est pas létale chez la souris, contrairement à la plupart des gènes codant pour des protéines ribosomiques^{258, 259}. L'étude publiée par O'Leary et collègues a montré que ceci pourrait être dû à l'effet compensatoire d'une protéine paralogue à RPL22, nommée Rpl22-like 1 (Rpl2211)²⁶⁰. Les souris *Rpl22* *-/-* sont viables et fertiles. Toutefois, ces souris présentent un blocage du développement de la lignée $\alpha\beta$ des lymphocytes T dépendant de la voie p53^{261, 262}. L'expression de RPL22 est également importante pour le développement des lymphocytes B²⁶³. En outre, la perte de RPL22 rend les cellules progénitrices des lymphocytes T plus susceptibles à la transformation oncogénique et accélère le développement des lymphomes²⁶⁴, suggérant un rôle de RPL22 dans la suppression tumorale.

Le gène *RPL22* est muté ou inactivé dans plusieurs types de cancers^{230, 239, 265, 266}, notamment les leucémies lymphoblastiques aiguës à lymphocytes T²⁶⁴, les cancer colorectaux²⁶⁷, du sein²⁶⁸, endométriaux^{265, 267, 269}, pulmonaires²⁷⁰ et gastriques²⁷¹. En outre, la surexpression de RPL22 diminue la capacité de formation de colonies des cellules cancéreuses en culture de manière dépendante de la voie p53²³⁹. En fait, plusieurs études ont identifié que RPL22 peut moduler l'expression de p53^{239, 245, 261}. D'un côté, elle peut contribuer à l'activité du complexe formé par les protéines ribosomiques RPL5/uL18 (*Ribosomal Protein L5/Large ribosomal subunit protein uL18*) et RPL11/uL5 (*Ribosomal Protein L11/Large ribosomal subunit protein uL5*), dont l'activité sur la voie p53 a déjà été caractérisée^{238, 240, 243}. RPL22 peut également bloquer l'interaction entre MDM2/HDM2 et p53, ce qui produit la stabilisation de p53²³⁹. De plus, parmi tous les gènes codant des protéines ribosomiques, le gène *RPL22* est le plus inactivé chez des lignées cellulaires cancéreuses dans lesquelles p53 demeure fonctionnel²³⁰. Ceci suggère que l'inactivation de *RPL22* pourrait être une stratégie adoptée par certaines cellules cancéreuses afin de ne pas déclencher des

réponses antitumorales de p53²³⁹. D'un autre côté, il a également été reporté que la protéine RPL22 peut interagir avec l'ARNm de p53 afin d'inhiber sa traduction lors du développement des lymphocytes²⁴⁵. RPL22 pourrait alors affecter l'expression de p53 de différentes manières selon la situation.

Le premier article présenté dans cette thèse porte sur le rôle de RPL22 dans la régulation du cycle cellulaire et la sénescence. Dans le chapitre 2, nous montrons les résultats obtenus décrivant le mécanisme engagé par RPL22 afin de réguler le cycle cellulaire et les implications que ceci pourrait avoir pour la suppression tumorale.

1.4. Dégradation de protéines

L'ensemble des protéines d'une cellule à un moment donné est défini comme le protéome cellulaire. Étant donné l'importance des fonctions menées effectuées par les protéines, l'état du protéome a un impact direct sur la viabilité des cellules. En conséquence, les cellules possèdent des programmes qui contribuent à maintenir le protéome dans un état adéquat pour la correcte mise en place des fonctions cellulaires²⁷². Parmi ces programmes, les voies de dégradation protéique jouent un rôle clé dans la régulation du protéome cellulaire¹⁸³. La dégradation de protéines est, en effet, un moyen de contrôler finement les concentrations de certaines protéines, de participer au contrôle de la qualité protéique et ainsi de réguler des fonctions essentielles pour la viabilité cellulaire¹⁸³. Ce processus est finement régulé selon le contexte cellulaire. De leur côté, les cellules sénescences présentent une forte activité de dégradation protéique, globale et spécifique^{209, 210}, qui sera traitée plus en profondeur dans la prochaine section.

1.4.1. Dégradation de protéines associée à la sénescence

Les cellules sénescences présentent des altérations dans leur protéome, qui sont souvent une conséquence des changements dans leurs voies de signalisation¹⁵⁴. En effet, l'activation constitutive de certaines voies en réponse à des facteurs de croissance constitue l'un des mécanismes capables d'induire la sénescence cellulaire⁶³. Parmi ces voies de signalisation intracellulaire, la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) joue un rôle essentiel dans l'établissement et le maintien du phénotype sénescence²⁷³. Ces dernières années, le laboratoire du Dr. Ferbeyre a mis en évidence l'existence d'une dégradation sélective de protéines associée à l'activité des MAPK ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated protein Kinases 1 and 2*) dans la sénescence cellulaire^{209, 210}, un processus qui sera traité dans cette section.

La famille des MAPK contient 14 kinases²⁷⁴, parmi lesquelles les plus caractérisées sont les kinases ERK1/2, p38 et JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*). Notamment, les kinases ERK1 et ERK2 contrôlent de manière directe et indirecte l'activité de plusieurs protéines associées à la sénescence, comme MYC, Sprouty, RSK (*Ribosomal S6 Kinase*), ETS (*Erythroblast Transformation Specific*), etc²⁷³. Les kinases ERK1/2 font partie de la voie de l'oncogène RAS. Cependant, l'activité de RAS n'est pas restreinte à cette voie de signalisation et cette protéine joue également un rôle dans d'autres voies, comme la voie PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*) et la voie des kinases RAL (*Ras-Related protein*).

La cascade de signalisation de RAS-ERK1/2 commence par l'activation de récepteurs membranaires RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*) après leur stimulation avec des facteurs de croissance ou des cytokines. L'interaction de ces récepteurs avec leurs ligands produit le recrutement de protéines adaptatrices ainsi que des facteurs d'échange, comme les protéines GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*), qui activent la GTPase RAS en échangeant une molécule de GDP (guanosine-5'-diphosphate) par une de GTP (guanosine-5'-triphosphate). L'activation de RAS produit le recrutement de la kinase RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) au niveau de la membrane plasmique, où elle subit un processus d'activation qui implique des phosphorylations ainsi que la formation d'homo- ou d'hétérodimères. Trois isoformes sont connues pour RAF: A-RAF, B-RAF et C-RAF. Les kinases RAF activent ensuite les kinases MEK1/2 (*MAPK/ERK Kinases 1 and 2*) qui régulent très spécifiquement l'activation des kinases ERK1/2 par double phosphorylation. Une fois activées, les kinases ERK1/2 peuvent phosphoryler une centaine de substrats cytoplasmiques et nucléaires en aval^{275, 276}. La signalisation d'ERK1/2 peut donc affecter une variété de processus différents, notamment la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose²⁷⁷.

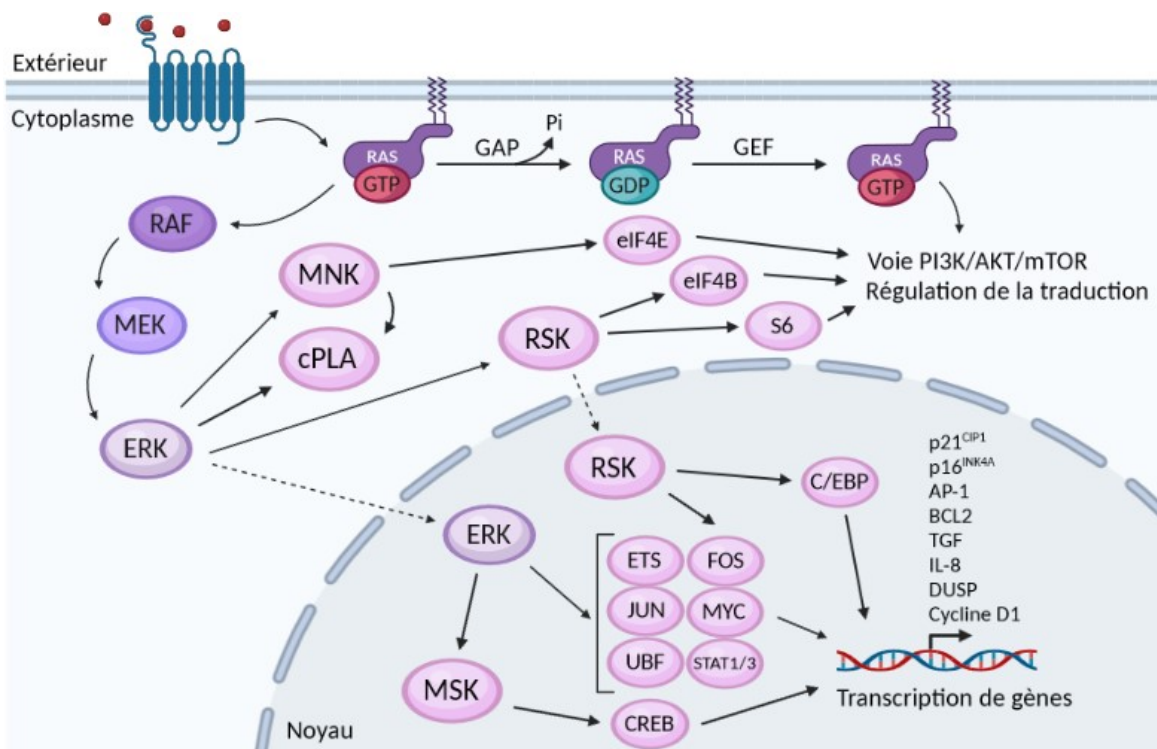


Figure 1.8 : La voie de signalisation ERK/MAPK

Les flèches discontinues indiquent un changement de localisation. Figure originale.

Étant donné l'importance de la voie RAS-ERK1/2 pour de nombreux processus cellulaires, son activation et son niveau d'induction sont étroitement régulés. En fait, l'intensité de la signalisation d'ERK1/2 peut déterminer le type de réponse cellulaire aux signaux mitogéniques²⁷⁸. Les kinases ERK1/2 ont traditionnellement été considérées comme pro-oncogéniques^{276, 279}. En effet, une signalisation d'ERK1/2 modérée est associée à des processus oncogéniques et à la prolifération des cellules au sein d'une tumeur. Cependant, nous avons observé que la sénescence répllicative et la sénescence induite par l'oncogène RAS nécessitent une hyperactivation de la voie d'ERK1/2 pour leur mise en place. Dans ce contexte, l'hyper-signalisation d'ERK1/2 déclenche un programme de dégradation sélective de protéines qui est nécessaire à l'établissement du phénotype sénescence. Ce processus de dégradation de protéines spécifiques lors de la sénescence cellulaire est connu comme SAPD (*Senescence-Associated Protein Degradation*)^{209, 210}. L'hyperactivation de la voie ERK1/2 semble donc être associée au processus de sénescence cellulaire et à la suppression tumorale^{210, 278}. En réponse à des stimuli pro-oncogéniques, le SAPD promouvoirait la suppression tumorale en favorisant la mise en place de la sénescence suivant l'expression d'un oncogène^{209, 278, 280}. Ceci suggère que les cellules cancéreuses pourraient posséder des mécanismes afin de maintenir la signalisation d'ERK1/2 dans des niveaux permissifs pour la tumorigénèse ou encore, afin de contourner la suppression tumorale déclenchée par le SAPD²⁷⁸.

Nous avons observé que plusieurs cibles du SAPD font partie des processus altérés lors de la sénescence cellulaire comme la progression du cycle cellulaire (MCM2, MYC, JUN), l'intégrité mitochondriale (ATP5B, STAT3, HSP70), la DDR (CCDC6, TOP2) ou la biogenèse des ribosomes (RSL1D1, NOL6, NOC2L)^{209, 210}. La perte de ces effecteurs lors de la sénescence cellulaire pourrait donc contribuer à certaines caractéristiques de ce phénotype ainsi qu'à son établissement et/ou son maintien. De plus, la perte d'expression de certains de ces effecteurs est suffisante pour induire la sénescence dans des cellules primaires^{16, 210}, ce qui dénote l'importance du SAPD. Le SAPD pourrait également affecter le processus de sénescence d'autres manières, comme par exemple, en favorisant le recyclage des acides aminés et d'énergie pour la synthèse des protéines sécrétées du SASP²⁰⁹. Le SAPD est dépendant de l'activité du système ubiquitine-protéasome. Puisqu'une partie des travaux présentés dans cette thèse porte sur ce système de dégradation protéique, la prochaine section y sera consacrée.

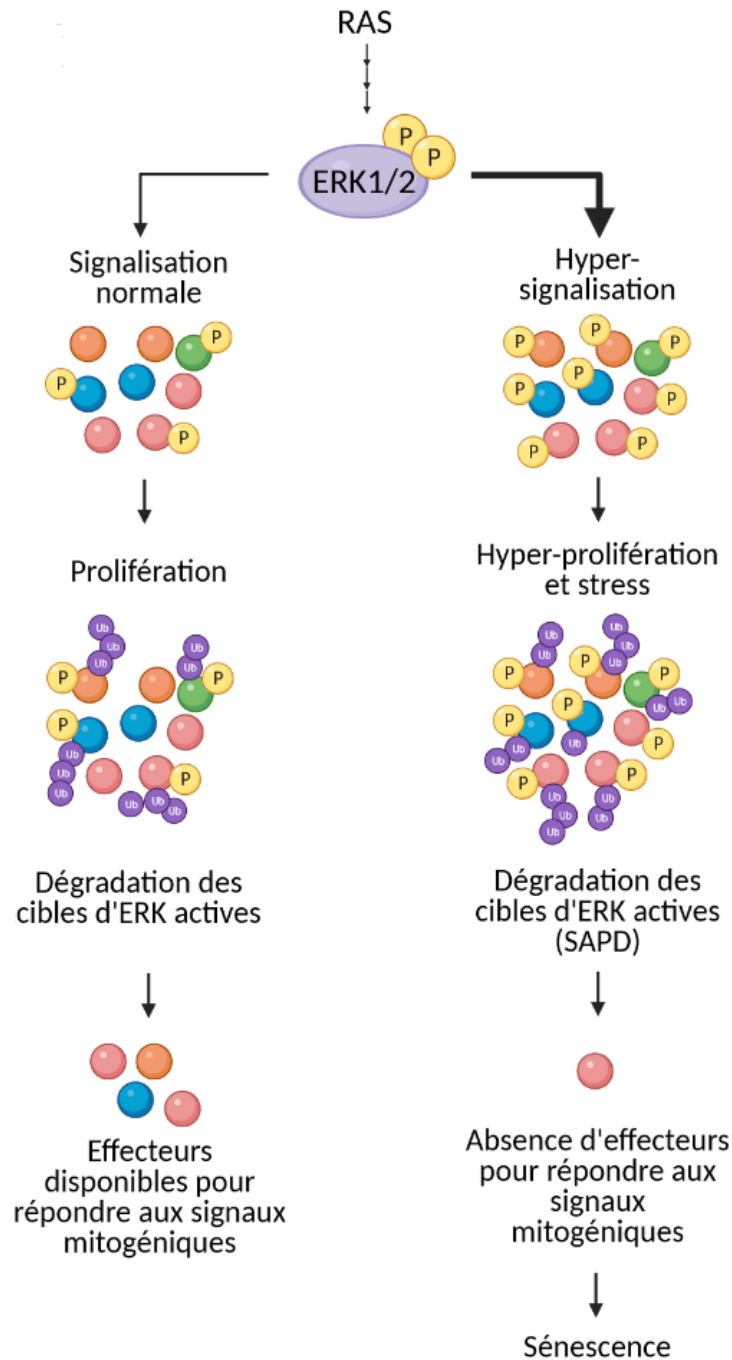


Figure 1.9 : Modèle de la dégradation sélective de protéines associée à la sénescence

Dans des conditions physiologiques, l'activation de la voie ERK/MAPK produit la phosphorylation d'une fraction des cibles d'ERK1/2. Cependant, dans des conditions de stress cellulaire, l'hyper-signalisation de la voie ERK/MAPK peut conduire (de manière directe ou indirecte) à la phosphorylation d'une plus grande proportion d'effecteurs d'ERK1/2. Les cibles d'ERK1/2 phosphorylées et activées peuvent donc promouvoir la prolifération cellulaire ainsi que d'autres processus (comme la différenciation cellulaire et la

survie). Ces effecteurs phosphorylés sont éventuellement reconnus et dégradés par le système ubiquitine-protéasome. La proportion d'effecteurs disponibles après cette dégradation déterminera si la cellule est prête à répondre à un nouveau cycle de signalisation pro-proliférative. Dans le cas de l'hyper-signalisation, l'absence d'effecteurs pour répondre aux signaux mitogéniques serait à l'origine de la sénescence cellulaire. Figure adaptée de (278). (Ub, ubiquitine; P, phosphorylation)

1.4.2. Le système ubiquitine-protéasome

Les cellules des mammifères possèdent deux systèmes principaux de dégradation protéique: le système ubiquitine-protéasome et le système autophagie-lysosome. L'importance de ces deux systèmes a été soulignée par deux prix Nobel : en 2004, les scientifiques Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose ont reçu le prix Nobel de Chimie pour la découverte de la dégradation de protéines par le système ubiquitine-protéasome²⁸¹. Plus récemment, en 2016, le biologiste Yoshinori Ohsumi emporte le prix Nobel de Médecine et Physiologie grâce à ses études sur les mécanismes d'autophagie²⁸². Ces deux systèmes agissent dans des contextes différents, mais ils sont interconnectés entre eux par plusieurs mécanismes afin de coordonner leurs actions dans le maintien de l'homéostasie cellulaire¹⁸³.

L'autophagie est un mécanisme de dégradation de protéines mais également d'autres composants cellulaires, qui est basé sur la formation de vésicules qui enferment les substrats à dégrader. Ce processus est crucial dans des situations de stress cellulaire comme l'hypoxie ou le manque de nutriments^{283, 284}. L'autophagie joue également un rôle important dans l'établissement de l'OIS²⁰⁰ et la TIS²⁸⁵ ainsi que dans l'atténuation du stress protéotoxique dû à la forte synthèse de protéines associée au SASP^{209, 286}. Néanmoins, la plupart des protéines sont dégradées par le système ubiquitine-protéasome¹⁸³. Les prochaines sections seront donc consacrées à ce système de dégradation protéique

Le système ubiquitine-protéasome constitue la voie principale de dégradation de protéines chez les cellules eucaryotes¹⁸³. Ce mécanisme est basé sur l'ubiquitination, une modification post-traductionnelle consistant en l'ajout d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine, une petite protéine composée de 76 acides aminés. L'ubiquitine est jointe par une liaison covalente sur les acides aminés lysine, arginine ou méthionine des protéines cibles par l'action d'une cascade enzymatique. Le processus d'ubiquitination est très versatile, puisque les substrats peuvent être modifiés par une seule molécule d'ubiquitine ou par l'ajout subséquente de plusieurs molécules d'ubiquitine les unes

sur les autres formant des chaînes de poly-ubiquitine. De plus, les chaînes d'ubiquitine peuvent avoir des structures différentes selon les résidus utilisés pour attacher les monomères²⁸⁷. C'est ainsi que le processus d'ubiquitination joue un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire, en plus d'être impliqué dans une multitude de processus autres que la dégradation protéique, comme la régulation de la transcription ou le transport membranaire²⁸⁸.

Étant donné l'importance de l'ubiquitination dans l'homéostasie, la machinerie cellulaire dispose de mécanismes pour assurer une fine régulation de ce processus. Notamment, l'ajout de molécules d'ubiquitine sur une protéine substrat est mené à terme par une cascade enzymatique organisée de manière hiérarchique. La présence de plusieurs étapes et la diversité des enzymes participant dans cette cascade enzymatique favorise une régulation minutieuse du processus d'ubiquitination²⁸⁹. Dans un premier temps, la molécule d'ubiquitine est conjuguée à une enzyme activatrice de l'ubiquitine ou E1, dont il existe seulement une ou deux différentes chez les cellules eucaryotes. Cette première étape est dépendante de la consommation d'ATP (adénosine triphosphate) dans le but de générer un lien thioester entre un acide aminé cystéine de l'enzyme E1 et le groupe carboxyle en C-terminal de l'ubiquitine²⁹⁰. L'ubiquitine devient active par la formation de ce lien thioester. Puis, le complexe E1-ubiquitine activée est reconnu par l'une des 40 enzymes de conjugaison différentes, également nommées E2. L'ubiquitine activée est ensuite transférée à l'une des cystéines du domaine catalytique de l'enzyme E2 par le biais d'une réaction de transthioylation sur le lien thioester préalablement formé. Dans certains cas, l'enzyme E2 peut catalyser directement la liaison finale entre l'ubiquitine et la protéine cible²⁹¹. Cependant, dans une majorité de cas, cette dernière étape nécessite l'intervention d'un troisième type d'enzyme: les E3 ubiquitine ligases. Ces dernières ciblent spécifiquement les protéines qui doivent être ubiquitinées et effectuent le transfert final de l'ubiquitine vers la protéine substrat. Ces enzymes sont donc essentielles pour la spécificité du processus d'ubiquitination et leurs mécanismes d'action seront décrits plus en détail dans la section suivante²⁹².

L'ajout d'une seule molécule d'ubiquitine sur les protéines substrats est connu sous le nom de mono-ubiquitination. Cependant, une fois liées aux substrats, les molécules d'ubiquitine peuvent lier successivement d'autres molécules d'ubiquitine afin de former des chaînes de poly-ubiquitine, processus connu comme poly-ubiquitination. Ces chaînes d'ubiquitine sont constituées par des liens iso-peptidiques entre le groupement ϵ -amino d'une des 7 lysines (K6, K11, K27, K29,

K33, K48 et K63) ou de la méthionine en N-terminal (M1) d'une molécule d'ubiquitine avec le groupement carboxyle en C-terminal de l'ubiquitine suivante. Ceci permet la formation de 8 types de liens différents. Les chaînes d'ubiquitine peuvent donc se classer en homotypiques, si les liens qui relient les molécules d'ubiquitine présentent la même structure ou en hétérotypiques, si les liens iso-peptidiques sont de différents types. Les chaînes hétérotypiques peuvent également posséder des ramifications, puisqu'une molécule d'ubiquitine peut former plus qu'un seul lien iso-peptidique. Si on tient en compte de toutes les possibilités, le nombre de chaînes d'ubiquitine différentes est très élevé. De plus, chaque type de chaîne régule des processus spécifiques et est associée à des conséquences fonctionnelles différentes²⁸⁷. Par exemple, les chaînes homotypiques avec des liaisons en K48 ou en K11 sont généralement associées à la dégradation des substrats dans le protéasome, tandis que les chaînes en K63 peuvent contribuer à leur dégradation par autophagie ainsi qu'au trafic intracellulaire. D'une autre part, la mono-ubiquitination de protéines peut conduire à leur dégradation mais aussi à des changements de leur localisation et/ou leur activité²⁸⁷. Dans certains cas, la formation de chaînes de multi-ubiquitine nécessite l'activité d'un autre type d'enzymes qui ont été désignées comme E4. Les enzymes E4 ont un rôle dans l'élongation des chaînes d'ubiquitine des protéines préalablement mono-ubiquitinées^{293, 294}. À ce jour, moins d'une dizaine de ces protéines ont été identifiées²⁹⁴. Les cellules possèdent également des enzymes capables de retirer les molécules d'ubiquitine de leurs substrats et se nomment déubiquitinases. Il y a environ une centaine de déubiquitinases différentes dans une cellule humaine²⁹⁵. En effet, le taux de dégradation d'une protéine spécifique dépend alors de la dynamique de voies d'ubiquitination et de dé-ubiquitination, qui dépendent elles-mêmes des conditions cellulaires dans un moment précis et d'une multitude de stimuli différents¹⁸³.

Les protéines ubiquitinées pour dégradation protéasomale sont ensuite transférées au protéasome 26S²⁸⁸. Ce complexe d'environ 2.5 MDa est très conservé en termes de structure et fonction. Par ailleurs, la dysfonction du protéasome est associée à des nombreuses pathologies²⁹⁶. Le protéasome est localisé dans le noyau et dans le cytoplasme de toutes les cellules de mammifère et contient une multitude de sous-unités protéiques essentielles pour son activité. Les protéasomes 26S sont principalement constitués par deux complexes protéiques différents : le complexe 20S catalytique ainsi que deux complexes 19S régulateurs à chaque extrémité de celui-ci. Le complexe 20S constitue le centre protéolytique du protéasome. Il a une forme tubulaire qui contient à l'intérieur les sites protéolytiques, capables de cliver la plupart des polypeptides. Ces régions

catalytiques présentent des activités protéolytiques telles que celles des caspases, trypsine ou chymotrypsine²⁹⁷. De plus, dans certains cas, d'autres sous-unités spécialisées peuvent s'ajouter au protéasome. Par exemple, l'immuno-protéasome est une variante du protéasome assemblée en réponse à de signaux pro-inflammatoires ou lors de l'infection virale. Il est également exprimé de manière constitutive dans les cellules hématopoïétiques. L'immuno-protéasome a la particularité de posséder des sous-unités catalytiques légèrement différentes, qui favorisent la génération de peptides pour la présentation d'antigènes²⁹⁸.

D'un autre côté, les complexes régulateurs 19S sont impliqués dans la détection et le dépliage de protéines ubiquitinées ainsi que leur translocation au complexe 20S pour leur dégradation. L'activité des complexes 19S ainsi que leurs liaisons au complexe 20S requièrent de l'ATP. La reconnaissance et la sélection des substrats se fait à travers des domaines d'interaction avec l'ubiquitine (UIM) présents dans les complexes 19S. Les polypeptides sont ensuite séparés de leurs chaînes d'ubiquitine par l'activité des déubiquitinases associées au protéasome et dépliés afin de pouvoir accéder un par un au complexe 20S, où ils seront hydrolysés. Finalement, le protéasome libère des peptides d'entre 6 et 10 acides aminés de longueur qui seront rapidement éliminés par l'action des aminopeptidases et des endopeptidases du cytoplasme¹⁸³.

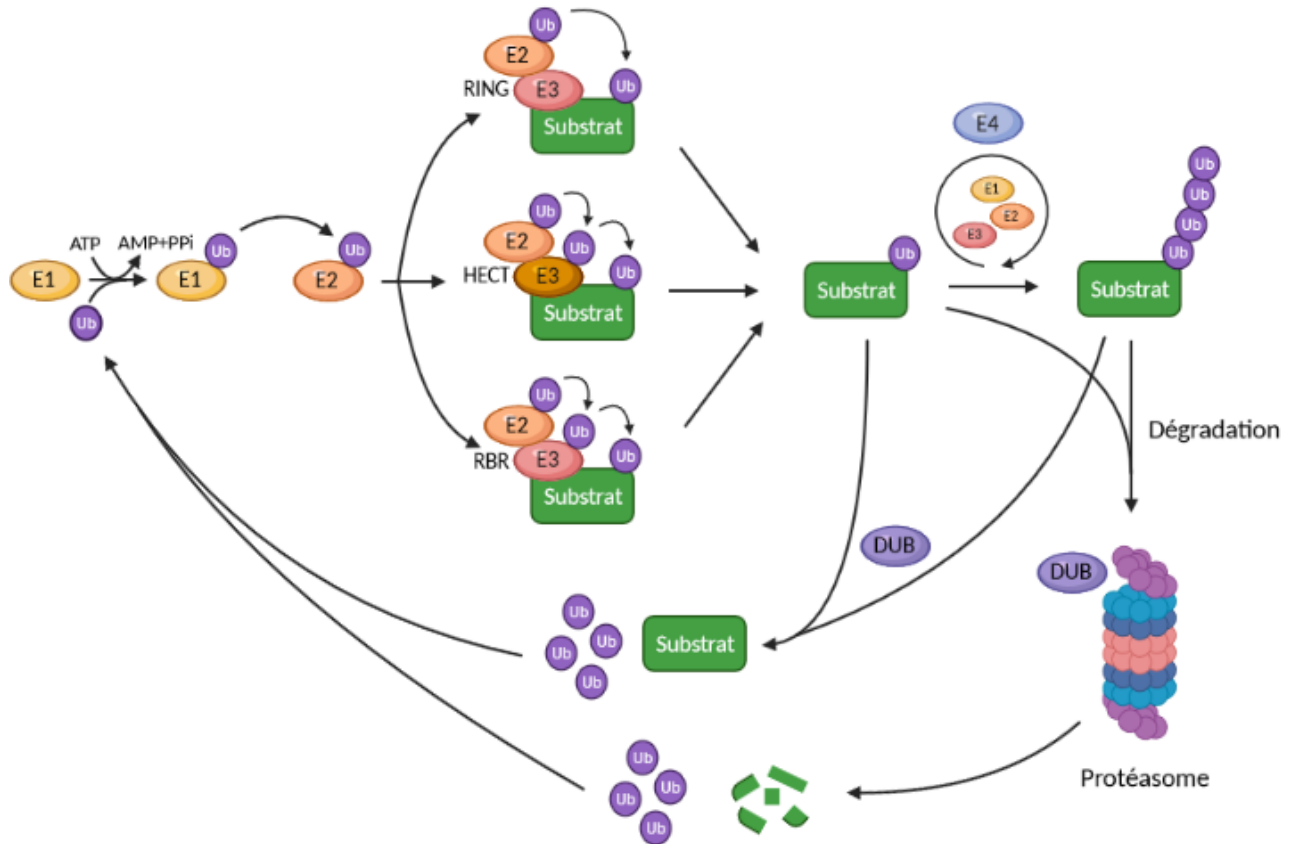


Figure 1.10 : Le système ubiquitine protéasome et les types d'E3 ubiquitine ligases

Le processus d'ubiquitination commence par l'activation de l'ubiquitine, réaction effectuée par une enzyme E1. Ensuite, l'ubiquitine est transférée à une enzyme E2, qui va généralement interagir avec une E3 ubiquitine ligase. Les E3 ubiquitine ligases catalysent le transfert de l'ubiquitine vers la protéine substrat. Les E3 ligases de type RING (*Really Interesting New Gene*) favorisent le transfert direct de l'ubiquitine de l'enzyme E2 vers le substrat, tandis que celles de type HECT (*Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus*) et RBR (*RING-IBR-RING*) agissent en captant physiquement l'ubiquitine pour ensuite la transférer vers la cible d'ubiquitination. Ces dernières présentent un mécanisme d'action similaire mais des domaines protéiques différents. Certaines protéines mono-ubiquitinylées peuvent être ciblées pour leur dégradation. Cependant, la plupart des substrats ont besoin d'être poly-ubiquitinés afin d'être reconnus par le protéasome. L'élongation des chaînes d'ubiquitine peut s'effectuer à partir de plusieurs cycles d'ubiquitination et/ou par l'action des enzymes E4. Enfin, les protéines ubiquitinées sont transférées au protéasome, où elles sont dégradées. Les chaînes d'ubiquitine sont retirées par l'action des déubiquitinases, ce qui permet le recyclage des molécules d'ubiquitine pour les cycles d'ubiquitination subséquents. Figure adaptée de (299). (Ub, ubiquitine)

1.4.3. E3 ubiquitine ligases

Les E3 ubiquitine ligases sont les enzymes responsables d'effectuer la dernière étape du processus d'ubiquitination, qui culmine avec la formation d'une liaison iso-peptidique entre le groupe carboxyle de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et le groupe amine d'une des lysines de la protéine substrat. Un substrat peut être ciblé par plusieurs E3 ubiquitine ligases différentes et chaque E3 ubiquitine ligase peut également cibler plusieurs substrats. Il y a plus de 700 gènes qui codent pour des E3 ubiquitine ligases dans le génome d'une cellule de mammifère. L'hétérogénéité et diversité de ces enzymes constitue un mécanisme essentiel pour la régulation de l'ubiquitination et la spécificité du processus²⁹². De plus, l'activité des E3 ubiquitine ligases joue un rôle direct sur une variété de processus cellulaires. Quelques exemples incluent l'apoptose³⁰⁰⁻³⁰³, la sénescence^{304, 305}, la progression du cycle cellulaire³⁰⁶⁻³⁰⁹, l'immunité³¹⁰⁻³¹², la formation de métastases³¹³⁻³¹⁶, etc. De plus, une multitude d'études ont montré que les E3 ubiquitine ligases ont un rôle important dans les processus oncogéniques chez l'humain par la régulation de proto-oncogènes ou de suppresseurs de tumeur³¹⁶⁻³¹⁸.

L'importance des fonctions des E3 ubiquitine ligases repose sur leur capacité à reconnaître et à distinguer leurs substrats selon le contexte cellulaire³¹⁹. Pour ce faire, les E3 ligases ciblent des séquences courtes mais très spécifiques sur leurs substrats, qui ont été désignées comme « dégrons ». Par ailleurs, les modifications post-traductionnelles des dégrons jouent un rôle essentiel dans la synchronisation de l'interaction E3 ligase-substrat^{292, 319, 320}. En effet, les processus de phosphorylation et d'ubiquitination sont souvent associés entre eux afin d'assurer une régulation adéquate de la dégradation des substrats. De plus, les dégrons peuvent contenir plusieurs sites de phosphorylation, qui peuvent être modifiés par la même kinase ou par des kinases différentes. En outre, la phosphorylation des sites est souvent effectuée de manière séquentielle, ce qui implique qu'une ou plusieurs phosphorylations sont dépendantes d'une première. Néanmoins, les dégrons ne sont pas toujours nécessaires et d'autres caractéristiques d'un peptide peuvent être reconnues par les E3 ubiquitine ligases³¹⁹. Par exemple, dans la voie de la règle N-terminale (*N-end rule*) la demi-vie d'une protéine est déterminée par l'acide aminé présent à son extrémité N-terminale, qui est reconnu par des E3 ubiquitine ligases de type N-recogin^{321, 322}.

Les E3 ubiquitine ligases peuvent intervenir dans le processus d'ubiquitination de plusieurs manières différentes et ces dernières varient en fonction du type d'E3 ubiquitine ligase impliquée.

Certaines E3 ubiquitine ligases peuvent être sous la forme d'un unique polypeptide³²³⁻³²⁶. Cependant, la plupart des E3 ubiquitine ligases nécessitent des protéines accessoires et agissent sous la forme de complexes multiprotéiques^{320, 327-329}. Les enzymes E3 peuvent être classifiées selon leurs mécanismes catalytiques. Nous pouvons donc distinguer trois familles principales d'E3 ubiquitine ligases : la famille de ligases de type HECT (*Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus*), les E3 ubiquitine ligases de type RBR (*RING-IBR-RING*) et les ligases de type RING (*Really Interesting New Gene*).

Les E3 ligases de type HECT agissent en captant physiquement l'ubiquitine pour ensuite la transférer vers l'une des lysines de la protéine cible³³⁰. En effet, l'ubiquitine est attachée de manière covalente à un résidu cystéine du site actif de la ligase avant la formation d'un lien iso-peptidique entre l'ubiquitine et le substrat. Il y a 28 ligases différentes du type HECT et certaines parmi elles peuvent se classer en deux classes selon l'organisation de leurs domaines protéiques en N-terminale: la famille de ligases NEDD4 (*Neuronal precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated 4*), qui contient 9 membres et la famille HERC (*HECT and RCC1-like domain-containing*), avec 6. Les 13 ligases HECT restantes ne partagent pas les mêmes domaines et n'ont pas encore été classifiées. L'une des particularités des ligases de type HECT semble être leur capacité à produire des chaînes de poly-ubiquitine spécifiques. Par exemple, les ligases de la famille NEDD4 produisent principalement des chaînes d'ubiquitine liées par leurs lysines en position 63 (K63), tandis que l'E3 ligase E6AP (*E6-Associated Protein*) produit uniquement des chaînes en K48. Les E3 ligases HECT sont régulées par des changements entre leurs conformations active et inactive ainsi que par la présence de protéines adaptatrices³³¹.

Puis, les enzymes E3 de type RBR, aussi nommées RING/HECT, ont la particularité de posséder des domaines RING (comme les ligases de type RING) mais d'agir de manière similaire aux ligases de type HECT. Plus précisément, elles présentent deux domaines RING : un premier (RING1) qui lie l'ensemble E2-ubiquitine et un deuxième (RING2) qui capte l'ubiquitine par un lien thioester, pour enfin la transférer à la protéine substrat. Ces deux motifs RING sont séparés par un domaine IBR (*In-Between-RING*) ainsi que par des régions adjacentes relativement flexibles qui permettent l'adoption de plusieurs conformations tridimensionnelles³³². De nos jours, seulement 14 E3 ligases du type RBR sont connues chez l'humain, la plus caractérisée étant la ligase parkin^{333, 334}.

Néanmoins, la grande majorité d'E3 ubiquitine ligases appartient à la superfamille des ligases de type RING³³⁵. Ces E3 ubiquitine ligases contiennent des motifs RING-finger, des domaines protéiques ayant une structure très conservée contenant deux ions zinc coordonnés. Ces motifs rendent possible le transfert de l'ubiquitine directement de l'enzyme E2 vers la protéine substrat³³⁶. Il est à noter que les E3 ubiquitine ligases de type U-box sont souvent regroupées dans la même catégorie que les E3 ligases de type RING, car leur mécanisme d'action est similaire. En fait, le domaine U-box a une structure tridimensionnelle et une fonction semblable aux motifs RING-finger, mais il ne contient pas d'ions métalliques³³⁷. Les E3 ubiquitine ligases de type RING et U-box interviennent donc dans le processus d'ubiquitination en tant qu'adapteurs, car la formation d'une liaison E3 ubiquitine ligase-ubiquitine n'est pas requise pour leur action.

Les E3 ligases de la superfamille RING sont très diverses en termes de structure. Dans certaines ligases de type RING, le domaine catalytique de l'enzyme se trouve dans le même polypeptide que le domaine de reconnaissance des substrats, comme l'E3 ligase c-Cbl (*Casitas B lineage Lymphoma*)³²⁵. Plusieurs E3 ligases de type RING se caractérisent par leur capacité à former des dimères, comme l'hétérodimère BRCA1-BARD1 (*Breast Cancer 1 - BRCA1-Associated RING Domain 1*)³²⁷ ou l'homodimère RNF4 (*RING finger protein 4*)³³⁸. Cependant, la plupart des E3 ubiquitine ligases de type RING fonctionnent sous la forme de complexes multiprotéiques²⁹². Dans ces cas, le domaine catalytique et le domaine de reconnaissance de substrats sont souvent retrouvés dans des sous-unités différentes d'un complexe E3 ligase. Quelques exemples de complexes RING sont le complexe de promotion de l'anaphase ou APC/C³⁰⁸ (*Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*) ainsi que la superfamille des E3 ubiquitine ligases de type Cullin-RING (CRL)³²⁹. Plus précisément, ces dernières sont responsables de l'ubiquitination de plus du 20% de protéines dégradées par le système ubiquitine-protéasome. Étant donné l'importance des CRL, les paragraphes suivants seront consacrés à cette famille d'E3 ligases.

Les ligases de type Cullin-RING constituent le plus grand sous-groupe d'E3 ubiquitine ligases connu et agissent comme des médiateurs clé de la dégradation protéique. Ces E3 ubiquitine ligases sont particulièrement capables de reconnaître un grand éventail de substrats différents grâce à leur structure modulaire et à la diversité de leurs sous-unités de reconnaissance de substrats³³⁹. En conséquence, les CRL sont impliquées dans une multitude de fonctions biologiques, comme l'infection virale³⁴⁰, la transcription de gènes³⁴¹, la réplication de l'ADN³⁴², la progression du cycle

cellulaire³⁴³, etc. Notamment, les CRL peuvent cibler une multitude de protéines suppresseurs de tumeur³⁴⁴⁻³⁴⁷ ou d'oncoprotéines^{307, 348-351}, ce qui a généré un intérêt thérapeutique pour ce type de ligases^{343, 352}.

Les CRLs sont constituées de quatre composantes différentes : une protéine cullin (CUL1, 2, 3, 4a, 4b, 5, 7 ou 9), une protéine RING (RBX1/2; *RING Box 1/2*), une protéine variable qui agit en tant qu'élément de reconnaissance des substrats et dans certains cas, de protéines adaptatrices qui relie la sous-unité de reconnaissance avec le reste du complexe. Ces éléments forment un complexe E3 ligase qui s'associe à l'ensemble E2-ubiquitine ainsi qu'à la protéine substrat et qui catalyse le transfert de l'ubiquitine sur cette dernière. Dans ce complexe, les protéines cullins agissent comme un échafaudage qui peut interagir avec la protéine RING (le point de liaison avec l'ensemble E2-ubiquitine) et avec la sous-unité de reconnaissance des substrats correspondante. En fait, c'est la protéine cullin qui déterminera le type de CRL, allant de CRL1 à CRL9. Dans le cas des CRL qui utilisent CUL3 (désormais, CRL3), la liaison entre la cullin et l'élément de reconnaissance des substrats se fait directement. Cependant, le reste des CRL utilisent des protéines adaptatrices, comme Skp1 (*S-phase Kinase-associated Protein 1*) dans le cas de CRL1 et CRL7, elongin B et C pour CRL2 et CRL5 et DDB1 (*Damaged DNA-Binding protein 1*) pour CRL4a et CRL4b³²⁹. Chaque classe de CRL1-9 utilise des types différents de protéines en tant que sous-unités de reconnaissance des substrats. Par ailleurs, ces dernières sont interchangeable selon le contexte cellulaire. L'exemple le mieux caractérisé est celui de la classe de ligases SCF (*Skp1-Cull1-F-box*), dans laquelle une des 69 protéines de la famille F-box interchangeable effectue la reconnaissance des substrats³⁵³.

Tableau 1.3 : Composantes des complexes CRL

	CRL1	CRL2	CRL3	CRL4A/4B	CRL5	CRL7	CRL9
Élément de reconnaissance des substrats	Protéines F-box	Protéines VHL-box	Protéines BTB	Protéines DCAF	Protéines SOCS-box	FBXW8 SMU1	?
Protéine adaptatrice	SKP1	Elongin B Elongin C	-	DDB1	Elongin B Elongin C	SKP1	?
Cullin	CUL1	CUL2	CUL3	CUL4A/CUL4B	CUL5	CUL7	CUL9
Protéine RING	RBX1/2	RBX1	RBX1	RBX1	RBX2	RBX1	?

[Adapté de (261)]

Les sous-unités de reconnaissance des substrats jouent un rôle critique dans la spécificité de chaque classe de CRL. Aujourd'hui, 69 protéines F-box ont été identifiées en tant qu'éléments de reconnaissance des substrats pour CRL1³⁵⁴, environ 7 protéines VHL-box (*Von Hippel-Lindau*) pour CRL2³⁵⁵, 180 protéines BTB (*Bric-a-brac, Tramtrack, Broad-complex*) pour CRL3³⁵⁶, une centaine de protéines DCAF (*DDB1-CUL4-Associated Factor*) pour CRL4a et CRL4b^{357, 358}, 40 protéines SOCS (*Suppressor of Cytokine Signaling*) pour CRL5³⁵⁹ et 2 protéines pour CRL7^{360, 361}. Pour le moment, aucun élément de reconnaissance des substrats n'a été découvert pour CRL9 et son mécanisme d'action demeure inconnu.

L'activité des CRL est régulée à plusieurs niveaux différents. Notamment, celle-ci dépend fortement de la disponibilité de chacun de composants des complexes CRL³⁶². De plus, l'échange des sous-unités de reconnaissance de substrats est contrôlé par des cycles de neddylation, une modification post-traductionnelle similaire à l'ubiquitination³⁶³. La neddylation des cullins est effectuée par l'enzyme NAE1 (*NEDD8-Activating Enzyme 1*), tandis que la réaction inverse (dénéddylation) est menée à terme par le complexe CNS (*COP9 Signalosome*)³⁶⁴. De plus, les cullins déneddylées et donc inactives peuvent être séquestrées par une protéine nommée CAND1 (*Cullin-Associated NEDD8-Dissociated protein 1*)³⁶⁵, ce qui limiterait leur disponibilité et donc la formation des complexes CRL.

Toutes les combinaisons de cullins, d'adapteurs et d'éléments de reconnaissance peuvent générer des centaines de complexes CRL différents qui peuvent en conséquence cibler des milliers de substrats d'ubiquitination. La diversité des éléments de reconnaissance des substrats est donc essentielle pour la sélectivité du processus d'ubiquitination. La prochaine section de cette thèse sera donc consacrée à une des familles des sous-unités de reconnaissance de substrats la moins caractérisée : la famille des protéines ASB.

1.4.4. Protéines ASB

Les protéines ASB (*Ankyrin Repeats and SOCS box-containing*) font partie de la famille des protéines SOCS-box, qui constituent des éléments de reconnaissance de substrats pour les E3 ubiquitine ligases de type CRL5. En fait, les protéines SOCS-box contiennent un domaine SOCS-box dans leur extrémité C-terminal qui leur permet de s'associer à la protéine cullin 5³⁵⁹. Ces protéines présentent également des domaines variables dans leur région N-terminale, qui sont impliqués dans l'interaction avec les substrats de dégradation. Les 80 protéines SOCS-box connues

de nos jours peuvent se classifier en différentes sous-familles de protéines selon les domaines présents dans leur région N-terminal^{359, 366}, notamment la sous-famille des protéines SOCS, qui contiennent des domaines SH2 (*Src Homology 2*), des protéines WSB (*WD-40 containing SOCS box protein*) avec des domaines WD40, des protéines SPSB (*SPRY domain- and SOCS box-containing domain*) avec des domaines SPRY (*spI and ryanodine*), des protéines RAR (*RAS-like GTPase, SOCS-box containing protein*) avec des domaines GTPase et des protéines ASB, qui contiennent des domaines de répétitions ankyrine. Ces dernières constituent la plus grande sous-famille de protéines SOCS, avec 18 membres différents chez l'humain (ASB1-18).

Les protéines ASB sont ainsi caractérisées par la présence de domaines de répétition ankyrine dans leur région N-terminale ainsi qu'un domaine SOCS-box en C-terminale³²⁸. Les domaines de répétition ankyrine contiennent une trentaine d'acide aminés et sont particulièrement caractérisés par la structure qu'ils acquièrent, car ils ne possèdent pas une séquence spécifique³⁶⁷. Le motif structural des répétitions ankyrine est caractérisé par la présence de deux hélices antiparallèles suivies par une boucle. Les hélices de plusieurs répétitions ankyrine peuvent s'empiler entre elles formant une structure tridimensionnelle flexible en forme de solénoïde avec une légère courbure due à la différence de taille de chaque hélice et aux interactions qui stabilisent la structure.³⁶⁸ Cette structure tridimensionnelle garde les régions hydrophobes vers l'intérieur de la protéine et expose une surface hydrophile accessible et relativement grande qui est capable de médier des interactions protéine-protéine de manière très spécifique^{368, 369}. Les domaines de répétition ankyrine ne semblent pas reconnaître une séquence protéique en particulier et la spécificité de la reconnaissance des substrats est atteinte par cette conformation tridimensionnelle. Les différentes protéines ASB possèdent une quantité variable de domaines de répétition ankyrine, qui peut varier de seulement 1, dans le cas de ASB17 et jusqu'à 12 pour ASB2³⁷⁰. La structure et le nombre des répétitions ankyrine joue un rôle essentiel dans la spécificité des interactions entre les protéines ASB et leurs substrats³⁷¹⁻³⁷⁵.

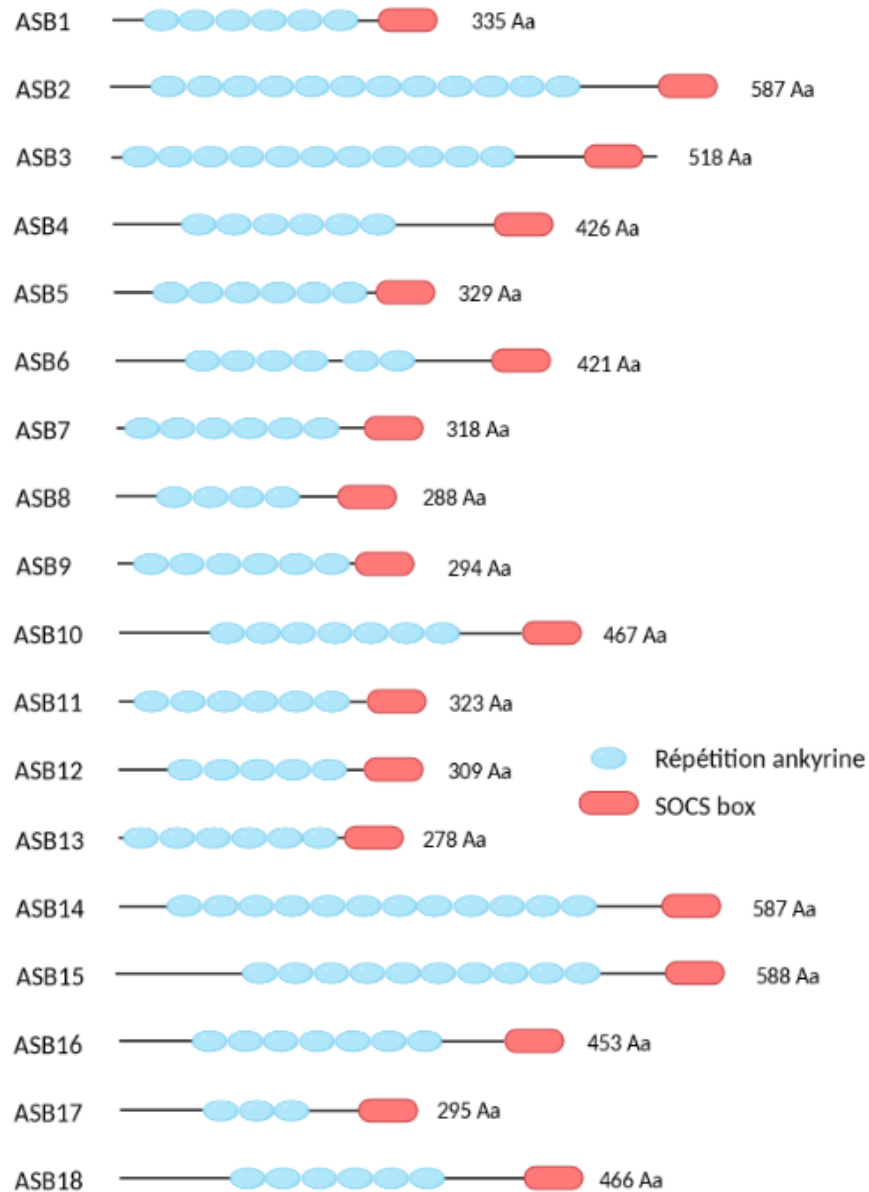


Figure 1.11 : La famille de protéines ASB

Les différents membres de la famille ASB sont représentés de N-terminus (gauche) à C-terminus (droite). Pour les protéines ASB ayant plusieurs isoformes, l'isoforme plus longue a été choisie. Données provenant de la base de données UniProt. Les domaines de répétitions ankyrine d'ASB17 ont été prédits avec le logiciel Pfam³⁷⁶ (E value=0.00044). D'autres isoformes ont été identifiées pour ASB2, ASB3, ASB4, ASB5, ASB6, ASB7, ASB9, ASB10, ASB11, ASB12, ASB13, ASB14 et ASB18. (Aa, acides aminés)

D'un autre côté, le domaine SOCS box est le centre catalytique des protéines ASB, permettant leur liaison à la protéine cullin 5 par l'interaction avec les deux protéines adaptatrices elongin B et C^{374, 377}. Toutes les protéines de la famille ASB forment spécifiquement des complexes E3 ubiquitine ligase avec cullin 5³⁷⁴. Cependant, il a été montré que certaines protéines ASB peuvent également former des complexes CRL non canoniques, notamment ASB4, qui peut s'associer à des complexes hétérodimériques contenant les protéines cullin 5 et cullin 4a³⁷⁴ et ASB2, qui peut former des complexes cullin 5-cullin 1³⁷⁸.

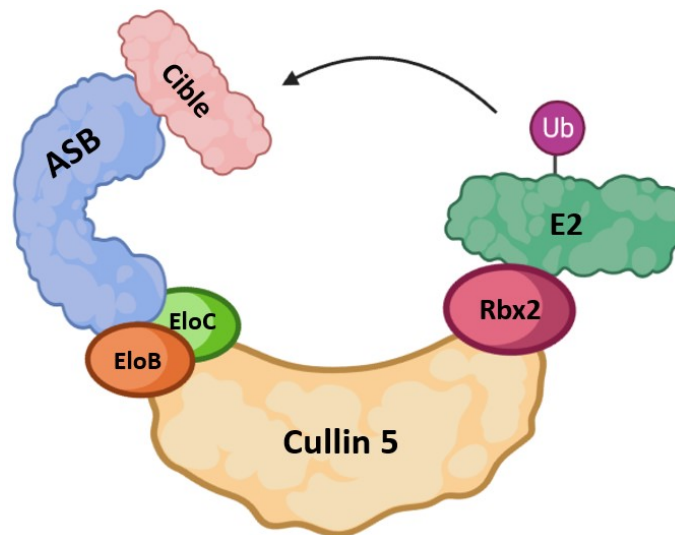


Figure 1.12 : Structure générale des E3 ubiquitine ligases de la famille ASB

La flèche indique le transfert d'ubiquitine de l'enzyme E2 vers la protéine cible. (Ub, ubiquitine). Figure adaptée de (343).

De nos jours, la famille de protéines ASB demeure très peu caractérisée et l'activité E3 ubiquitine ligase n'a été confirmée que seulement pour quelques membres^{372-374, 379-385}. L'étude d'Andresen et collègues en 2014 a contribué à l'identification des partenaires d'interaction de la famille ASB, dont la plupart semble être spécifique de chacune des protéines ASB³⁷⁴. De plus, la distribution des protéines et des transcrits d'ASB dans les tissus humains est très hétérogène. L'expression de quelques membres de la famille ASB semble également être spécifique à certains tissus. En conséquence, les protéines ASB ont des rôles très variés³⁸⁶, comme la spermatogénèse^{387, 388}, la différenciation du muscle squelettique^{386, 389-393}, la voie Notch^{375, 378, 394}, l'inflammation^{372, 382, 383, 395}, etc. De plus, il a été observé que l'expression de certaines protéines ASB pourrait avoir un

impact sur le cancer et la suppression tumorale^{385, 386, 396-401}. En fait, plusieurs gènes codant pour des protéines ASB sont altérés dans différents types de cancer.

Tableau 1.4 : Protéines ASB et leurs rôles principaux

Gène	Fonction	Tissu	Activité E3 ligase	Substrats	Implication en cancers
ASB1	Spermatogénèse ⁴⁰² , inflammation ⁴⁰³	Testicules* ⁴⁰²	À déterminer	À déterminer	Carcinome nasopharyngé ⁴⁰⁴
ASB2	Signalisation de la voie Notch ^{405, 406} , hématopoïèse ^{407, 408} , différenciation du muscle ⁴⁰⁹	Muscle squelettique ^{HPA}	Oui	E2A, JAK2 ³⁷⁸ , JAK3 ⁴⁰⁶ , MLL ⁴⁰⁸ , FLNA-B ^{409, 410} , IκBα ⁴⁰⁵	T-ALL ⁴⁰⁵
ASB3	Apoptose ⁴¹¹ , transition épithélio-mésenchymateuse ³⁹⁶	Expression globalement élevée ^{HPA}	Oui	TNFR2 ³⁷²	Carcinome hépatocellulaire ⁴¹¹ , cancer colorectal ³⁹⁶
ASB4	Différenciation vasculaire ⁴¹²	Hypophyse, muscle squelettique, glande surrénale ^{HPA}	Oui	ID2 ⁴¹² , GPS1 ⁴¹³	Carcinome hépatocellulaire ³⁹⁹
ASB5	Croissance des artères** ⁴¹⁴	Muscle squelettique ^{HPA}	À déterminer	À déterminer	À déterminer
ASB6	Signalisation de l'insuline ⁴¹⁵	Tissu adipeux ⁴¹⁵ , tube digestif ^{HPA}	Oui	APS ⁴¹⁵	Carcinome des cellules squameuses ³⁹⁸
ASB7	Organisation du cytosquelette ³⁷⁹ et maturation des oocytes ⁴¹⁶	Galle, rein, muscle cardiaque, ovaires ^{HPA}	Oui	DDA3 ³⁷⁹	À déterminer
ASB8	Réponse antivirale ³⁸²	Cœur, muscle squelettique ⁴¹⁷ , cervelet, galle, pancréas, reins, vessie, testicules ^{HPA}	Oui	TBK1/IKKi ³⁸² , IKKβ ³⁹⁵	Adénocarcinome pulmonaire ⁴¹⁷
ASB9	Dysfonction mitochondriale ³⁸¹	Testicules, foie, rein ³⁸¹ , pancréas endocrine, testicules ^{HPA}	Oui	CKB ³⁷³ , uMtCK ³⁸¹	Cancer de sein ⁴¹⁸ , cancer colorectal ³⁹⁷
ASB10	À déterminer	Rétine et réseau trabéculaire ⁴¹⁹ , muscle cardiaque et squelettique ^{HPA}	À déterminer	À déterminer	Glaucome ⁴²⁰⁻⁴²²

ASB11	Signalisation de la voie Notch ³⁷⁵ , neurogénèse ^{394, 423} , myogénèse ³⁹³ , apoptose ⁴²⁴	<i>Muscle cardiaque et squelettique</i> ^{HPA}	Oui	RPN1 ³⁷⁴ , DLL1 ³⁷⁵ , BIK ⁴²⁴	À déterminer
ASB12	À déterminer	<i>Muscle squelettique</i> ^{HPA}	À déterminer	À déterminer	À déterminer
ASB13	Transition épithélio-mésenchymateuse ³⁸⁵	Testicules, cervelet, ovaires, tube digestif ^{HPA}	Oui	SNAI2 ³⁸⁵	Cancer de sein ^{385, 425} , DLBCL ⁴²⁶
ASB14	Insuffisance cardiaque ⁴²⁷	Pancréas, <i>muscle squelettique</i> ^{HPA}	À déterminer	À déterminer	À déterminer
ASB15	Prolifération et synthèse protéique ^{390, 391, 428}	<i>Muscle squelettique et cardiaque</i> ^{HPA}	À déterminer	À déterminer	À déterminer
ASB16	À déterminer	Bronches, cortex cérébral, testicules, ovaires, muscle cardiaque et squelettique ^{HPA}	À déterminer	À déterminer	À déterminer
ASB17	Spermatogénèse ^{387, 429} , apoptose ³⁸⁴	<i>Testicules</i> ^{HPA}	Oui	BCLW, MCL1 ³⁸⁴	À déterminer
ASB18	À déterminer	<i>Muscle squelettique et cardiaque</i> ^{HPA}	À déterminer	À déterminer	À déterminer

Données sur les protéines ASB chez l'humain sauf pour (*) qui indique des données chez la souris et (**) chez le lapin. Les tissus en *italique* indiquent l'expression de l'ARNm. Les données sur l'implication dans les cancers proviennent des études publiées sur l'effet du gain ou de la perte de fonction de la protéine ASB indiquée. Les types de cancer en **rouge** indiquent un effet pro-tumorale de la protéine ASB, tandis que les cancers en **vert** indiquent un effet antitumorale. (HPA= Données provenant du *Human Protein Atlas*)

Le deuxième article présenté dans cette thèse est centré sur ASB14. Cette dernière demeure un des membres de la famille ASB le moins caractérisé. De nos jours, seulement quelques articles mentionnent cette protéine^{427, 430, 431} dont le rôle n'a jamais été étudié. Dans le chapitre 3, nous montrerons des résultats appuyant un rôle d'ASB14 dans la sénescence cellulaire et la suppression tumorale.

1.5. Problématiques et objectifs de la thèse

La sénescence est considérée comme une barrière antitumorale limitant la transformation ou la progression tumorale³⁰. Pour sa mise en place, elle requiert l'action de suppresseurs de tumeur en réponse à de nombreux stress, comme l'activation d'un oncogène, le raccourcissement des télomères ou bien des traitements avec des composés génotoxiques. Malgré les dernières avancées dans le domaine de la sénescence, il reste encore beaucoup de travail afin de caractériser précisément cette réponse cellulaire. Notre laboratoire a montré auparavant que la mise en place de la sénescence dans des modèles cellulaires primaires dépend d'un programme de dégradation de protéines spécifiques (SAPD)²¹⁰. L'existence du SAPD peut expliquer plusieurs caractéristiques des cellules sénescents, notamment les défauts dans la voie de la biogenèse des ribosomes associés à la sénescence (SARD)²⁰⁹. Ces derniers sont à l'origine d'une accumulation nucléaire de certaines protéines ribosomiques, où elles peuvent effectuer des fonctions indépendantes de leur rôle structural dans les ribosomes. Parmi ces protéines ribosomiques, notre laboratoire a montré que RPS14/uS11 peut s'accumuler dans le nucléoplasme et réguler le cycle cellulaire en inhibant CDK4¹⁶. Le SAPD et le SARD contribuent dès lors à la mise en place et à la pérennisation du phénotype sénescents. Durant ce projet de doctorat, nous avons émis l'hypothèse que la caractérisation de nouveaux effecteurs dans ces deux mécanismes pourrait permettre d'identifier de nouvelles protéines nécessaires à la mise en place de la sénescence et à sa stabilisation dans le temps qui pourraient également avoir un rôle dans la suppression tumorale.

1.5.1. Identification de nouvelles protéines ribosomiques comme CKI

Les SARD sont associés à la perte de plusieurs facteurs de la ribogenèse et se manifestent par une accumulation nucléaire et nucléolaire des précurseurs des ARNr et des protéines ribosomiques¹⁶. En effet, les défauts dans les voies de la ribogenèse permettent l'accumulation des protéines ribosomiques en dehors des ribosomes²²⁰. Plusieurs protéines ribosomiques ont déjà été décrites comme ayant des fonctions indépendantes du ribosome, notamment dans la régulation de la voie de p53^{231-235, 237-243}. De plus, beaucoup de gènes codant pour des protéines ribosomiques sont altérés dans le cancer²³⁰, ce qui suggère un rôle des protéines ribosomiques dans le contrôle du cycle cellulaire. Lessard et collègues ont montré que lors de la sénescence, la protéine ribosomique RPS14/uS11 peut s'accumuler dans le nucléoplasme et agir comme un nouveau type de CKI en inhibant CDK4. Ce mécanisme de suppression tumorale est indépendant de la voie de

p53. Lessard et collègues ont également montré que la sénescence peut être induite par la perte de l'expression de certains facteurs de la ribogenèse, comme RSL1D1¹⁶. Dans le contexte de la sénescence induite par la perte d'expression de RSL1D1, une analyse par IP-MS (*Immunoprecipitation-Mass Spectrometry*) de la protéine CDK4 a révélé une interaction avec d'autres protéines ribosomiques en plus de RPS14. Ceci suggère que d'autres protéines ribosomiques pourraient également agir comme des inhibiteurs de CDK4. Parmi les protéines ribosomiques découvertes dans l'interactome de CDK4, on retrouve RPL22. Plusieurs données suggèrent un rôle de suppresseur de tumeur pour RPL22^{239, 264, 265, 267, 270}. L'hypothèse d'origine du chapitre 2 est que la protéine RPL22 pourrait être impliquée dans la régulation du cycle cellulaire en inhibant CDK4 de manière similaire à RPS14. Ainsi, le premier objectif de cette thèse est l'évaluation du rôle de RPL22 dans l'activité de CDK4 et dans la progression du cycle cellulaire. Les résultats obtenus en lien avec cet objectif sont présentés dans le chapitre 2.

1.5.2. Découverte des E3 ubiquitine ligases impliquées dans la sénescence.

L'induction de plusieurs types de sénescence, notamment la sénescence induite par les oncogènes, requiert une forte signalisation de la voie de MAPK-ERK1/2^{210, 278}. Le SAPD est une conséquence de cette signalisation aberrante. En effet, la suractivation des kinases ERK1/2 induit une hyper-phosphorylation de leurs substrats en aval. Ces derniers sont ensuite reconnus et éliminés par le système ubiquitine-protéasome²¹⁰. La dégradation de ces effecteurs serait à l'origine de plusieurs caractéristiques associées à la sénescence²⁰⁹. Les E3 ubiquitine ligases assurent la reconnaissance de substrats et la spécificité de l'UPS²⁹². Cependant, les E3 ubiquitine ligases responsables du SAPD restent inconnues. Notre hypothèse est que la reconnaissance et marquage des cibles du SAPD pourrait être effectuée par des E3 ubiquitine ligases spécifiques et que ces dernières pourraient jouer un rôle important dans la sénescence cellulaire. Les E3 ubiquitine ligases associées à la sénescence pourraient également constituer des candidats en tant que suppresseurs de tumeur. Le deuxième objectif de cette thèse est l'identification et la caractérisation des E3 ubiquitine ligases importantes pour la sénescence. Les résultats en lien avec cet objectif sont présentés dans le chapitre 3.

2. Le rôle de RPL22/eL22 dans la sénescence et la suppression tumorale

2.1. Présentation de l'article 1

Notre laboratoire a montré auparavant que les cellules sénescents présentent des défauts dans la voie de biogenèse des ribosomes. En effet, lors de la sénescence induite par la perte du facteur de ribogenèse RSL1D1, la protéine ribosomique RPS14/uS11 peut s'accumuler en dehors des ribosomes et interagir avec CDK4. Ceci nous a permis d'identifier que RPS14/uS11 s'associe aux complexes CDK4-cycline D1 des cellules sénescents afin d'inhiber leur activité¹⁶. L'analyse de l'interactome de CDK4 a également identifié d'autres protéines ribosomiques, parmi lesquelles se trouvait RPL22. Ce premier article avait pour but de mieux comprendre le rôle de la protéine ribosomique RPL22 dans le cycle cellulaire ainsi que d'évaluer sa capacité à inhiber les complexes CDK4-cycline D1¹⁵. Cet article a été publié dans le journal *Cell Cycle* en mars 2019.

Dans cet article, j'ai contribué à la culture cellulaire, aux analyses de prolifération et d'activité β -galactosidase menant aux figures 1e-f, 2, S1 et 3. J'ai également effectué des *western blots* confirmant les résultats en 2c, 2f, 3c et 3d. Neylen del Toro a réalisé toutes les purifications de ribosomes, les essais qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) et la confirmation de la sénescence induite par l'expression de RPL22. Frédéric Lessard a conçu le projet et a effectué la plupart des expériences de culture cellulaire, d'immunoprécipitation, des essais kinases, des courbes de croissance ainsi que l'analyse de données. Lian Mignacca a généré le plasmide pBabe-RPL22Myc et a effectué la figure S2. Paloma Kalegari a effectué les immunofluorescences des figures S1b et S1c. Marie-Camille Rowell a contribué à la culture cellulaire. Sebastian Igelmann a effectué l'immunofluorescence de la figure 1e ainsi que des analyses bio-informatiques. Emmanuelle Saint-Germain a confirmé les expériences d'immunoprécipitation. Mehdi Benfdil a contribué à la quantification des essais d'activité β -galactosidase. Stéphane Lopes-Paciencia a fourni du support technique aux immunofluorescences. Au niveau de l'écriture, Frédéric Lessard a rédigé l'article et Léa Brakier-Gingras, Véronique Bourdeau et Gerardo Ferbeyre ont apporté des corrections.

2.2. Article 1

Ribosomal protein Rpl22 regulates the cell cycle by acting as an inhibitor of the CDK4-cyclin D complex

Neylen Del Toro^{1§}, Ana Fernandez-Ruiz^{1§}, Lian Mignacca¹, Paloma Kalegari¹, Emmanuelle Saint-Germain¹, Mehdi Benfdil¹, Stéphane Lopes-Paciencia¹, Léa Brakier-Gingras¹, Véronique Bourdeau¹, Gerardo Ferbeyre^{1,2*} and Frédéric Lessard^{1*}.

Affiliations:

¹Department of Biochemistry and Molecular Medicine; Université de Montréal; C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7; Canada.

² CRCHUM, 900 Saint-Denis – bureau R10.432, Montréal, QC H2X 0A9 - Canada

Author Contributions:

§These authors contributed equally to this work.

Keywords: Ribosome biogenesis; senescence; RPL22/eL22; CDK4; cyclin D1; RPS14/uS11

Contact:

*Correspondence to: g.ferbeyre@umontreal.ca and/or frederic.lessard@umontreal.ca

2.2.1. Summary

Senescence is a tumor suppressor program characterized by a stable growth arrest while maintaining cell viability. Senescence-associated ribogenesis defects (SARD) have been shown to regulate senescence through the ability of the ribosomal protein S14 (RPS14 or uS11) to bind and inhibit the cyclin-dependent kinase 4 (CDK4). Here we report another ribosomal protein that binds and inhibits CDK4 in senescent cells: L22 (RPL22 or eL22). Enforcing the expression of RPL22/eL22 is sufficient to induce an RB and p53-dependent cellular senescent phenotype in human fibroblasts. Mechanistically, RPL22/eL22 can interact with and inhibit CDK4-Cyclin D1 to decrease RB phosphorylation both *in vitro* and in cells. Briefly, we show that ribosome-free RPL22/eL22 causes a cell cycle arrest which could be relevant during situations of nucleolar stress such as cellular senescence or the response to cancer chemotherapy.

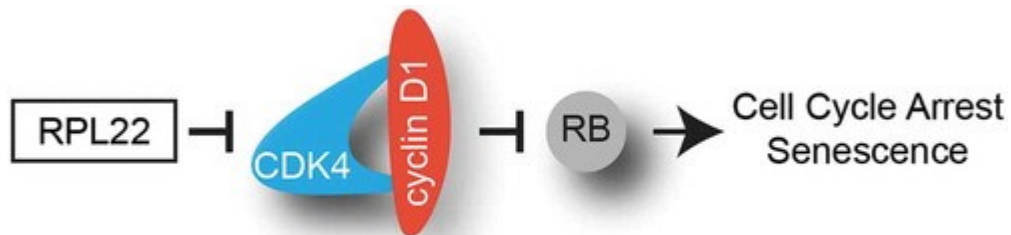


Figure 2.1 Graphical abstract

2.2.2. Introduction

Ribosome biogenesis is a complex multistep process implicating numerous cofactors and requiring proper coordination of the three major RNA polymerases [1]. The process is regulated by several oncogenes and/or tumor suppressors according to the cellular state whether proliferative, apoptotic, arrested or senescent [2,3]. In the nucleolus, polymerase I is responsible for 47S rRNA synthesis which is matured into 18S, 5.8S and 28S rRNA while polymerase III synthesizes the 5S rRNA in the nucleoplasm [4,5]. Moreover, polymerase II transcribes the mRNAs of other protein components or cofactors implicated in processing and assembly of functional ribosomes. Several ribosomal proteins, which include RPL5/uL18, RPL11/uL5, RPS14/uS11 and RPL22/eL22, link nucleolar stress to p53 activation [6–9]. One physiological process leading to nucleolar stress is cellular senescence, a process that plays a role in embryonic development [10,11], wound healing [12] and tumor suppression [13].

During senescence, aberrant signaling triggers the degradation of multiple proteins by a process dubbed senescence-associated proteins degradation (SAPD). Targets of SAPD include several ribosome biogenesis factors and their down-regulation explains in part the senescence-associated ribogenesis defects (SARD) [14–16]. While SARD characterizes senescence in response to a variety of stresses, triggering the process by depleting individual ribogenesis factors is sufficient to induce senescence [16]. Analysis of the interactome of CDK4 in senescent cells induced by depleting one particular ribosome biogenesis factor, namely ribosomal L1 domain-containing protein 1 (RSL1D1) identified RPS14/uS11 and other ribosomal proteins as potential partners [16]. Ribosomal proteins are frequently mutated or their expression pattern is altered in various types of cancers [17,18]. RPL22/eL22 is often mutated in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and in endometrial, colorectal and gastric cancers [19–23]. A large-scale analysis demonstrated that RPL22/eL22 hemizygous gene deletions are also frequent in numerous types of cancers and cell lines [24]. Moreover, RPL22/eL22 down-regulation is observed in non-small cell lung carcinoma and its haploinsufficiency promotes transformation and thymic lymphoma development in a mouse model [19,25]. All these facts suggest a tumor suppressor role for RPL22/eL22 which has previously been linked to p53 stabilization and activation [9]. In this report, we demonstrate that following ribosome biogenesis defects in senescence, RPL22/eL22 can control cell cycle progression through the inhibition of CDK4-cyclin D1 complex in a manner

similar to RPS14/uS11 [16]. This demonstration provides an additional explanation for the tumor suppressor activity of RPL22/eL22.

2.2.3. Materials and methods

Plasmids

Retroviral vector pBABE was previously described [26]. pLXSN, pLXSN-E6, pLXSN-E7 were provided by Dr. Denise A. Galloway (Fred Hutchinson Cancer Center). pBABE-CDK4(WT) was a gift from Dr. Scott W. Lowe (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New-York, NY). pcDNA3.1-3xFLAG, pcDNA3-Myc-Cyclin D1(WT), pMSCV-shNTC and pMSCV-shRB were previously described in [16]. Shp53 under H1 promoter regulation in pRS-shp53 was described in [27] and subcloned in EcoRI/XhoI restriction sites to create retroviral vector MSCV-shp53. pCMV6-RPS14(WT)-Myc-FLAG (RC223055) and pCMV6-RPL22(WT)-Myc-FLAG (RC208910) were purchased from Origene, Atlanta, GA. RPL22(WT)-Myc was PCR amplified from the vector pCMV6-RPL22(WT)-Myc-FLAG and subcloned in BamHI/SalI restriction sites to create retroviral vector pBABE-RPL22(WT)-Myc. For PCR primers used for cloning see Supplementary Table S1.

Lentiviruses pLKO expressing shRPL22 (shRPL22-A, shRPL22-B) and shCTR were purchased from Sigma-Aldrich (#75015, #75017 and SHC002). Finally, pCMV-VSV-G (Addgene #8454) and pCMV-dR.91 (Delta8.9) were obtained from Dr. R. Weinberg's laboratory (Whitehead Institute, Cambridge, MA). ShRNA target sequences are presented in Supplementary Table S1.

Cells, reagents and viral gene transfer

Palbociclib (PD0332991) was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Phoenix Ampho packaging cells were a gift from Dr. Scott W. Lowe. Human embryonic kidney HEK-293T cells were obtained from Invitrogen. Prostate cancer PC3 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and human diploid fibroblasts IMR90 were obtained from Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ). PC3 cells were cultured in RPMI medium (Wisent, Montreal, QC) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent), 1% penicillin/streptomycin sulfate (Wisent) and 2 mM L-glutamine (Wisent). All other cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Wisent) supplemented with 10% FBS

(Wisent) and 1% penicillin/streptomycin sulfate (Wisent) and 2 mM L-glutamine (Wisent). Retroviral and lentiviral-mediated gene transfer were done as described before [16,26].

Immunoblotting

Immunoblotting was performed as previously described in [15]. The following primary antibodies were used: anti-phospho-H3S10 rabbit polyclonal (1:1000, #06–570, lot: 2,517,793, Millipore, Billerica, MA), anti-MCM6 rabbit polyclonal (1:1000, A300-194A, lot: A300-194A-2, Bethyl Laboratories), anti-p53 mouse monoclonal (1:1000, clone DO-1, Sc-126, lot: C1413, Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-p53S15 rabbit polyclonal (1:500, #9284, lot: 9, Cell Signaling), anti-FLAG mouse monoclonal (1:1000, F1804, M2, lot: SLBK1346V, Sigma-Aldrich), anti-c-Myc rabbit polyclonal (1:1000, clone A-14, sc-789, lot: K0215, Santa Cruz Biotechnology), anti-Myc tag mouse monoclonal (1:2000, 9E10, lot: 114K4821, Sigma, Saint Louis, Missouri), anti-phospho-RBS795 rabbit polyclonal (1:500, #9301, lot: 13, Cell Signaling), anti-RB mouse monoclonal (1:1000, clone 4H1, #9309, lot: 9, Cell Signaling), anti-CDK4 rabbit polyclonal (1:2000, A304-225A, lot: A304-225A-1, Bethyl Laboratories), anti- α -Tubulin mouse monoclonal (1:20000, clone B-5-1-2, T6074, lot: 023M4813, Sigma-Aldrich), anti-GST mouse monoclonal (1:2000, clone GST-2, G1160, lot: 012M4814, Sigma-Aldrich), anti-RPL22 mouse monoclonal (1:500, clone D-7, sc-373993, lot: D2216, Santa Cruz Biotechnology), anti-RPL22 rabbit polyclonal (1:1000, cat#: 25002–1-AP, Immunogen cat#: Ag21851, Proteintech) and anti-RPS3 mouse monoclonal (1:1000, clone C-7, sc-376008, lot: D2116, Santa Cruz Biotechnology).

The following secondary antibodies were used: goat anti-rabbit IgG conjugated to HRP (1:3000, #170–6515, lot: 64,126,042, Bio-Rad, Mississauga, ON), goat anti-mouse IgG conjugated to HRP (1:3000, #170–6516, lot: 64,132,955, Bio-Rad, Mississauga, ON).

Cell proliferation and senescence analysis

Proliferation was assessed from estimations of cell number according to a crystal violet retention assay [26]. Senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -gal) activity was assayed as described before [26]. Separation of ribosomal RPL22-Myc from non-ribosomal RPL22-Myc was done as previously described [16]. Source data for growth curves and SA- β -gal staining are presented in Supplementary Table S2.

Immunofluorescence

Immunofluorescence images were performed as described in [16,26]. Primary antibodies used were: anti-PML rabbit polyclonal (1:200, A301-167A, lot: A301-167A-2, Bethyl Laboratories), anti-53BP1 rabbit polyclonal (1:200, Ab-1, Cat# PC712, lot: D00137736, Calbiochem, EMD Biosciences, San Diego, CA), anti-phospho- γ H2A.XS139 mouse monoclonal (1:100, JBW-301, lot: 2552645, Millipore, Billerica, MA) and anti-Myc tag mouse monoclonal (1:100, 9E10, lot: 114K4821, Sigma, Saint Louis, Missouri).

The following secondary antibodies were used: goat anti-rabbit IgG (H + L) conjugated to Alexa Fluor 488 (1:1000, #A11008, lot: 1166843, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR), goat anti-mouse IgG (H + L) conjugated to Alexa Fluor 488 (1:1000, #A11029, lot: 1423008, Life Technologies, Eugene, OR), goat anti-rabbit IgG (H + L) conjugated to Alexa Fluor 568 (1:1000, #A11036, lot: 1504529, Life Technologies, Eugene, OR), goat anti-mouse IgG (H + L) conjugated to Alexa Fluor 568 (1:1000, #A11031, lot: 1398018, Life Technologies, Eugene, OR).

Images were acquired with a FV300 Olympus confocal microscope with a PMT 1st generation and Fluoview V4.2 or a Zeiss Axio Imager Z2 upright microscope with a CoolSNAP FX camera (Photometrics) and/or AxioCam camera and ZEN 2 Imager (2.0.14283.302). Images were processed with ImageJ (2.0.0-rc-49/1.51g). Source data for immunofluorescence are presented in Supplementary Table S2.

Immunoprecipitation (IP)

HEK-293T cells (5×10^6) were seeded in 10 cm-cell culture dishes and grown for 24 hours. Cells were transiently transfected using the calcium phosphate method with 15 μ g of pcDNA3.1(C1)-3xFLAG, pCMV6-RPL22(WT)-Myc-FLAG or pCMV6-RPS14(WT)-Myc-FLAG in combination with either pBABE-CDK4(WT) or pcDNA3-Myc-cyclin D1(WT). Cells were harvested 24 hours post-transfection in IP buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 12.5 mM MgCl₂, 400 mM NaCl, 20% glycerol, 1% Triton X-100 [BioShop], 0.1% SDS and 1X Complete-EDTA free-protease inhibitor cocktail [Roche Applied Science]). Cell lysates were kept on ice for 15 min and then sonicated for 40 seconds at the lowest intensity. Cell lysates were cleared by centrifugation at 13,000 rpm for 1 min and immunoprecipitations were performed with anti-FLAG M2 Affinity Gel (#A2220-5ML, lot: SLBT8835, Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO) for 30 min at 4°C. Of note, anti-FLAG M2 Affinity Gel was previously blocked for 1 hour at 4°C in IP buffer containing 2.5% BSA, 0.16 µg/µl salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich) and 0.16 µg/µl E. coli tRNA (Sigma-Aldrich) and then washed twice with IP buffer before being used for immunoprecipitation. Immunoprecipitates were recovered after 30 min of incubation at 4°C and washed three times for 30 min in IP buffer. Proteins of immunoprecipitates and total cell lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and analyzed by Western Blotting.

In vitro protein phosphorylation

Human active CDK4-cyclin D1 (Cat#: C0620, lot: SLBK7657V, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was incubated alone or with human recombinant GST-RB (773–928) (Cat#: R05-55G, lot: M166-3, SignalChem) in the presence or absence of palbociclib (1 µM) or with a gradient of human recombinant His-RPL22 (Cat#: NBP2-23419, lot: 12221401, Novus Biologicals, Oakville, ON) in kinase assay buffer I (Cat#: K01-09, Signal-Chem): 25 mM MOPS, pH 7.2, 12.5 mM β-glycerol-phosphate, 25 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol (DTT), 40 µM ATP; at 30°C for 30 min according to SignalChem protocol. Then, Laemmli buffer was added to stop the reaction. Samples were boiled at 98°C for 5 min and the reaction products were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and analyzed by Western Blotting.

In vitro protein interaction (GST pull-down assay)

GST (50 ng) (Cat#: SRP5348, lot: F664-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or GST tagged human active CDK4-cyclin D1 (50 ng) (Cat#: C0620, lot: SLBK7657V, Sigma-Aldrich) or GST tagged human CDK4 (50 ng) (Cat#: C31-14G, lot: K127-1, Signal Chem, Richmond, BC) or GST tagged human cyclin D1 (50 ng) (Cat#: 009-001-153S, lot: 37136, Rockland antibodies & assays, Limerick, PA) were incubated with human recombinant His-RPL22 (375 ng) (Cat#: NBP2-23419, lot: 12221401, Novus Biologicals, Oakville, ON) in 500 µl of PB buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 130 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.05% NP40) and mixed using a rotating machine at 30°C for 2 hours. Proper amounts of glutathione-Sepharose beads (Cat#: 17–0756-01, GE Healthcare, Sweden) were washed three times with PB buffer. Then, 10 µl of glutathione beads and 5 µl of BSA (25% stock solution) were added to the mix of proteins and incubation continued at room temperature for 30 min with rotation. The beads were then washed three times for 30 min with PB buffer at room temperature with rotation. Then, the appropriate quantity of 6X loading

buffer (0.5 M Tris-HCl pH6.8, 30% glycerol, 10% SDS, 1% bromophenol blue and 15% β -mercaptoethanol) was added. The samples were boiled for 5 min and separated by SDS-PAGE for Western Blotting.

Real-time PCR

Total RNA extracts were prepared in TransZol (Civic Bioscience) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reverse transcribed and gene expression level was determined with a LightCycler 96 (software version 1.1) Real-Time PCR (Roche Applied Science) was performed using SYBR Green technologies as described before [26]. QPCR primers are presented in Supplementary Table S1. Source data for qPCR are presented in Supplementary Table S2.

Statistics and reproducibility

Statistical analysis (two-tailed Student's t-test) was performed using Excel. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Experiments were repeated at least three times.

Data availability

Source data for Figures 1(e), 2(a,b,d,e), 3(a,b), S1(b–d) and S2(a,c) can be found in Supplementary Table S2. All data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

2.2.4. Results

RPL22/eL22 as a possible regulator of CDK4-Cyclin D1 complex

We recently published the interactome of the CDK4(K35M) mutant in RSL1D1 knockdown-induced senescent cells [16]. By using a less stringent cut-off, we found other known partners of CDK4 such as the cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (CDKN2D or INK4D), the cell division cycle 37 (CDC37), the heat shock protein 90A (HSP90A) and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Figure 1(a) and Supplementary Table S3). In addition to the discovery of RPS14/uS11 as a CDK4 partner [16], we also found other ribosomal proteins namely S3A (RPS3A or eS1), S4X (RPS4X), L7 (RPL7 or uL30), L15 (RPL15 or eL15), L24 (RPL24 or eL24) and L22 (RPL22 or eL22) (Figure 1(b) and Supplementary Table S3). Considering that RPL22/eL22 is an haploinsufficient tumor suppressor gene [19], we decided to study its ability to regulate the cell cycle by interacting and regulating the CDK4-cyclin D1 complex. In order to confirm and determine the strength of the interaction of RPL22/eL22 with CDK4 and/or cyclin D1, we overexpressed and immunoprecipitated flag-tagged versions of RPL22/eL22 or RPS14/uS11 in the presence of overexpressed CDK4 or cyclin D1 (Figure 1(c,d) respectively). Much as with RPS14/uS11, RPL22/eL22 can interact with CDK4 (Figure 1(c)) and with cyclin D1 (Figure 1(d)) in HEK-293T cells. However, in both cases, RPL22/eL22 interacted less strongly than RPS14/uS11 (Figure 1(c,d)). Immunofluorescence in normal human fibroblasts (IMR90 cells) after retroviral gene transfer of a myc-tagged version of RPL22/eL22 showed its strong nucleolar accumulation and limited nucleoplasmic accumulation (Figure 1(e)) while RPS14/uS11 accumulated in the nucleoplasm in the same experimental setting [16]. Following ribosome purification of IMR90 cells expressing RPL22-Myc, we detected the myc-tagged version of RPL22/eL22 in the ribosomal fraction showing its incorporation into ribosomes but we also detected it in the supernatant (Figure 1(f)) pointing to ribosome-free RPL22/eL22. Taken together, these results suggest that RPL22/eL22 could regulate CDK4-cyclin D1 complex.

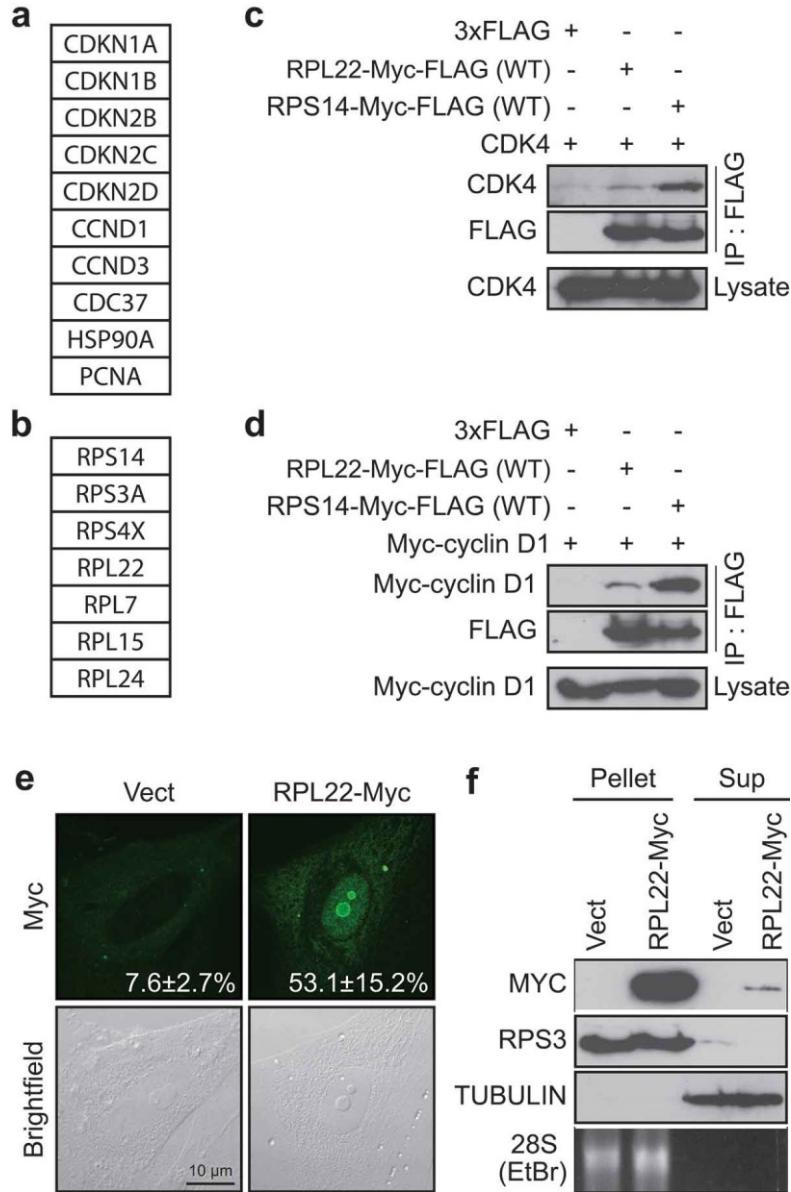


Figure 2.2 : RPL22/eL22 can interact with CDK4 and/or cyclin D1

(a, b) List of selected proteins found to immunoprecipitate with a FLAG-tagged version of CDK4(K35M) from RSL1D1 knockdown-induced senescent cells classified as known interactors of CDK4 (a) and ribosomal proteins interactors (b). (c) HEK-293T cells were transfected with vectors expressing CDK4 and 3xFLAG control, Myc-FLAG tagged RPL22 wild type (RPL22-Myc-FLAG(WT)) or Myc-FLAG tagged RPS14 wild type (RPS14-Myc-FLAG(WT)) and immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody. Lysates and immunoprecipitates were immunoblotted for the indicated proteins. (d) HEK-293T cells were transfected with vectors expressing Myc-cyclin D1 and 3xFLAG control, RPL22-Myc-FLAG(WT) or RPS14-Myc-FLAG(WT) and immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody. Lysates and

immunoprecipitates were immunoblotted for the indicated proteins. **(e)** Indirect immunofluorescence (IF) with a specific anti-Myc tag antibody showing RPL22-Myc in IMR90 cells expressing an empty control vector (Vect) or RPL22-Myc at day 12 post-infection (representative images). Data were quantified from 3-independent cell counts up to a total of at least 100 cells in triplicate and are presented as the mean percentage of positive cells for nucleolar localization of RPL22-Myc \pm SD. Brightfield images are shown alongside. Scale bar, 10 μ m. **(f)** Immunoblots for the indicated proteins and ethidium bromide detection of 28S rRNA in ribosome purification by sedimentation (Pellet) or its supernatant (Sup) obtained from extracts of IMR90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) at day 7 post-infection. Blots in C, D and F are representative of 3 independent experiments with similar results.

RPL22/eL22 induces senescence and biomarkers of Rb pathway activation

The ability of RPL22/eL22 to interact with CDK4 and/or cyclin D1 suggested that RPL22/eL22 could induce senescence in an RB-dependent manner similarly to RPS14/uS11 [16]. To investigate this possibility, we used retroviral gene transfer to express RPL22/eL22 in IMR90 cells. We found that RPL22/eL22 induced proliferation defects (Figure 2(a)) and many senescence biomarkers, including: an accumulation of cells positive for senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -gal) (Figure 2(b)), a reduction in RB phosphorylation, a decrease in the levels of the E2F target genes MCM6, FANCD2 and CENPA, a reduction in the levels of the mitotic marker H3-pS10 and a downregulation of KI67 expression (Figure 2(c,d) and Supplementary Figure S1(a)). Despite the detection of many markers of senescence, RPL22/eL22 expression did not lead to p53 accumulation or to its phosphorylation on serine 15 (Figures 2Cc and Supplementary Figure S1(a)) and we did not detect transcriptional induction of its target genes p21 (also known as CDKN1A) or GADD45A (Figure 2(d)). Moreover, we did not observe strong evidence of PML bodies or DNA damage foci accumulation (Supplementary Figure S1(b,c)) nor did we detect any strong increase in the expression of SASP components (Supplementary Figure S1(d)). In addition, low and stable expression of RPL22/eL22 reduced proliferation in p53-null PC3 cells (Figure 2(e,f)). The tumor suppressor role of RPL22/eL22 suggests that its depletion could lead to better proliferation capability but in fact its depletion decreased proliferation of IMR90 or PC3 cells (Supplementary Figure S2) reflecting its essential role in protein biosynthesis and cell growth. Together, these results suggest that RPL22/eL22, as RPS14/uS11 [16], induces cellular senescence through CDK4 inhibition and RB hypophosphorylation.

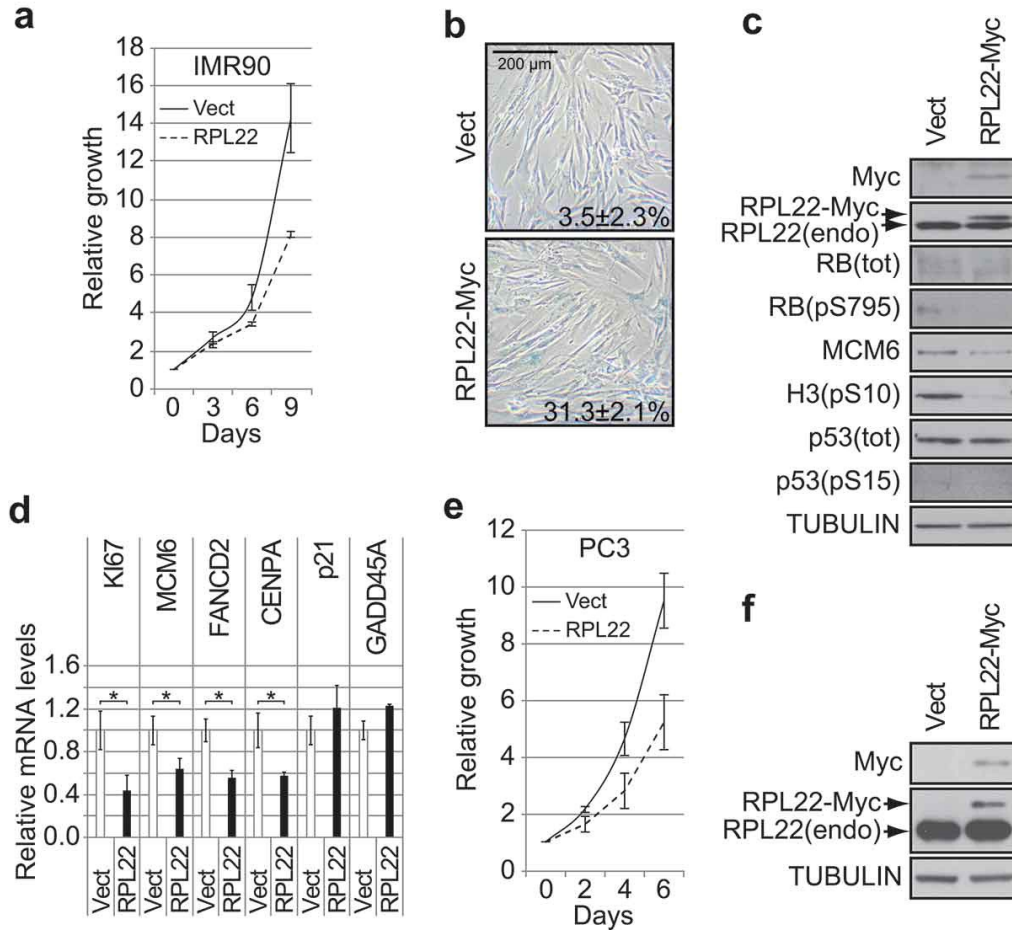


Figure 2.3 : RPL22/eL22 regulates senescence in normal human diploid fibroblasts and decreases proliferation of p53-null PC3 cells

(a) Growth curves of normal human diploid fibroblasts IMR90, expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect). Data are presented as means normalized to day 0 of each condition and error bars indicate SEM, $n = 3$ independent experiments. **(b)** SA- β -gal for cells as in (a) at day 12 post-infection. Data were quantified from 5-independent cell counts to a total of at least 150 cells in triplicate and are presented as the mean percentage of positive cells \pm SD. Scale bar, 200 μ m. **(c)** Immunoblots of the indicated proteins performed on cells as in (a) at day 12 post-infection. RB (pS795): RB phosphorylated on serine 795; RB (tot): total RB; H3(pS10): histone H3 phosphorylated on serine 10; p53(pS15): p53 phosphorylated on serine 15; p53(tot): total p53; RPL22(endo): endogenous RPL22. **(d)** QPCR for the indicated genes performed on reverse transcribed total RNA extracted from cells as in (a) at day 12 post-infection. Data are normalized over TBP and HMBS, and presented as means relative to vector infected cells. Error bars indicate SD of triplicates. * = $p < 0.05$, using two-tailed Student's t-test. **(e)** Growth curves of PC3 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect). Data are presented as means normalized to day 0 of each condition

and error bars indicate SEM, n = 3 independent experiments. **(f)** Immunoblots of the indicated proteins performed on cells as in (e) at day 7 post-infection. RPL22(endo): endogenous RPL22. Blots in C and F are representative of 3 independent experiments with similar results.

RPL22/eL22-induced senescence engage both the RB and the p53 tumor suppressor pathways

RPL22/eL22 has been shown to form a complex with the E3 ligase MDM2, the ribosomal proteins RPL5/uL18 and RPL11/uL5 and to synergize with RPL11/uL5 in the activation of p53 [9]. Considering that p53 can be activated without significant stabilization [28], it is impossible to completely exclude a role for p53 in RPL22/eL22-induced senescence from our initial results (Figure 2). In order to investigate this possibility and the preponderance of the RB or the p53 tumor suppressor pathways in the establishment of RPL22/eL22 senescence, we generated IMR90 cells stably expressing RPL22/eL22 in combination with papillomavirus oncoproteins E6 or E7. The E6 oncoprotein is known to disable p53 functions, whereas E7 inactivates the RB pathway [29]. In this model, we found that both E6 or E7 efficiently prevented reduced proliferation (Figure 3(a)) and accumulation of flat cells positive for SA- β -gal (Figure 3(b)) caused by enforced expression of RPL22/eL22. These oncoproteins also rescued the levels of the E2F target gene MCM6 and of the mitotic marker H3-pS10 (Figure 3(c)). Then, we generated IMR90 cells stably expressing RPL22/eL22 in combination with shRNAs targeting p53 or RB. Once again, we found that depletion of p53 or RB rescued the levels of MCM6 and H3-pS10 (Figure 3(d)) consolidating the result obtained with E6 and E7 (Figure 3(a-c)). Taken together, these results suggest that RPL22/eL22-induced senescence relies in part on activation of both p53 and RB pathways.

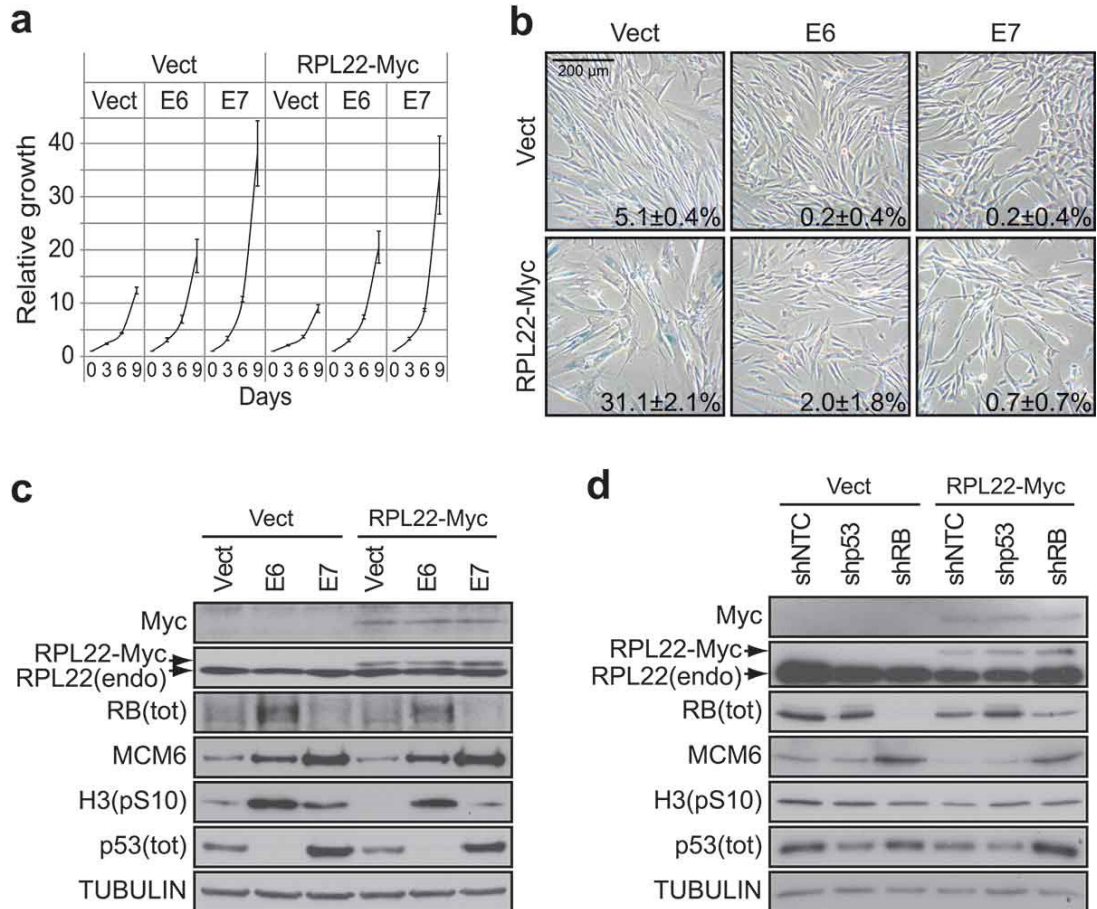


Figure 2.4 : E6 or E7 can bypass RPL22/eL22-induced senescence

(a) Growth curves of IMR90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) in combination with the expression of the viral oncoproteins E6, E7 or an empty control vector (Vect). Data are presented as means normalized to day 0 of each condition and error bars indicate SEM, $n = 3$ independent experiments. **(b)** SA- β -gal for cells as in (a) at day 12 post-infection. Data were quantified from 5-independent cell counts up to a total of at least 150 cells in triplicate and are presented as the mean percentage of positive cells \pm SD. Scale bar, 200 μ m. **(c)** Immunoblots of indicated proteins performed on cells as in (a) at day 12 post-infection. RB(tot): total RB; H3(pS10): histone H3 phosphorylated on serine 10; p53(tot): total p53; RPL22(endo): endogenous RPL22. **(d)** Immunoblots of indicated proteins performed on IMR90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) in combination with the expression of a control shRNA (shNTC), a shRNA against p53 (shp53) or a shRNA against RB (shRB) at day 12 post-infection. RB(tot): total RB; H3(pS10): histone H3 phosphorylated on serine 10; p53(tot): total p53; RPL22(endo): endogenous RPL22. Blots in C and D are representative of 3 independent experiments with similar results.

RPL22/eL22 is a CDK4 inhibitor

Because RPL22/eL22 and RPS14/uS11 were both recovered from the same CDK4 immunoprecipitate in RSL1D1 knockdown-induced senescence, were both found to interact with CDK4 and/or cyclin D1 (Figure 1) and were each able to induce a senescence phenotype in normal cells (Figure 2 and [16]), we hypothesized that RPL22/eL22 could be a direct CDK inhibitor much like RPS14/uS11 [16]. To demonstrate this, we established an *in vitro* kinase assay using purified recombinant proteins. We observed that RPL22/eL22 can effectively inhibit the CDK4-cyclin D1 phosphorylation of an RB fragment in a dose-dependent manner although less effectively than palbociclib (Figure 4(a)). Finally, to investigate a direct interaction of RPL22/eL22 with CDK4, cyclin D1 or the complex CDK4-cyclin D1, we performed GST-pull down assays with purified recombinant proteins. As reported for RPS14/uS11 [16], RPL22/eL22 can bind to both CDK4 or cyclin D1 alone but also with the complex CDK4-cyclin D1 (Figure 4(b)). These results suggest that RPL22/eL22 can act like a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) of the INK family that binds CDK4 and also of the CIP/KIP family which binds to CDK-cyclin complexes (Figure 4(c)). The fact that RPL22/eL22 and RPS14/uS11 bind to cyclin D1 alone suggest another family we named PRICC (Protein Ribosomal Inhibitor of CDK-Cyclin) (Figure 4(b,c)) [16]. Taken together, these results show that RPL22/eL22 can directly bind and inhibit the CDK4-cyclin D1 kinase activity.

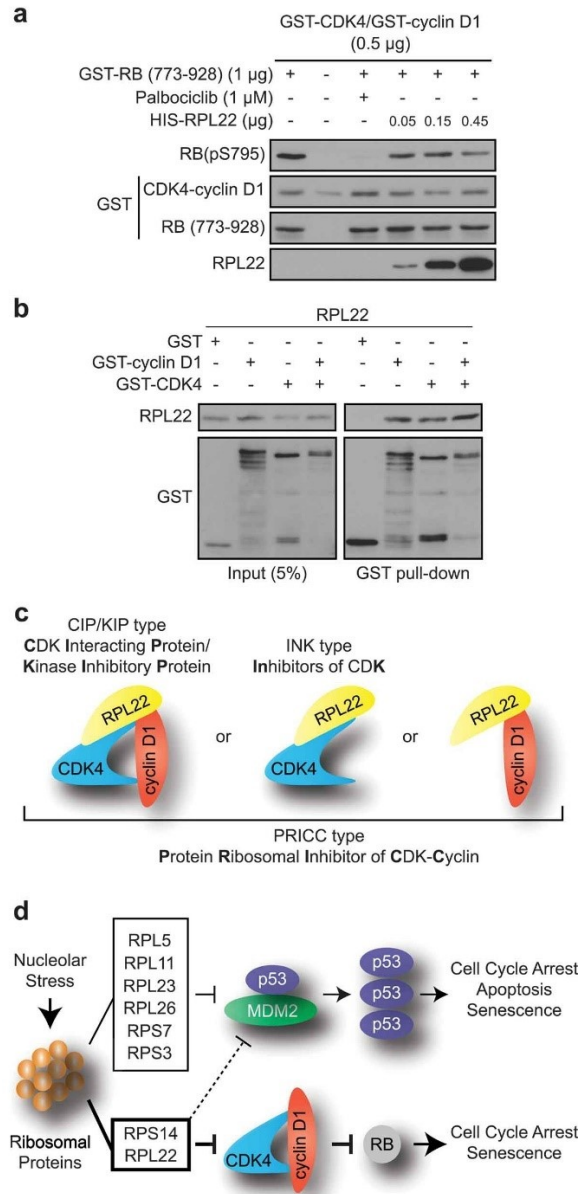


Figure 2.5 : RPL22/eL22 directly binds and inhibits CDK4-cyclin D1 complex

(a) Immunoblots of the indicated proteins after in vitro kinase assay containing ATP and GST-CDK4 and GST-cyclin D1, with or without GST-RB (773–928), palbociclib and HIS-RPL22. RB(pS795): RB phosphorylated on serine 795. **(b)** In vitro GST pull-down of recombinant GST, GST-cyclin D1 and/or GST-CDK4 and recombinant HIS-RPL22 using glutathione beads. Lysate and pull-down were immunoblotted for the indicated proteins. **(c)** Model showing interactions between RPL22 and cyclin D1, CDK4 or CDK4-cyclin D1. **(d)** Model showing how nucleolar stress can lead to activation of p53 and RB tumor suppressor pathways. Blots in A and B are representative of 3 independent experiments with similar results.

2.2.5. Discussion

Senescent cells are characterized as non-proliferative with a high rate of proteins synthesis and defects in ribosome biogenesis [16,30,31]. The SARD phenotype led to the discovery that seven ribosomal proteins can interact with CDK4 in senescent cells. Among them, we previously characterized RPS14/uS11, which can accumulate in the nucleoplasm of senescent cells and contribute to the cell cycle arrest through inhibition of CDK4-cyclin D1 complex and RB phosphorylation (Figure 4(d)) [16]. In parallel, RPL22/eL22 was identified as a partner of CDK4, suggesting an additional mechanism that explains the tumor suppressor role of this protein (Figure 1(b–d)) [9]. Effectively, RPL22/eL22 can directly inhibit CDK4-cyclin D1 kinase activity and its expression induces senescence in IMR90 cells through hypophosphorylation of RB without significant activation or stabilization of p53 (Figures 2(a–d) and 4). Moreover, RPL22/eL22 can decrease proliferation of p53-null PC3 prostate cancer cells, suggesting a p53-independent control of cell cycle progression (Figure 2(e,f)).

It is reported that RPL22/eL22, like RPS14/uS11 and many other ribosomal proteins, can bind MDM2 to inhibit its E3 ligase activity, leading to p53 stabilization after nucleolar stress (Figure 4(d)) [8,9,32–35]. We show that RPL22/eL22-induced senescence can be overcome by the papillomavirus oncoproteins E6 or E7 which, respectively, inactivate the p53 or RB tumor suppressor pathways (Figure 3(a–c)). These results imply that both pathways are implicated in the establishment of RPL22/eL22 senescence and that RPL22/eL22 expression could have subtle effects on p53 activation or p53/MDM2 interaction, which were not detected in our experimental setting (Figure 4(d)). Short treatment with Nutlin-3 can cause p53 activation without significant stabilization [28] and we propose that RPL22/eL22 could act in a similar manner. An alternative explanation is based on the report that RPL22/eL22 binds p53 mRNA and inhibits its translation [36]. In this scenario, any stabilization of p53 via MDM2 inhibition by RPL22/eL22 is cancelled by inhibition of p53 mRNA translation.

The discovery of a second ribosomal protein linking the SARD to cell cycle regulation is significant and could lead to the development of small molecules or peptides mimicking their CDK inhibitory effects. Unlike RPS14/uS11 which accumulates in the nucleoplasm, RPL22/eL22 accumulates in the nucleolus when overexpressed. It is plausible that RPL22/eL22 control a nucleolar pool of CDK4-cyclin D, which is known to phosphorylate the nucleolar transcription

factor UBF [37]. We anticipate that other ribosomal proteins might target different CDKs to strengthen the anti-proliferative effects induced by nucleolar stresses or ribosome biogenesis defects. Our work provides a rationale for identification of cell cycle regulators and development of anticancer therapy.

2.2.6. Acknowledgments

We thank Scott Lowe (MSK), Denise A. Galloway (Fred Hutchinson Cancer Center), Andrew Koff (MSK), Bob Weinberg (MIT) and Tom Moss (U. Laval) for comments and/or reagents. We thank Éric Bonneil, Francis McManus and the IRIC Proteomics Core Facility for proteomic analysis. This work was funded by grants from the CIHR (Canadian Institute of Health and Research: CIHR MOP11151) to G.F. and the CCSRI (Canadian Cancer Society Research Institute: 704223) to G.F. F.L. is supported by FRQS (Fonds de Recherche du Québec-Santé) and CRS (Cancer Research Society). G.F. is supported by the CIBC chair for breast cancer research at the CR-CHUM.

Declaration of interest statement

We have no conflict of interest to declare.

2.2.7. Supplementary data

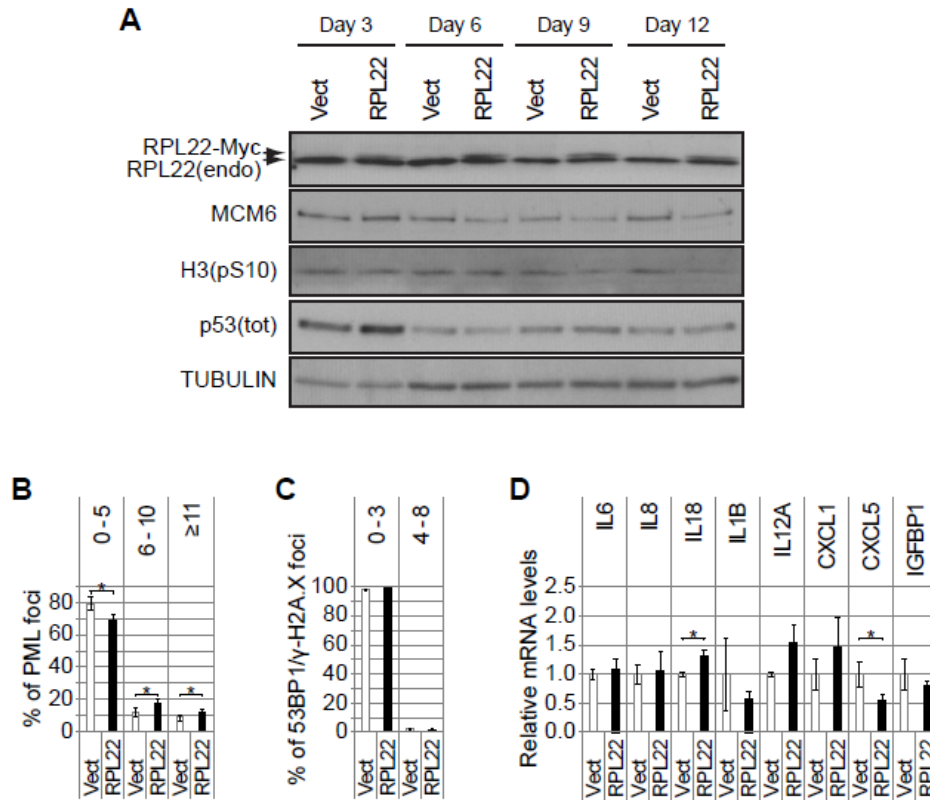


Figure S2.1 : RPL22/eL22 induces senescence but without strong induction of PML foci, DNA damage foci or SASP

(A) Immunoblots for the indicated proteins of IMR90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) and at day 3, 6, 9 or 12 post-infection. H3(pS10): histone H3 phosphorylated on serine 10; p53(tot): total p53; RPL22(endo): endogenous RPL22. Blots in D are representative of 3 independent experiments with similar results. (B-C) Indirect immunofluorescence (IF) quantification with specific anti-PML, anti-53BP1 and anti- γ H2A.X antibodies of IMR90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) and at day 12 post-infection. Data were quantified from 3-independent cell counts up to a total of at least 130 cells in triplicate and are presented as the mean percentage. Error bars indicate SD of triplicates. * = $p < 0.05$, using two-tailed Student's t-test. (B) Quantification of the percentage of cells with 0-5, 6-10 or more than 10 foci of PML per cell. (C) Quantification of the percentage of cells with 0-3 or 4-8 foci of 53BP1/ γ H2A.X per cell. (D) QPCR for the indicated genes performed on total RNA extracted from IMR90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) and at day 12 post-infection. Data are normalized over TBP and HMBS and presented as mean relative to vector infected cells. Error bars indicate SD of triplicates. * = $p < 0.05$, using two-tailed Student's t-test.

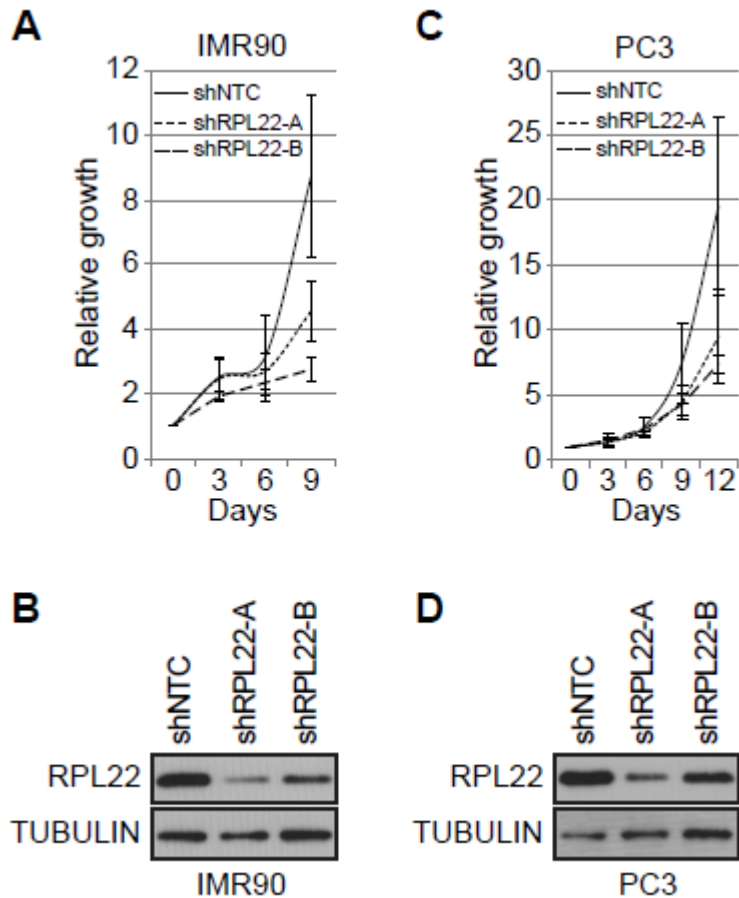


Figure S2.2 : RPL22/eL22 depletion decreases proliferation of p53-WT IMR90 and p53-null PC3 cells

(A, C) Growth curves of (A) IMR90 cells or (C) PC3 cells expressing a control shRNA (shNTC) and two shRNA against RPL22 (shRPL22-A and -B). Data are presented as means normalized to day 0 of each condition and error bars indicate SEM, n = 3 independent experiments. (B, D) Immunoblots for the indicated proteins at day 7 post-infection with a control shRNA (shNTC) and two shRNA against RPL22 (shRPL22-A and -B) in (B) IMR90 cells or (D) PC3 cells. Blots in B, D are representative of 3 independent experiments with similar results.

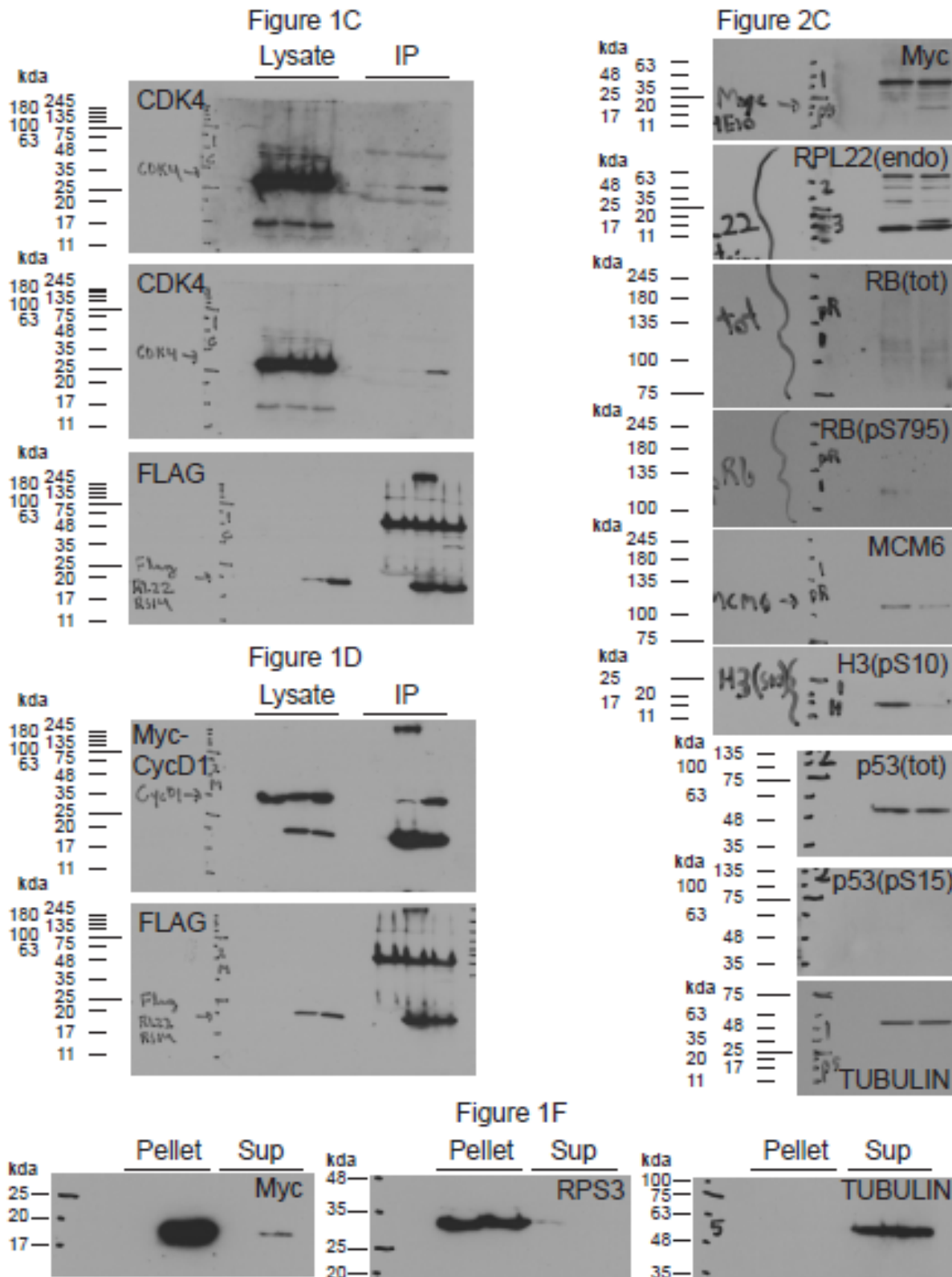


Figure S2.3 : Unprocessed blots of Figure 2.2 and 2.3C

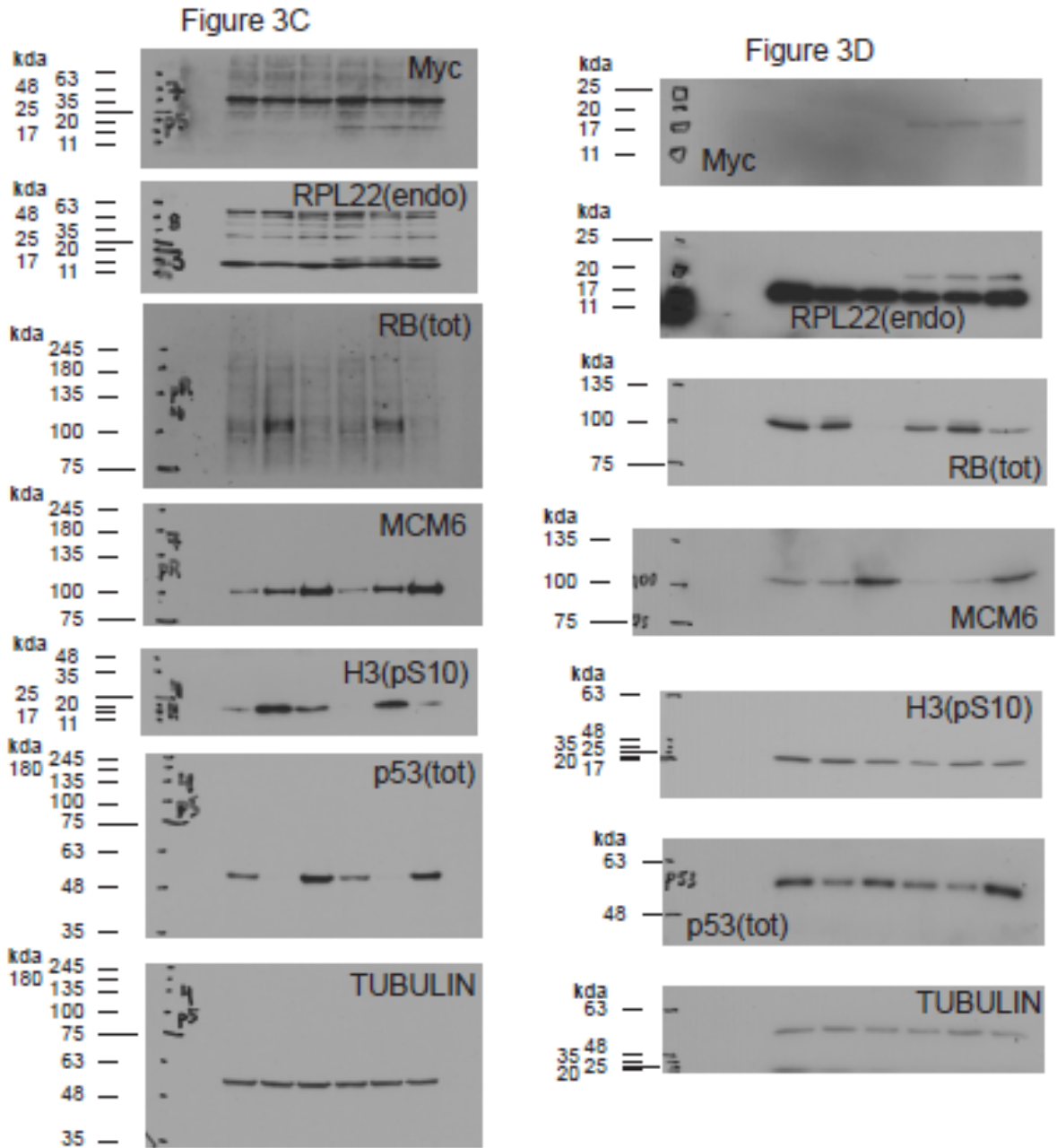
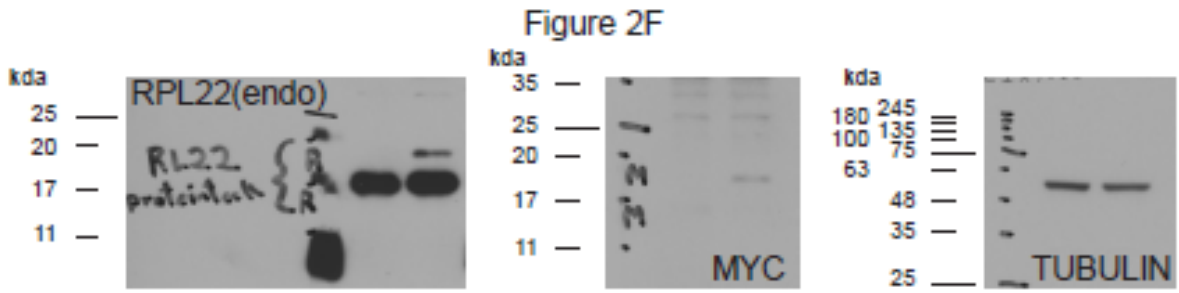


Figure S2.4 : Unprocessed blots of Figure 2.3.F and 2.4

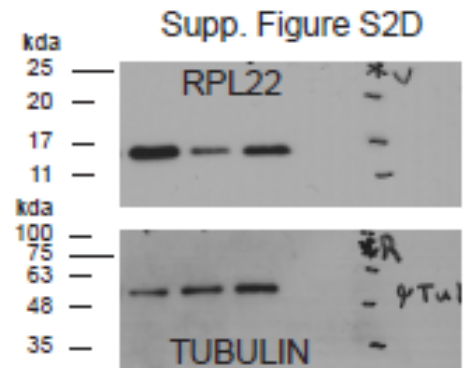
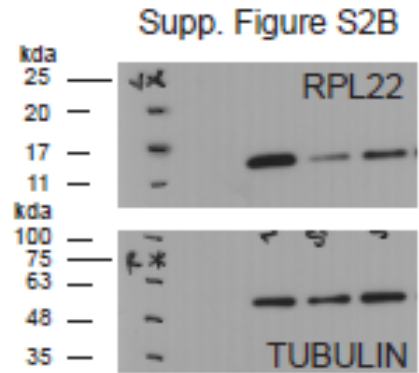
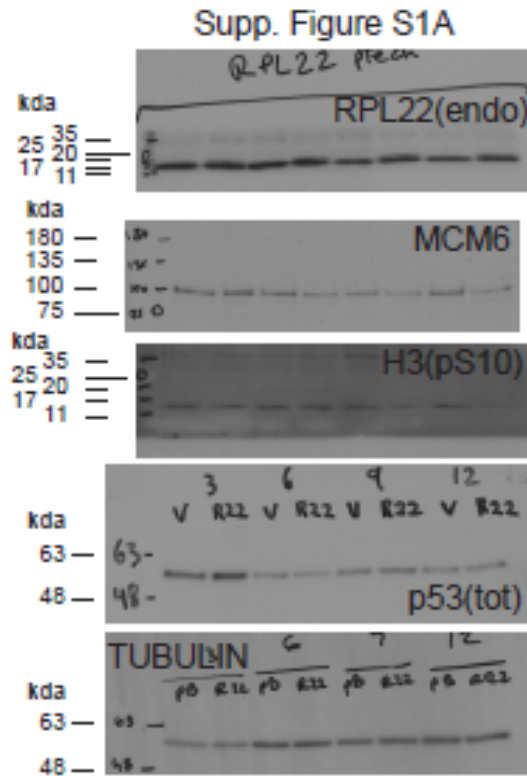
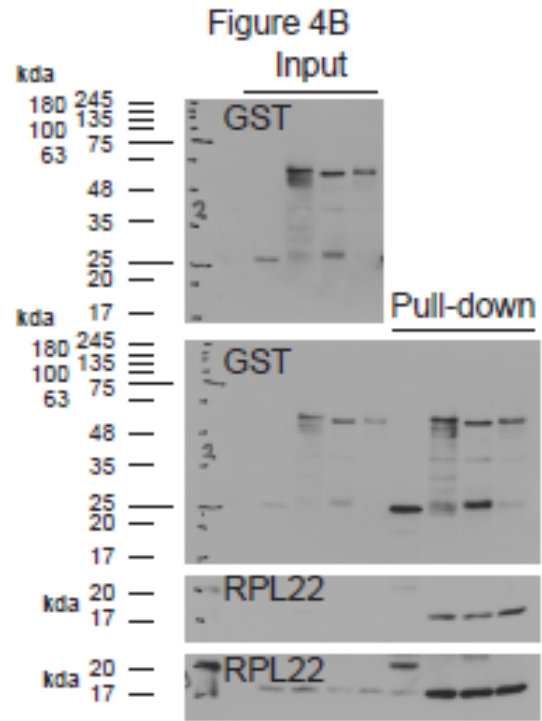
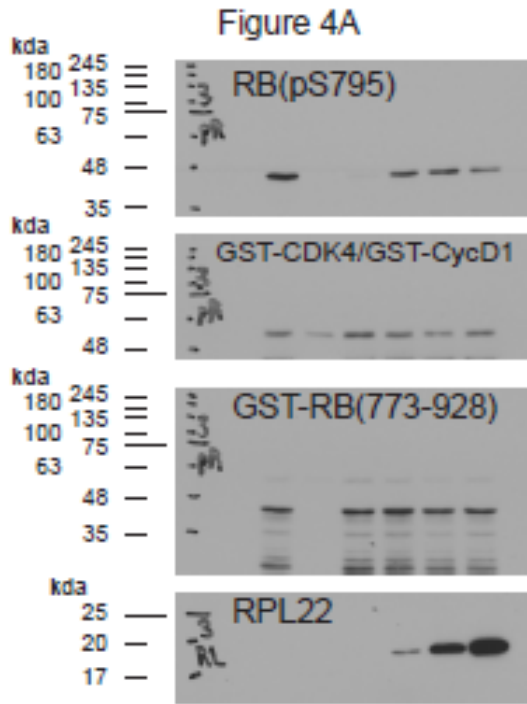


Figure S.2.5 : Unprocessed blots of Figure 2.5 and Supplementary Figures 2.1-2.2

Tableau S.2.1 : Sequence of shRNAs and qPCR & PCR cloning primers

Real-time PCR primers (gene)	5' forward primer (5'-3')	3' reverse primer (5'-3')
CDKN1A/p21	ACCCTTGTGCCTCGCTCAGG	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCTG T
CENPA	AATGGATTCTGCGATGCTGTCTG G	TTTTCAGGCCTTTGGAACGGTGTT
FANCD2	CCTTAGTAGCCGACTGAAACAG G	TGCAAGTAATGGACGCTCTG
GADD45A	TTGCAATATGACTTTGGAGGAA	CATCCCCACCTTATCCAT
HMBS	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC
IL6	CCAGGAGCCCAGCTATGAACTC	AAGGCAGCAGGCAACACCAG
IL8	GGCACAACTTTCAGAGACAGC A	GGCAAACTGCACCTTCACACA
KI67	AGAAGACAGTACCGCAGATGA	CGGCTCACTAATTTAACGCTGG
MCM6	ATCCCTCTTGCCAAGGATT	GAAAAGTTCCGCTCACAAGC
TBP	GCTGGCCCATAGTGATCTTTGC	CTTCACACGCCAAGAAACAGTGA
IL18	GCTGCCAACTCTGGCTGCTAAA	TCAGCAGCCATCTTTATTCTG
IL1B	CTCCGGGACTCACAGCAAAAA	AAGGACATGGAGAACACA ACTT G
IL12A	ACCACTCCCAAACCTGCTGAG	CAATCTCTCAGAAGTGCAAGGG TA
CXCL1	TCCTGCATCCCCCATAGTTA	CTTCAGGAACAGCCACCAGT
CXCL5	TCTGCTATGCTATTGAAGTTTTG G	TCACCTACAATTCAAGACACTTT GA
IGFBP1	GAGTTTAGCCAAGGCACAGGAG A	AGTCCCGCCTCTCCATCCAT

PCR cloning primers		
RPL22(WT)-Myc	CGCGGATCCACCATGGCTCCTGT GAAAAAGCTTG	ACGCGTCGACTTATGCCAGATCC TCTTCTGAGATG
shRNAs		
Name	Vector	Sequence (sense strand 5'-3')
shNTC	pLKO	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
shRPL22-A	pLKO	GTTCTGAAGTTCACCTCTTGAT
shRPL22-B	pLKO	CGAATTACGTTACTTCCAGAT
shNTC	MSCV	AATTGATGTGTTTAGTCGCTAG
shRB	MSCV	GCAGTTCGATATCTACTGAAATA
shp53	MSCV	GACTCCAGTGGTAATCTAC

Tableaux S2.2 : Statistics source data for qPCR, growth curves, SA-β-gal and IF

Fig 2.2E	Percent of nucleolar localization					
	n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
Cells	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
Vector	4.76	1.65	10.19	4.72	7.73	5.90
RPL22	35.48	19.70	62.57	18.54	61.15	13.02
Fig 2.3B	SA-b-gal staining (% of blue cells)					
	n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
Cells	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
Vector	1.33	1.83	5.84	3.62	3.33	4.08
RPL22	30.98	6.62	33.59	9.62	29.44	4.43

Fig 2.3D		Relative mRNA levels					
		n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
mRNA	Cells	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
KI67	Vector	1.00	0.06	0.70	0.08	0.83	0.02
	RPL22	0.33	0.04	0.29	0.01	0.50	0.03
MCM6	Vector	1.00	0.04	0.76	0.05	0.89	0.06
	RPL22	0.62	0.02	0.61	0.04	0.48	0.04
FANCD2	Vector	1.00	0.02	0.81	0.01	0.90	0.06
	RPL22	0.56	0.06	0.50	0.01	0.44	0.05
CENPA	Vector	1.00	0.07	0.72	0.05	0.85	0.06
	RPL22	0.52	0.02	0.47	0.03	0.49	0.01
p21	Vector	1.00	0.09	1.10	0.03	0.84	0.03
	RPL22	0.96	0.08	1.36	0.12	1.23	0.19
GADD45A	Vector	1.00	0.10	1.17	0.07	1.15	0.02
	RPL22	1.41	0.04	1.21	0.02	1.47	0.94

Fig 2.3E Relative growth

Cells	Days	n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
		Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
Vector	0	1.00	0.01	1.00	0.003	1.00	0.003
	2	1.94	0.11	2.22	0.16	2.35	0.04
	4	3.67	0.15	4.65	0.53	5.64	0.24
	6	7.61	0.22	10.05	0.40	10.87	0.21
RPL22	0	1.00	0.002	1.00	0.003	1.00	0.01
	2	1.19	0.06	1.64	0.11	2.08	0.03
	4	1.72	0.18	2.96	0.15	3.77	0.59
	6	3.74	0.21	4.96	1.04	7.02	0.44

Fig 2.4A Relative growth

Cells	Days	n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)		
		Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	
Vector	Vector	0	1.00	0.002	1.00	0.004	1.00	0.005
		3	2.61	0.42	2.42	0.00	2.40	0.16
		6	4.31	0.19	4.47	0.23	4.66	0.16
		9	13.25	0.32	12.62	0.60	11.20	0.99

E6	0	1.00	0.0004	1.00	0.01	1.00	0.01	
	3	3.63	0.12	3.02	0.07	2.41	0.14	
	6	8.05	0.46	7.26	0.22	5.68	0.39	
	9	24.09	1.10	19.25	0.31	13.43	0.32	
E7	0	1.00	0.005	1.00	0.005	1.00	0.01	
	3	3.97	0.51	3.43	0.20	2.83	0.18	
	6	11.82	0.85	10.21	1.84	10.35	1.07	
	9	49.57	3.92	36.94	1.61	28.23	1.53	
RPL22	Vector	0	1.00	0.001	1.00	0.002	1.00	0.002
		3	2.32	0.08	1.95	0.11	2.13	0.20
		6	3.92	0.30	3.34	0.16	3.70	0.21
		9	10.29	1.28	8.95	0.88	7.87	0.59
E6	0	1.00	0.002	1.00	0.01	1.00	0.002	
	3	3.22	0.29	3.14	0.16	2.57	0.12	
	6	7.44	0.74	8.03	0.39	6.52	0.27	
	9	25.88	4.32	20.15	1.25	15.38	1.87	
E7	0	1.00	0.001	1.00	0.01	1.00	0.005	
	3	3.72	0.21	3.19	0.19	3.08	0.14	
	6	9.36	1.49	8.75	0.30	8.14	0.42	
	9	48.04	7.24	31.28	3.09	23.09	2.23	

Fig 2.4B SA-b-gal staining (% of blue cells)							
		n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
Cells		Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
Vector	Vector	4.67	1.83	5.33	3.80	5.33	1.83
	E6	0.67	1.49	0.00	0.00	0.00	0.00
	E7	0.67	1.49	0.00	0.00	0.00	0.00
RPL22	Vector	32.67	5.96	32.00	6.06	28.67	5.58
	E6	3.33	2.36	2.67	5.96	0.00	0.00
	E7	1.33	1.83	0.00	0.00	0.67	1.49

Fig S2.1C Percent of 53BP1/γ-H2A.X foci							
		n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
foci	Cells	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
0_3	Vector	98.38	1.63	97.3	3.59	97.53	3.21
	RPL22	97.74	2.01	99.43	0.99	98.47	1.39
04_08	Vector	1.62	1.63	2.7	3.59	2.47	3.21
	RPL22	2.26	2.01	0.57	0.99	1.53	1.39

Fig S2.1C		Percent of 53BP1/γ-H2A.X foci					
foci	Cells	n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
		Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
0_3	Vector	98.38	1.63	97.3	3.59	97.53	3.21
	RPL22	97.74	2.01	99.43	0.99	98.47	1.39
04_08	Vector	1.62	1.63	2.7	3.59	2.47	3.21
	RPL22	2.26	2.01	0.57	0.99	1.53	1.39

Fig S2.1D		Relative mRNA levels					
mRNA	Cells	n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
		Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
IL6	Vector	1.00	0.09	1.11	0.03	0.92	0.10
	RPL22	0.98	0.01	1.30	0.03	0.96	0.05
IL8	Vector	1.00	0.15	1.35	0.09	1.05	0.03
	RPL22	0.91	0.06	1.60	0.12	1.08	0.04
IL18	Vector	1.00	0.24	0.95	0.13	0.95	0.13
	RPL22	1.28	0.07	1.18	0.14	1.38	0.15
IL1B	Vector	1.00	0.01	2.58	0.38	0.95	0.08
	RPL22	0.65	0.01	0.83	0.04	1.09	0.16
IL12A	Vector	1.00	0.05	1.02	0.09	1.07	0.03
	RPL22	1.52	0.06	1.33	0.16	1.93	0.05
CXCL1	Vector	1.00	0.08	0.79	0.08	1.36	0.14
	RPL22	2.05	0.05	1.58	0.20	1.01	0.14

CXCL5	Vector	1.00	0.15	0.81	0.10	0.65	0.04
	RPL22	0.49	0.10	0.36	0.05	0.51	0.04
IGFBP1	Vector	1.00	0.18	1.64	0.09	1.2	0.04
	RPL22	1.11	0.13	1.07	0.16	0.89	0.06

Fig S2.2A		Relative growth					
Cells	Days	n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
		Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
shNTC	0	1.00	0.01	1.00	0.05	1.00	0.005
	3	1.76	0.14	3.75	0.20	1.98	0.07
	6	2.38	0.16	6.96	0.62	4.52	0.04
	9	5.07	1.24	13.47	1.41	7.59	0.59
shRPL22-A	0	1.00	0.06	1.00	0.08	1.00	0.01
	3	1.93	0.17	3.62	0.08	1.79	0.09
	6	1.95	0.15	3.77	0.21	2.31	0.19
	9	3.30	0.23	6.44	0.16	3.89	0.13
shRPL22-B	0	1.00	0.06	1.00	0.05	1.00	0.06
	3	1.76	0.20	2.19	0.03	1.83	0.03
	6	1.59	0.05	3.12	0.005	2.34	0.05
	9	2.05	0.02	3.11	0.16	3.12	0.17

Fig S2.2C		Relative growth					
Cells	Days	n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
		Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
shNTC	0	1.00	0.11	1.00	0.03	1.00	0.08
	3	0.81	0.07	2.01	0.02	1.46	0.01
	6	1.55	0.02	3.92	0.15	2.3	0.21
	9	2.42	0.05	13.07	0.49	6.87	0.41
	12	9.67	0.65	33.01	1.42	15.95	0.78
shRPL22-A	0	1.00	0.03	1.00	0.02	1.00	0.11
	3	0.97	0.07	1.77	0.15	1.23	0.01
	6	1.53	0.14	2.59	0.04	1.78	0.05
	9	2.64	0.27	7.03	0.32	3.5	0.14
	12	5.87	0.84	16.71	1.81	5.68	0.98
shRPL22-B	0	1.00	0.02	1.00	0.03	1.00	0.02
	3	0.83	0.04	1.86	0.17	2.11	0.05
	6	ND	ND	2.2	0.07	2.57	0.11
	9	2.8	0.12	4.57	0.24	5.66	0.62
	12	6.66	0.47	6.94	0.31	8.82	0.24

Tableau S2.3 : Less stringent analysis of CDK4(K35M) interactome in RSL1D1 knockdown-induced senescence

List of proteins that were identified to immunoprecipitate with 3xFLAG-CDK4(K35M) in IMR90 cells induced into senescence by depletion of RSL1D1 as reported in (12) using a protein threshold consisting of P-value < 0.05 and minimum peptides # = 1. Source data can be found in (12)

Swiss Prot ID	Symbol	Protein names
P38936	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
Q16543	CDC37	Hsp90 co-chaperone Cdc37
P24385	CCND1	G1/S-specific cyclin-D1 (B-cell lymphoma 1 protein))
P07900	HSP90A	Heat shock protein HSP 90-alpha (Renal carcinoma antigen NY-REN-38)
P42772	CDKN2B	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B
P12004	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)
P30281	CCND3	G1/S-specific cyclin-D3
P15924-2	DESP	Desmoplakin
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin-1
P68431	H31	Histone H3.1
Q02413	DSG1	Desmoglein-1
P04908	H2A isoforms	Histone H2A type 1-B/E
O60814	H2B1K	Histone H2B type 1-K
P42773	CDKN2C	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor C
Q04837	SSBP	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial
P14543-2	NID	Nidogen-1
P09382	LEG1	Galectin-1
P07942	LAMB1	Laminin subunit beta-1 beta
P62805	H4	Histone H4
Q9Y2D5	AKAP2	A-kinase anchor protein 2

P62807	H2B1C	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I
P08107	HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1B
P46527	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
Q8WUM4	PDC6I	Programmed cell death 6-interacting protein 4
P05089	ARG1I	Arginase-1
P31943	HNRH isoform	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H isoform
P05556	ITB1	Integrin beta-1
P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1
Q08554	DSC1	Desmocollin-1
Q14247-2	SRC8	Src substrate cortactin 2
Q8NC51-2	PAIRB	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein 2
Q05682-2	CALD1	Caldesmon 2
P62263	RS14	40S ribosomal protein S14
P12273	PIP	Prolactin-inducible protein
P23528	COF1	Cofilin--1
O43707		Alpha-actinin-4
P14174	MIF1	Macrophage migration inhibitory factor
P31944	CASPE	Caspase-14
P33778	H2B1 Isoform	Histone H2B type 1-B
P47929	LEG7	Galectin-7
P02765	FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein

P10809	CH60	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
P14649	MYL6B	Myosin light chain 6B
P18124	RL7	60S ribosomal protein L7
P24941	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
P26599-2	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1
P27816-5	MAP4	Microtubule-associated protein 4
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3
P35268	RL22	60S ribosomal protein L22
P55273	CDKN2D	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D
P61247	RS3A	40S ribosomal protein S3a
P61313	RL15	60S ribosomal protein L15
P61978-2	HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
P62701	RPS4X	40S ribosomal protein S4, X isoform
P83731	RL24	60S ribosomal protein L24
Q15942	ZYX	Zyxin
Q6KB66-2	KRT6	Keratin, type II cytoskeletal 80
Q8WX93	PALLD	Palladin
Q92626	PXDN	Peroxidasin homolog
Q9BUF5	TBB6	Tubulin beta-6 chain
P23588	IF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B

2.2.8. References

1. Tafforeau L, Zorbas C, Langhendries JL, Mullineux ST, Stamatopoulou V, Mullier R, et al. The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. *Mol Cell*. 2013;51(4):539-51. Epub 2013/08/27. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.011. PubMed PMID: 23973377.
2. Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer*. 2003;3(3):179-92. Epub 2003/03/04. doi: 10.1038/nrc1015. PubMed PMID: 12612653.
3. White RJ. RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(1):69-78. Epub 2005/02/03. doi: 10.1038/nrm1551. PubMed PMID: 15688068.
4. Mullineux ST, Lafontaine DL. Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie*. 2012;94(7):1521-32. Epub 2012/02/22. doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.001. PubMed PMID: 22342225.
5. White RJ. RNA polymerases I and III, non-coding RNAs and cancer. *Trends Genet*. 2008;24(12):622-9. Epub 2008/11/05. doi: 10.1016/j.tig.2008.10.003. PubMed PMID: 18980784.
6. Dai MS, Lu H. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem*. 2004;279(43):44475-82. Epub 2004/08/17. doi: 10.1074/jbc.M403722200. PubMed PMID: 15308643.
7. Lohrum MAE, Ludwig RL, Kubbutat MHG, Hanlon M, Vousden KH. Regulation of MDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell*. 2003;3(6):577-87. doi: 10.1016/s1535-6108(03)00134-x.
8. Zhou X, Hao Q, Liao J, Zhang Q, Lu H. Ribosomal protein S14 unties the MDM2-p53 loop upon ribosomal stress. *Oncogene*. 2013;32(3):388-96. Epub 2012/03/07. doi: 10.1038/onc.2012.63. PubMed PMID: 22391559; PubMed Central PMCID: PMC3736832.
9. Cao B, Fang Z, Liao P, Zhou X, Xiong J, Zeng S, et al. Cancer-mutated ribosome protein L22 (RPL22/eL22) suppresses cancer cell survival by blocking p53-MDM2 circuit. *Oncotarget*. 2017;8(53):90651-61. Epub 2017/12/07. doi: 10.18632/oncotarget.21544. PubMed PMID: 29207594; PubMed Central PMCID: PMC5710875.

10. Deschenes-Simard X, Lessard F, Gaumont-Leclerc MF, Bardeesy N, Ferbeyre G. Cellular senescence and protein degradation: breaking down cancer. *Cell Cycle*. 2014;13(12):1840-58. Epub 2014/05/29. doi: 10.4161/cc.29335. PubMed PMID: 24866342; PubMed Central PMCID: PMC4111748.
11. Deschenes-Simard X, Gaumont-Leclerc MF, Bourdeau V, Lessard F, Moiseeva O, Forest V, et al. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev*. 2013;27(8):900-15. Epub 2013/04/20. doi: 10.1101/gad.203984.112. PubMed PMID: 23599344; PubMed Central PMCID: PMC3650227.
12. Lessard F, Igelmann S, Trahan C, Huot G, Saint-Germain E, Mignacca L, et al. Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway. *Nat Cell Biol*. 2018;20(7):789-99. Epub 2018/06/27. doi: 10.1038/s41556-018-0127-y. PubMed PMID: 29941930.
13. Goudarzi KM, Lindstrom MS. Role of ribosomal protein mutations in tumor development (Review). *Int J Oncol*. 2016;48(4):1313-24. Epub 2016/02/20. doi: 10.3892/ijo.2016.3387. PubMed PMID: 26892688; PubMed Central PMCID: PMC4777597.
14. Rao S, Lee, S-Y., Gutierrez, A., Perrigoue, J., Thapa, R.J., Tu, Z., Jeffers, J.R., Rhodes, M., Anderson, S., Oravec, T., Hunger, S.P., Timakhov, R.A., Zhang, R., Balachandran, S., Zambetti, G.P., Testa, J.R., Look, A.T. and Wiest, D.L. Inactivation of ribosomal protein L22 promotes transformation by induction of the stemness factor, Lin28B. *Blood*. 2012;120(18):3764-73. doi: 10.1182/blood-2012-03-415349.
15. Novetsky AP, Zigelboim I, Thompson DM, Jr., Powell MA, Mutch DG, Goodfellow PJ. Frequent mutations in the RPL22 gene and its clinical and functional implications. *Gynecol Oncol*. 2013;128(3):470-4. Epub 2012/11/07. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.10.026. PubMed PMID: 23127973; PubMed Central PMCID: PMC3845021.
16. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502(7471):333-9. Epub 2013/10/18. doi: 10.1038/nature12634. PubMed PMID: 24132290; PubMed Central PMCID: PMC3927368.
17. Ferreira AM, Tuominen I, van Dijk-Bos K, Sanjabi B, van der Sluis T, van der Zee AG, et al. High frequency of RPL22 mutations in microsatellite-unstable colorectal and endometrial

tumors. *Hum Mutat.* 2014;35(12):1442-5. Epub 2014/09/10. doi: 10.1002/humu.22686. PubMed PMID: 25196364.

18. Nagarajan N, Bertrand D, Hillmer AM, Zang ZJ, Yao F, Jacques PE, et al. Whole-genome reconstruction and mutational signatures in gastric cancer. *Genome Biol.* 2012;13(12):R115. Epub 2012/12/15. doi: 10.1186/gb-2012-13-12-r115. PubMed PMID: 23237666; PubMed Central PMCID: PMC4056366.

19. Ajore R, Raiser D, McConkey M, Joud M, Boidol B, Mar B, et al. Deletion of ribosomal protein genes is a common vulnerability in human cancer, especially in concert with TP53 mutations. *EMBO Mol Med.* 2017;9(4):498-507. Epub 2017/03/08. doi: 10.15252/emmm.201606660. PubMed PMID: 28264936; PubMed Central PMCID: PMC5376749.

20. Yang M, Sun H, Wang H, Zhang S, Yu X, Zhang L. Down-regulation of ribosomal protein L22 in non-small cell lung cancer. *Med Oncol.* 2013;30(3):646. Epub 2013/06/26. doi: 10.1007/s12032-013-0646-0. PubMed PMID: 23797773.

21. Vernier M, Bourdeau V, Gaumont-Leclerc MF, Moiseeva O, Begin V, Saad F, et al. Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev.* 2011;25(1):41-50. Epub 2011/01/06. doi: 10.1101/gad.1975111. PubMed PMID: 21205865; PubMed Central PMCID: PMC3012935.

22. Allen MA, Andrysiak Z, Dengler VL, Mellert HS, Guarnieri A, Freeman JA, et al. Global analysis of p53-regulated transcription identifies its direct targets and unexpected regulatory mechanisms. *Elife.* 2014;3:e02200. Epub 2014/05/29. doi: 10.7554/eLife.02200. PubMed PMID: 24867637; PubMed Central PMCID: PMC4033189.

23. Mallette FA, Goumard S, Gaumont-Leclerc MF, Moiseeva O, Ferbeyre G. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene.* 2004;23(1):91-9. Epub 2004/01/09. doi: 10.1038/sj.onc.1206886. PubMed PMID: 14712214.

24. Dorr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, Dabritz JH, et al. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature.* 2013;501(7467):421-5. Epub 2013/08/16. doi: 10.1038/nature12437. PubMed PMID: 23945590.

25. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853-68. Epub 2008/12/05. doi: 10.1371/journal.pbio.0060301. PubMed PMID: 19053174; PubMed Central PMCID: PMCPMC2592359.
26. Donati G, Peddigari S, Mercer CA, Thomas G. 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2-p53 checkpoint. *Cell Rep.* 2013;4(1):87-98. Epub 2013/07/09. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.045. PubMed PMID: 23831031; PubMed Central PMCID: PMCPMC3928573.
27. Sloan KE, Bohnsack MT, Watkins NJ. The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep.* 2013;5(1):237-47. Epub 2013/10/15. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.049. PubMed PMID: 24120868; PubMed Central PMCID: PMCPMC3808153.
28. Horn HF, Vousden KH. Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene.* 2008;27(44):5774-84. Epub 2008/06/19. doi: 10.1038/onc.2008.189. PubMed PMID: 18560357.
29. Marechal V, Elenbaas B, Piette J, Nicolas JC, Levine AJ. The Ribosomal L5 Protein Is Associated with Mdm-2 and Mdm-2-P53 Complexes. *Molecular and Cellular Biology.* 1994;14(11):7414-20. doi: Doi 10.1128/Mcb.14.11.7414. PubMed PMID: WOS:A1994PM68400040.
30. Rashkovan M, Vadnais C, Ross J, Gigoux M, Suh WK, Gu W, et al. Miz-1 regulates translation of Trp53 via ribosomal protein L22 in cells undergoing V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(50):E5411-9. Epub 2014/12/04. doi: 10.1073/pnas.1412107111. PubMed PMID: 25468973; PubMed Central PMCID: PMCPMC4273400.

3. Découverte des E3 ubiquitine ligases impliquées dans la sénescence

3.1. Présentation de l'article 2

Ce projet découle de la publication de notre laboratoire en 2013, dans laquelle nous avons décrit l'existence d'un programme de dégradation de protéines spécifiques dans les cellules sénescents (SAPD)²¹⁰. Ce programme de dégradation est effectué par le système ubiquitine-protéasome, dont sa spécificité est principalement assurée par des enzymes E3 ubiquitine ligases. L'objectif de ce deuxième article était d'identifier des gènes d'E3 ubiquitine ligase critiques pour la sénescence induite par l'oncogène *RAS*. Afin d'y parvenir, nous avons effectué un criblage génétique à l'aide d'une bibliothèque de shARN ciblant des gènes d'E3 ubiquitine ligases dans le contexte de la sénescence induite par les oncogènes. Cette approche a mené à l'identification de l'E3 ubiquitine ligase ASB14 comme étant importante pour la sénescence induite par l'oncogène *RAS*. Ce deuxième article a pour but de mieux comprendre le rôle d'ASB14 dans la sénescence cellulaire et la suppression tumorale.

Cet article est en préparation. J'ai contribué à toutes les figures et au développement du projet. Benjamin Le Calvé a effectué le criblage génétique menant à la découverte d'ASB14. Jordan Guillon a effectué des *western blots* menant à la figure 6 et a apporté du support technique. Véronique Bourdeau a contribué dans la caractérisation des isoformes d'ASB14 ainsi que dans les clonages. Amaia Lujambio et Scott Lowe ont élaboré la bibliothèque de shARN utilisée pour le criblage. Nabeel Bardesy a fourni les échantillons de patients analysés dans la figure 3. Au niveau de l'écriture, j'ai conçu l'ensemble des figures et rédigé les légendes, la section matériel et méthodes et la discussion. Gerardo Ferbeyre a rédigé les autres sections.

3.2. Article 2

The E3 ubiquitin ligase ASB14 mediates oncogene induced senescence and is downregulated in pancreatic ductal adenocarcinoma

Ana Fernández Ruiz¹, Benjamin Le Calvé², Jordan Guillon¹, Véronique Bourdeau³, Amaia Lujambio⁴, Scott Lowe⁵, Nabeel Bardeesy⁶ and Gerardo Ferbeyre^{1,3*}.

Affiliations:

¹CRCHUM, 900 Saint-Denis – Montréal, QC H2X 0A9 – Canada

²URBC - NARILIS, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium.

³Department of Biochemistry and Molecular Medicine; Université de Montréal; C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7; Canada.

⁴Department of Oncological Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York.

⁵Department of Cancer Biology and Genetics, Sloan Kettering Institute, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA.

⁶Cancer Center, Center for Regenerative Medicine, and Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Harvard University, Boston, Massachusetts.

Keywords: E3 ubiquitin ligases, senescence, protein degradation, ASB, SAPD.

Contact:

*Correspondence to: g.ferbeyre@umontreal.ca

3.2.1. Summary

Cellular senescence is a tumor suppressor program characterized by a stable cell cycle arrest. Senescence is associated with widespread molecular changes, including the activation of a selective degradation program. This mechanism is mediated by the ubiquitin-proteasome system which is tightly regulated by E3 ubiquitin ligases. Here we performed an unbiased shRNA screening to discover E3 ubiquitin ligases genes implicated in oncogene-induced senescence. We thus identified the E3 ubiquitin ligase Ankyrin repeat and SOCS-box containing protein (ASB) 14 as important for Ras-induced senescence. ASB14 is a poorly characterized E3 ubiquitin ligase, and its knockdown leads to a Ras-induced senescence bypass in murine and human cellular models. Immunohistochemical analysis revealed that ASB14 is highly expressed in the normal pancreas tissues whereas its expression is reduced in pancreatic cancer tissues, suggesting a tumor suppressor role for this E3 ligase. We also uncovered the interactome of ASB14 in Ras-induced senescence. Taken together, our data suggest that the E3 ubiquitin ligase ASB14 is a mediator of senescence and tumor suppression.

3.2.2. Introduction

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is asymptomatic in its early stages but highly lethal by the time it is diagnosed. Surgery can be effective in cases that remain localized but for most patients the 5-year survival rate is only 15-20% (Huang et al., 2015). The biology of PDAC is beginning to be understood. Activating mutations in KRAS are very common while inactivation of the tumor suppressors p53, SMAD4 and CDKN2A occurs at high rates (Jones et al., 2008; Waddell et al., 2015). Activation of oncogenic RAS in primary cells leads to oncogene-induced senescence (OIS) suggesting that this process occurs at early stages of PDAC formation. In fact, benign lesions of the pancreas known as pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) are considered precursors of PDAC and contain abundant senescent pancreatic epithelial cells (Caldwell et al., 2012; Carriere et al., 2011). The transition from PanIN to PDAC is not well understood but cells that progress along this pathway must avoid or escape OIS (Deschenes-Simard et al., 2019; Guerra et al., 2011).

OIS acts early during tumorigenesis to halt cell proliferation in cells that acquire oncogenic mutations (Collado and Serrano, 2010). The resulting senescent cells can be eliminated by the immune system or persist as benign tumors (Collado and Serrano, 2010). OIS is mediated by

several tumor suppressors acting in the ARF/p53 pathway (Sinha et al., 2015) and the p16INK4a/RB pathway (Sherr, 2012; Vernier et al., 2011). Several mechanisms have been proposed to link oncogenic activity to the tumor suppressors that mediate senescence. The best understood implicates DNA damage as a consequence of DNA replication stress and/or reactive oxygen species (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007; Parisotto et al., 2018). However, senescence can be induced without DNA damage or in cells with inactivation of the DNA damage signalling pathway (Astle et al., 2011; Baell et al., 2018; Jeanblanc et al., 2012; Lin et al., 2010; Mallette and Ferbeyre, 2007). In addition to DNA damage, oncogenic activity induces selective protein degradation implicating both autophagy and the ubiquitin-proteasome system (Acevedo et al., 2016; Deschênes-Simard et al., 2013; Deschênes-Simard et al., 2014; Liu et al., 2019; Young et al., 2009). However, how these protein degradation pathways are engaged to trigger senescence is still poorly understood.

The ubiquitin proteasome system (UPS) regulates multiple cell functions and therefore can act either as a driver or a suppressor of tumorigenesis. Ubiquitination is mediated by a cascade of enzymatic reactions catalyzed by ubiquitin activating enzymes (E1), ubiquitin conjugating enzymes (E2) and the ubiquitin ligases (E3). Substrates for ubiquitination and subsequent degradation are recognized by the more than 600 members of the E3 ubiquitin ligase family (Senft et al., 2018). E3 ubiquitin ligases that recognize proteins involved in cell proliferation and survival acts as tumor suppressors and they include proteins such as VHL (Kondo et al., 2003), FBW7 (Inuzuka et al., 2011) and SMURF2 (David et al., 2013). Senescence Associated Protein Degradation (SAPD) involves the UPS (Deschênes-Simard et al., 2013) but the E3 ligases that mediate substrate recognition were not identified. Here, we used a library of 8000 small hairpin RNAs comprising all E3 ligases of the mouse genome to identify genes that are required for OIS. We found that the E3 ubiquitin ligase ASB14 is required for RAS-induced senescence. ASB14 is part of a poorly characterized E3 ligase family with 18 members (ASB1-ASB18) that contain Ankyrin repeats and the SOCS Box (ASB) (Kohroki et al., 2005). Intriguingly, ASB14 is highly expressed in the exocrine pancreas but downregulated in pancreatic cancer. We also unravelled the interactome of ASB14 bringing new insights into how E3 ligases can mediate tumor suppression and cellular senescence.

3.2.3. Materials and methods

shRNA library construction

The shRNA library was provided by Dr Scott Lowe and contained more than 8000 shRNAs that target mouse E3 ubiquitin ligase genes and control sequences. Each E3 ligase was targeted by 3 different shRNAs.

shRNA screening

500 000 MEFs were transduced with the shRNA library at an efficiency of transduction of less than 30% to avoid multiple shRNAs in cells. The senescence phenotype was induced by the co-transduction with the oncogene H-RAS. The emerging clones, until day 12 and day 18 after senescence induction, were amplified and genomic DNA was extracted with SNET buffer (10 mM Tris pH 8.0, 0.1M EDTA, 0.5% SDS, 0.1mg/ml Proteinase K, 25 mg/ml RNase A). Genomic DNA was isolated using 1 volume of Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (25:24:1) pH 8.0, precipitated by adding 2 volumes of 95% Ethanol (-20°C), washed with ice cold 70% Ethanol and resuspended in Tris-HCl pH 8.0. For each clone, shRNA inserts were amplified by using PCR with specific primers. The PCR products were purified and sequenced by the Genomics Core Facility (IRIC, Montreal).

Reagents and plasmids

Proteasome inhibitor MG132 was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

Retroviral vectors pMSCV, pWZL and pWZL-H-RasV12 were described in (Ferbeyre et al., 2002). pBabe-ER, pbabe-H-RasV12-ER, pLXSN, pLXSN-E6 and pLXSN-E7 were a gift from Scott Lowe (Memorial Sloan-Kettering Cancer centre, New York, NY). The shRNA library was cloned in the backbone of the retroviral vector pMLP. Lentiviral vectors pLKO expressing shAsb14 #1, shAsb14 #2, shASB14 #1 and shASB14 #2 were from Sigma-Aldrich. shRNA target sequences are presented in supplementary table 1. pCMV-VSV-G (Addgene #8454) and pCMV-dR.91 (delta8.9) were obtained from Dr. R. Weinberg's laboratory (Whitehead Institute, Cambridge, MA). ASB14 cDNA was synthetically produced by Invitrogen from the sequence available in Pubmed. A 3xFLAG tag was added by PCR amplification. 3xFLAG-ASB14 sequence was then cloned in BamHI/XhoI sites to create retroviral vector pMSCV-3xFLAG-ASB14.

Cells and viral-mediated gene transfer

Phoenix amphi packaging cells were a gift from Dr Scott Lowe. Human embryonic kidney (HEK) 293T were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Mouse embryonic fibroblasts were a gift from Dr Sylvain Meloche (IRIC, Montreal, QC). Normal human diploid fibroblasts were obtained from Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ). Normal human epithelial pancreatic cells (HPNE-hTERT) were a gift from Dr Michel Ouellette (Nebraska Medical Center, Omaha, NE).

Cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Wisent, Montreal, QC) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent) and 1% penicillin G/streptomycin sulfate (Wisent). HPNE hTERT cells were cultured in 75% DMEM and 25% medium M3 Base (Incell Corp) completed with 10 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (hEGF), 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 5% FBS, 5.5 mM D-glucose and 750 ng/mL puromycin.

Retroviral-mediated gene transfer was done as described in (Vernier et al., 2011). Lentiviral-mediated gene transfer was done as in (Lessard et al., 2018).

Colony assays, growth curves and senescence-associated β -galactosidase staining

For colony assays, cells were plated in 6-well plates (2000 cells per well). Cells were fixed with 1% glutaraldehyde at day 0 to account for plating and at day 14 of growth and then colored with crystal violet. The cell-retained dye was resuspended in 10% acetic acid and quantified using a spectrophotometer. For growth curves, cells were counted and plated after selection in 12-well plates (10000 cells per well) and fixed every 2-3 days for the indicated number of days. Cells were fixed, stained and quantified as described for colony assays. Senescence-associated β -galactosidase was done as in (Deschênes-Simard et al., 2013).

qPCR

Total RNA extracts were prepared in TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reverse transcribed into first-strand cDNA using All-in-One™ First-Strand cDNA synthesis kit (abm-Applied Biological Materials, BC), diluted and then amplified by qPCR using a LightCycler 96 (Roche Diagnostics) and SYBR green PCR mix previously described in (Vernier et al., 2011). Analysis for indicated genes were done, using HMBS and TBP as

reference genes for human and Actin and Tbp for mouse cells. Primers for qPCR are provided in supplementary table 1. All assays were performed in technical triplicates.

ASB14 polyclonal antibody generation

ASB14 antibody production and peptide synthesis were done by GenScript. The immunogen peptide PHGDKVHPSYTVEG was designed to match a region between the ankyrin repeat domains and the SOCS-box domain shared by the four ASB14 human isoforms. The peptide was then conjugated to the carrier protein KLH and two rabbits were immunized. After four immunizations, the antisera of the two rabbits were purified by antigen-affinity purification. The two polyclonal anti-ASB14 antibodies were then pulled together. The final product had a concentration of 2 mg/mL and a titer of 1:512000 was obtained by indirect ELISA.

Immunofluorescence

Immunofluorescence images were performed as described in (Lessard et al., 2018). Cell slides were incubated overnight at 4°C with the antibody against ASB14 (1:1000). Then, we used a goat-anti-rabbit IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 568 (1:1000, #A11008, lot: 1166843, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR). Images were acquired with a Zeiss Axio Imager Z2 upright microscope with a CoolSNAP FX camera (Photometrics).

For peptide-blocking assays, 10µg of anti-ASB14 antibody were incubated with 50µg of the immunizing peptide for 24h at 4°C. Cells were then incubated with a diluted antibody-peptide mixture in the same conditions as cells incubated with the ASB14 antibody

Immunoblotting

Immunoblotting was performed as previously described in (Deschênes-Simard et al., 2013). The following primary antibodies were used: anti-phospho-H3^{S10} rabbit polyclonal (1:1000, #06–570, lot: 2,517,793, Millipore, Billerica, MA), anti-MCM6 rabbit polyclonal (1:1000, A300-194A, lot: A300-194A-2, Bethyl Laboratories), anti-p53 mouse monoclonal (1:1000, clone DO-1, Sc-126, lot: C1413, Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-p53^{S15} rabbit polyclonal (1:500, #9284, lot: 9, Cell Signaling), anti-phospho-RB^{S795} rabbit polyclonal (1:500, #9301, lot: 13, Cell Signaling), anti-RB mouse monoclonal (1:1000, clone 4H1, #9309, lot: 9, Cell Signaling), anti-α-Tubulin mouse monoclonal (1:20000, clone B-5-1-2, T6074, lot: 023M4813, Sigma-Aldrich), anti-cullin 5 rabbit monoclonal (1:1000, EPR14725, Abcam), anti-p21 mouse monoclonal (1:1000, C-19, Sc-

397, Santa Cruz Biotechnology), anti-POTEE rabbit polyclonal (1:1000, CSB-PA740863LA01HU, Cusabio Technology) and anti-MYCBP rabbit polyclonal (1:1000, 12022-1-AP, Proteintech).

Immunohistochemistry

IHCs were performed on paraffin-embedded cells. Cells were infected with the respective plasmids. At day 7 post-infection, 4 million cells were fixed with formalin for 48h at 4°C. Fixed cells were then embedded in paraffin wax and the paraffin blocks were cut in sections that were transferred onto a microscope slide.

IHCs were also performed on a normal human tissue microarray purchased from US Biomax (#FDA999x) and on samples from 15 patients diagnosed with PDAC (from Dr Nabeel Bardeesy's laboratory, Massachusetts General Hospital, Boston, MA). Regions of normal, intraepithelial neoplasia or cancerous tissue were identified by two pathologists.

Cells, tissue sections and TMAs were stained with a rabbit polyclonal anti-ASB14 (1 :2000) at the Molecular Pathology platform of CR-CHUM. Human samples and TMAs were analyzed by two board-certified pathologists in order to identify normal pancreatic spots and pancreatic cancer regions and also to assess the specificity of the ASB14 staining. ASB14 cytoplasmic and nuclear staining patterns were quantified and scored in the 15 patient samples. The immunoreactive score was chosen to grade the samples. Statistics were performed by using the GraphPad Prism 8 software.

Immunoprecipitation

HEK-293T cells were transiently transfected using the calcium phosphate method with 20µg of MSCV puro linker (vector) or MSCV puro linker-3xFLAG-ASB14. Cells were scraped 48 hours later, and cell lysates were prepared as in (Lessard et al., 2018). Immunoprecipitation protocol was described in (Lessard et al 2018). For ASB14 immunoprecipitation in figure S2E, cell lysates were incubated with 10µg of ASB14 antibody for 1 hour at 4°C. Then, immunoprecipitates were recovered with a 1:1 mix of protein A and G Sepharose (Sigma-Aldrich). For FLAG immunoprecipitations in figures 5 and 6B, cell lysates were incubated with anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions.

Mass spectrometry

Bands were destained in 50% MeOH (Sigma-Aldrich). Each band was shrunk in 50% acetonitrile (ACN), reconstituted in 50 mM ammonium bicarbonate with 10 mM TCEP [Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride; Thermo Fisher Scientific], and vortexed for 1 h at 37°C. Chloroacetamide (Sigma-Aldrich) was added for alkylation to a final concentration of 55 mM. Samples were vortexed for another hour at 37°C. One microgram of trypsin was added, and digestion was performed for 8 h at 37°C. Peptide extraction was conducted with 90% ACN. The extracted peptide samples were dried down and solubilized in 5% ACN-0.2% formic acid (FA). The samples were loaded on a C4 guard column (Optimize Technologies) connected directly to the switching valve. They were separated on a home-made reversed-phase column (150- μ m i.d. by 180 mm) with a 56-min gradient from 10 to 30% ACN-0.2% FA and a 600-nl/min flow rate on a Easy-nLC 1000 connected to an Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Each full MS spectrum acquired at a resolution of 60,000 was followed by tandem-MS (MS-MS) spectrum acquisition for a maximum of 3 s. on the most abundant multiply charged precursor ions. Tandem-MS experiments were performed using collision-induced dissociation (CID) at a collision energy of 30%. The data were processed using PEAKS X (Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON) and a Uniprot human database. Mass tolerances on precursor and fragment ions were 10 ppm and 0.3 Da, respectively. Variable selected posttranslational modifications were carbamidomethyl (C), oxidation (M), deamidation (NQ), acetyl (N-ter) and phosphorylation (STY). The data were visualized with Scaffold 4.8.9 (protein threshold, 99%, and a false-discovery rate [FDR] of 1% for peptides). Proteomics analyses were performed by the Center for Advanced Proteomics Analyses, a Node of the Canadian Genomic Innovation Network that is supported by the Canadian Government through Genome Canada. Venn diagrams were calculated with the software <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>

3.2.4. Results

The E3 ligase ASB14 is required for RAS-induced senescence

To identify E3 ligases mediating OIS we used a library containing 8000 shRNAs against all E3 ligases in the mouse genome. We co-infected murine embryonic fibroblasts with the pooled library and pWZL-RASV12. In these conditions most cells senesced 4 days after infection. However, colonies of growing cells appeared one week after. The shRNAs expressed in those colonies were amplified by PCR and sequenced (Fig 1A). Three E3 ligases were identified in this way, ASB14, Rc3h1 (**R**ing finger and **CCCH**-type domains 1) and Pcgf1 (**P**olycomb **G**roup **R**ing **F**inger 1). We focused next on Asb14 and validated the results of the screening using two independent shRNAs which also inhibited Ras-induced senescence as measured using the senescence associated β -Galactosidase biomarker (SA- β -Gal) (Fig 1B) and Ras-induced growth arrest in both a cell population-based assay (Fig 1C) and a colony assay (Fig 1D) in MEFs. Gene expression analysis confirmed these results since reduction of Asb14 increased the expression of the proliferation marker Ki67 and decreased the expression of the senescence marker Pml (Fig 1E). To determine whether ASB14 is also required for RAS-induced senescence in human fibroblasts we inactivated its expression with two independent shRNAs in cells expressing oncogenic RAS alone or in combination with the papilloma viruses oncoproteins E6 or E7. E6 inactivates the p53 pathway while E7 inactivates the RB pathway (Mallette et al., 2004). In a colony assay, E7 but not E6 allowed shASB14 to bypass ras-induced senescence (Fig S1A). Consistent with these results, knockdown of ASB14 in IMR90 cell expressing E7 bypassed their proliferation arrest (Fig S1B) and reduced the senescence markers SA- β -Gal, CDKN1A while restoring partially the expression of Ki67 and the E2F target gene MCM6 (Fig S1C and S1D).

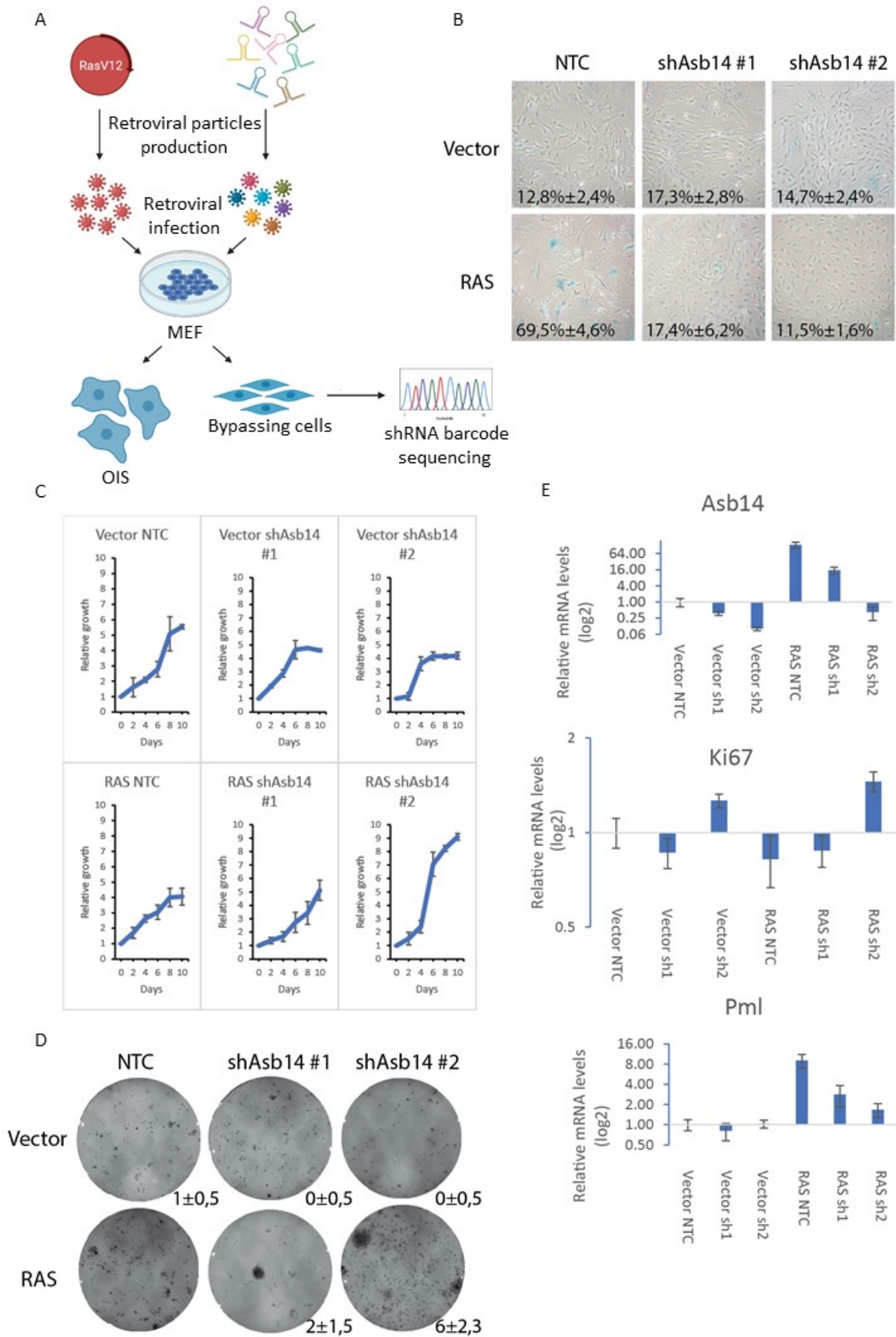


Figure 3.1: Asb14 knockdown produces an OIS bypass in MEFs

(A) shRNA screening workflow. (B) SA- β gal assay of MEFs expressing H-RasV12 (RAS) or an empty vector (Vector) and shRNA against Asb14 (shAsb14) or a non targeting shRNA (NTC) obtained from cells 14 days after infection. Data were quantified from 100 cell counts in triplicates and are presented as the mean percentage of positive cells \pm standard deviation (SD) (C) Growth curves of cells as in B. Data are presented as mean \pm SD of triplicates. (D) Colony assay of cells as in B. Data are presented as the mean of colonies \pm SD of triplicates. (E) qPCR for Asb14, Ki67 and Pml, in cells as in B.

ASB14 is highly expressed in the exocrine pancreas

To characterize the expression of ASB14 in tissues, we obtained a new antibody directed against the residues 455-467 of ASB14 isoform 1 but present in all predicted isoforms (Fig S2A). This antibody strongly recognized ASB14 on IHC from IMR90 cells forced to express 3xFLAG-ASB14 from a retroviral vector (Fig S2B). The antibody also recognized ASB14 by immunofluorescence in IMR90 cells expressing ASB14 and the signal was blocked by both a shRNA against ASB14 and a blocking peptide which is the same peptide used to generate the antibody (Fig S2C). Also, the antibody was validated on endogenous ASB14 expression by IHC in the pancreas, and the signal was eliminated by preincubation with the blocking peptide. Finally, the antibody was able to specifically immunoprecipitate ASB14 from cells overexpressing 3XFLAG-ASB14 which was then recognized by either the same anti-ASB14 antibody or the anti-FLAG antibody (Fig S2E).

We used our new anti-ASB14 antibody to interrogate a panel of human tissue sections using immunohistochemistry. We found a high reactivity in the exocrine pancreas, excluding the Islets of Langerhans (Fig 2). Some staining was also detected in some portions of the digestive tract (Fig 2). The expression of most transcripts in human tissues is available at www.proteinatlas.org. ASB14 is highly expressed in the tongue and the skeletal muscle and moderately expressed in the heart, B cells, pancreas, bone marrow, tonsils, and the skin (Fig S3). The high levels we have detected in the exocrine pancreas must therefore depend on post-transcriptional control.

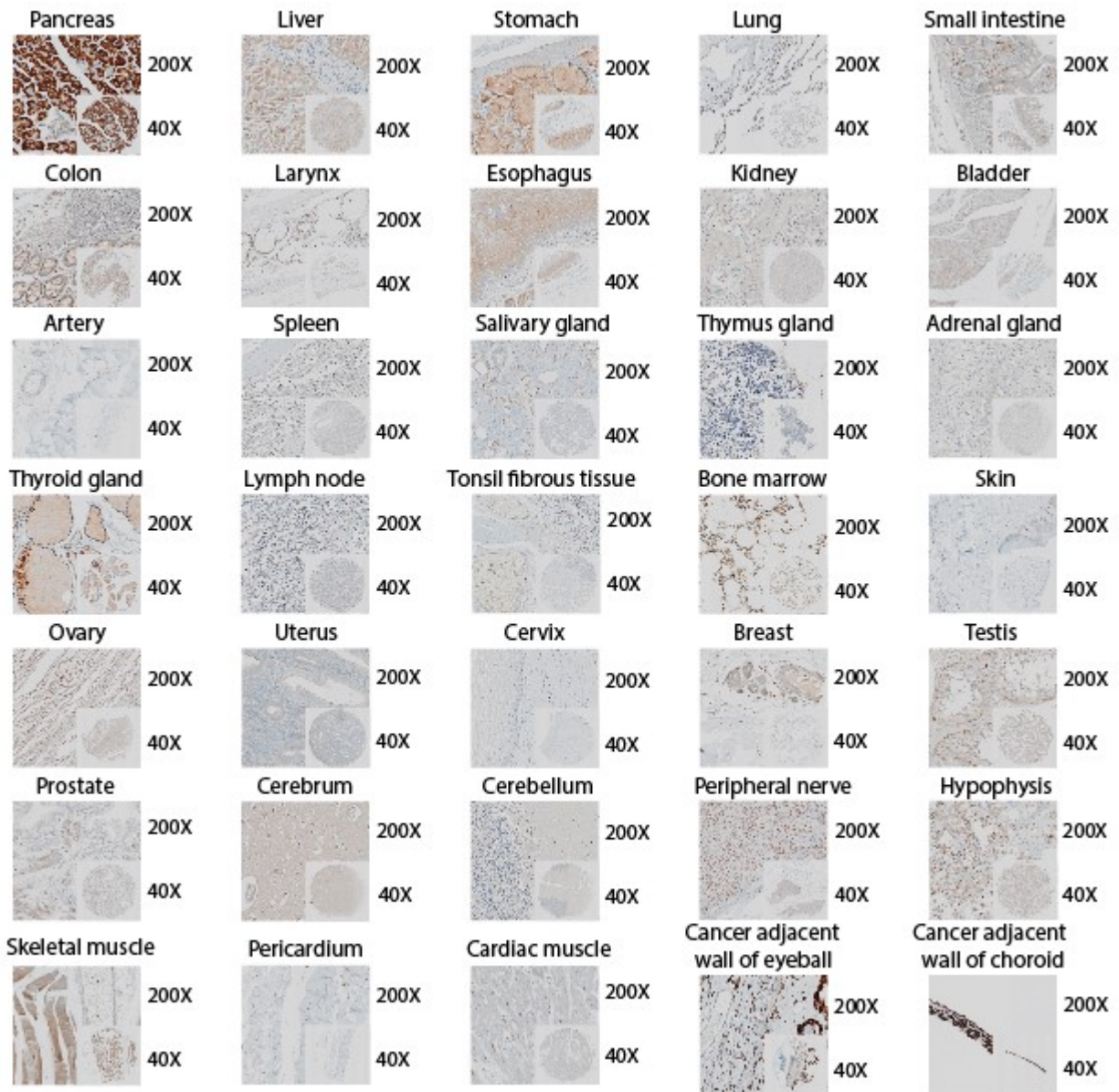


Figure 3.2: ASB14 is highly expressed in pancreatic normal tissues

IHC staining of ASB14 in a multiple organ normal tissue microarray. Representative images for each organ (n=3) in a high and low magnification are shown. Each core in the TMA cohort was extracted from a different individual regardless of their age or sex.

ASB14 is downregulated in PDAC and mediates OIS in normal pancreatic epithelial cells

Next, we interrogated public databases to determine the status of ASB14 in tumors from PDAC patients. We found that ASB14 is downregulated at the mRNA level in PDAC tumors in comparison with normal pancreas (Fig 3A). Intriguingly, genomic data shows a decrease in copy number for the ASB14 genes (Fig 3B) in tumors from patients with Stage IV PDAC which is characterized by metastatic spreading. Finally, we interrogated samples obtained from 15 patients with PDAC and compared them with normal pancreas. We scored the intensity of staining as negative, mild, moderate, or strong both in the cytosol and the nucleus (Fig 3C). We found in general, lower intensity of staining in PDAC. We also noticed that ASB14 is strongly cytosolic in normal cells. However, in tumors where the signal is strong, it is mainly nuclear (Fig 3D and E). Taken together, these results suggest that the tumor suppressor functions of ASB14 are bypassed in PDAC by mechanism acting on ASB14 gene copy number, transcription, and post-transcriptional regulation as well as cellular localization.

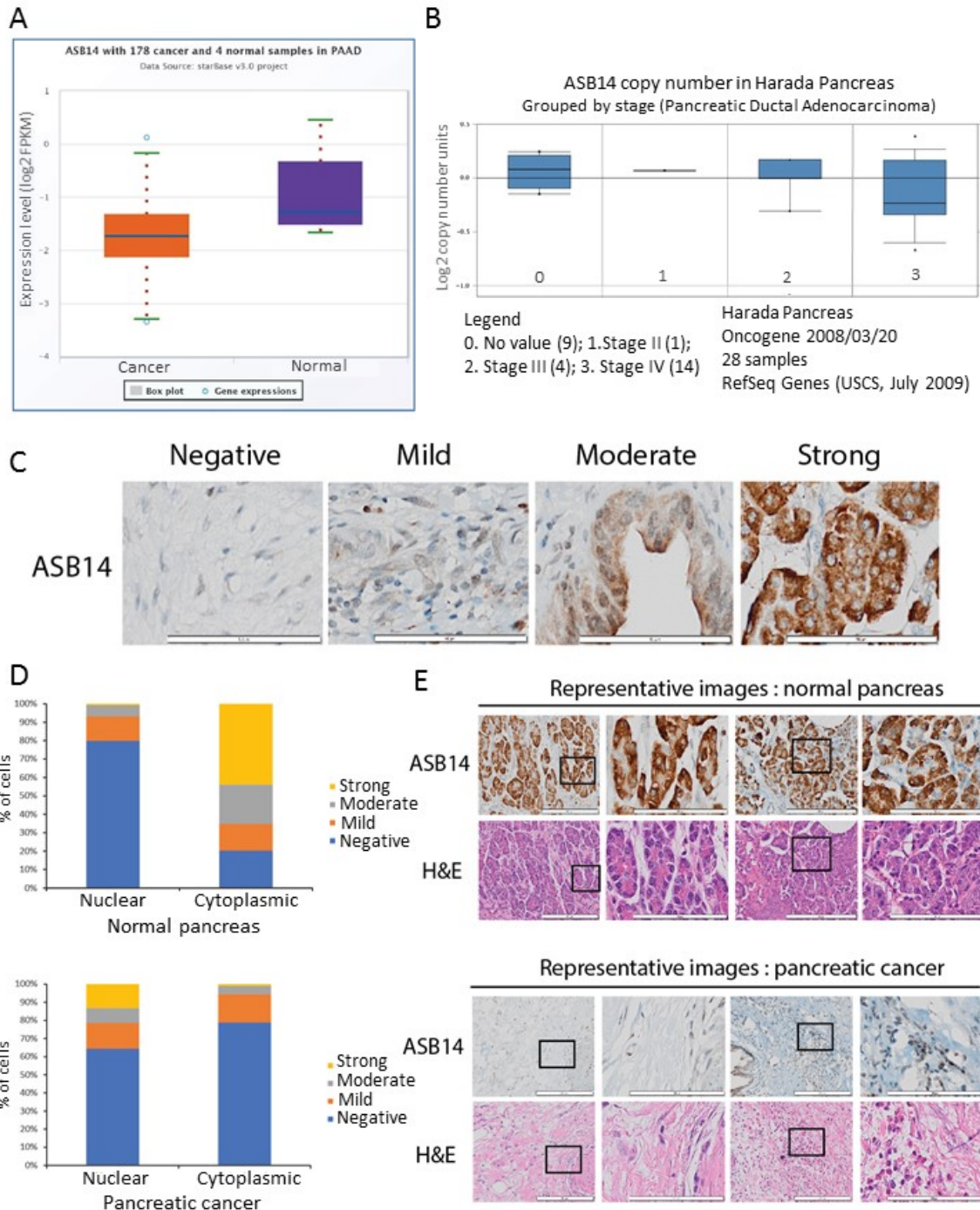


Figure 3.3: ASB14 is under-regulated in pancreatic cancer

(A) ASB14 mRNA expression in pancreatic adenocarcinoma (PAAD) samples compared to healthy pancreatic samples. Data are expressed as the log₂ of the fragments per kilobase of transcript per million mapped reads in RNA-Seq (FPKM). Data provided by the StarBase database (Yang et al., 2011). (B) ASB14 gene copy number in the different stages of pancreatic ductal adenocarcinoma. Data are expressed as the

log₂ of the copy number units detected by micro-array-based techniques in (Harada et al., 2009). **(C)** Scale of staining intensity calculated with the immunoreactivity scoring method for ASB14 immunostaining in tissues from 15 patients diagnosed with PDAC. **(D)** Nuclear and cytoplasmic ASB14 staining were analyzed and quantified in normal pancreatic regions and cancer tissues for the 15 patients. Results are shown in graphics comparing the percentage of cells stained in each category and the intensity of the staining. Mann-Whitney *U* test was used to show significant differences between conditions: strong cytoplasmic normal versus strong cytoplasmic cancer, $U= 7.500$, $P < 0.0001$ (sig < 0.05 two-tailed), showing a statistically significant difference; and strong nuclear normal versus strong nuclear cancer, $U= 24.50$, $P = 0.0003$ (sig < 0.05 two-tailed), showing a significant difference. **(E)** Images of the most representative staining in normal and cancer pancreatic tissues from two different patients.

To investigate whether ASB14 is required for senescence in response to KRAS activation in pancreatic epithelial cells we introduced oncogenic KRAS into hTERT-immortalized normal pancreatic epithelial cells. KRAS induced growth arrest and senescence in these cells (Fig 4A-D) but knockdown of ASB14 significantly inhibited this response. These results are consistent with a tumor suppressor role of ASB14 as a mediator of cellular senescence in response to KRAS in pancreatic epithelial cells.

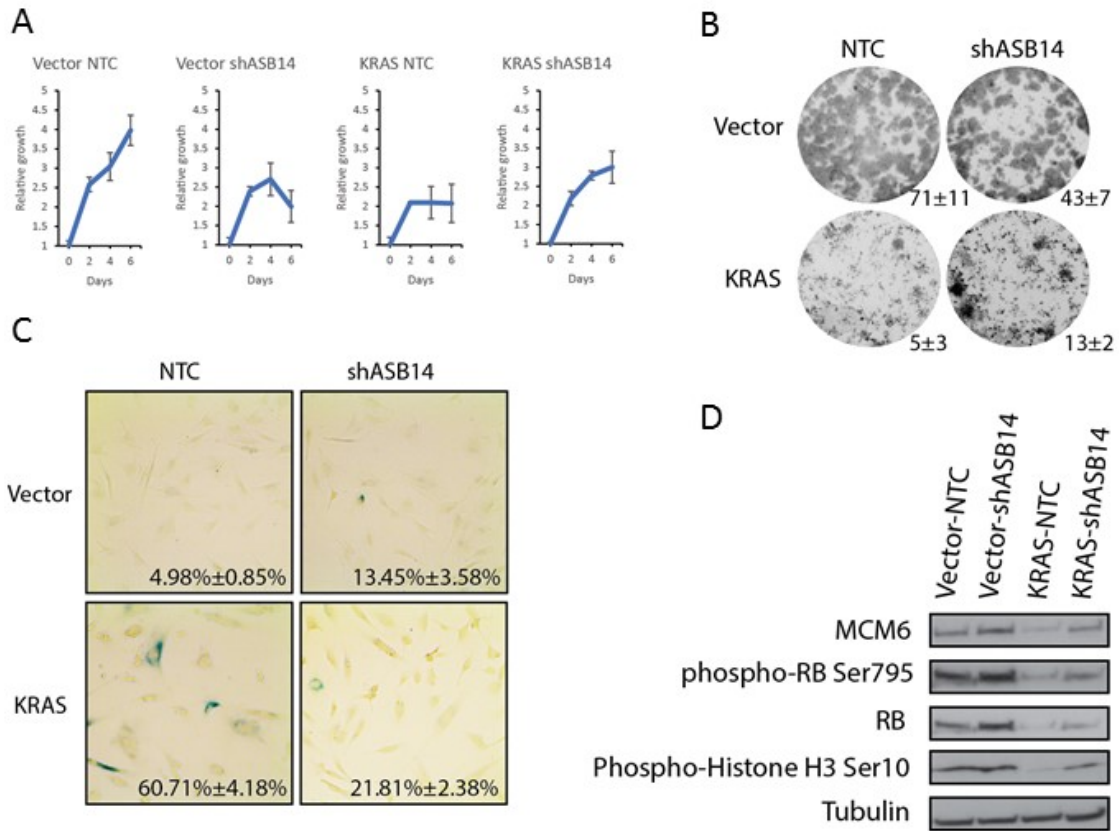


Figure 3.4: ASB14 knockdown allows bypass of OIS in pancreatic normal cells

(A) Growth curves of HPNE expressing K-RasV12 (KRAS) or an empty vector (vector) and a shRNA against ASB14 (shASB14) or a non-targeting shRNA (NTC). Data are presented as mean \pm SD of triplicates. (B) Colony assay of cells as in A. Data are presented as the mean of colonies \pm SD of triplicates. Unpaired two-tailed t test was used to show a significant difference between KRAS NTC and KRAS shASB14: unpaired t (28) = 7.059, $P < 0.0001$. (C) SA- β gal assay for cells as in A. Data were quantified from 100 cell counts in triplicated and are presented as the mean percentage of positive cells \pm SD. (D) Immunoblots for the indicated proteins in HPNE cells at day 14 post-infection. Tubulin was used as a loading control.

The ASB14 interactome of OIS

To investigate the mechanism of action of ASB14 in OIS we analyzed its interactome in the context of RAS-induced senescence in normal fibroblasts. We took advantage of ER-RAS, a conditional allele of Ha-RAS that induces senescence after treatment with 4-hydroxy tamoxifen. We compared both control cells and ER-RAS cells expressing 3XFLAG ASB14 or a control vector and treated with 4-OH-tamoxifen (Fig 5A). We also treated these cell populations with MG132 or vehicle to capture proteins that are degraded by ASB14. We anticipated that proteins that interact with ASB14 as part of the cullin-dependent ligase complexes and proteins that regulate ASB14 functions are not expected to be affected by MG132. On the other hand, targets of ASB14 in senescent cells should be stabilized by MG132. Cullin 5, Elongin B and Elongin C were enriched in the ASB14 interactome independently of MG132 (Fig 5B). This result is consistent with the formation of CRL5-dependent E3 ligases by the ASB family (Andresen et al., 2014). In general, proteins that immunoprecipitated with 3XFLAG ASB14 perform a variety of cellular functions but in particular we found an enrichment for cytoskeletal proteins and proteins associated to the ribosome (Fig 5C). The induction of senescence with oncogenic RAS caused a rearrangement of the ASB14 interactome. Candidate target of ASB14 were defined as proteins stabilized by MG132 in cells overexpressing ASB14. We found 40 proteins stabilized by MG132 in Ras expressed cells, 85 proteins in cells without Ras and 52 proteins common to both conditions (Fig 5D). These proteins could be direct targets of ASB14 or of E3 ligases regulated by ASB14. Overall, most partners of ASB14 were cytosolic (Fig 5E).

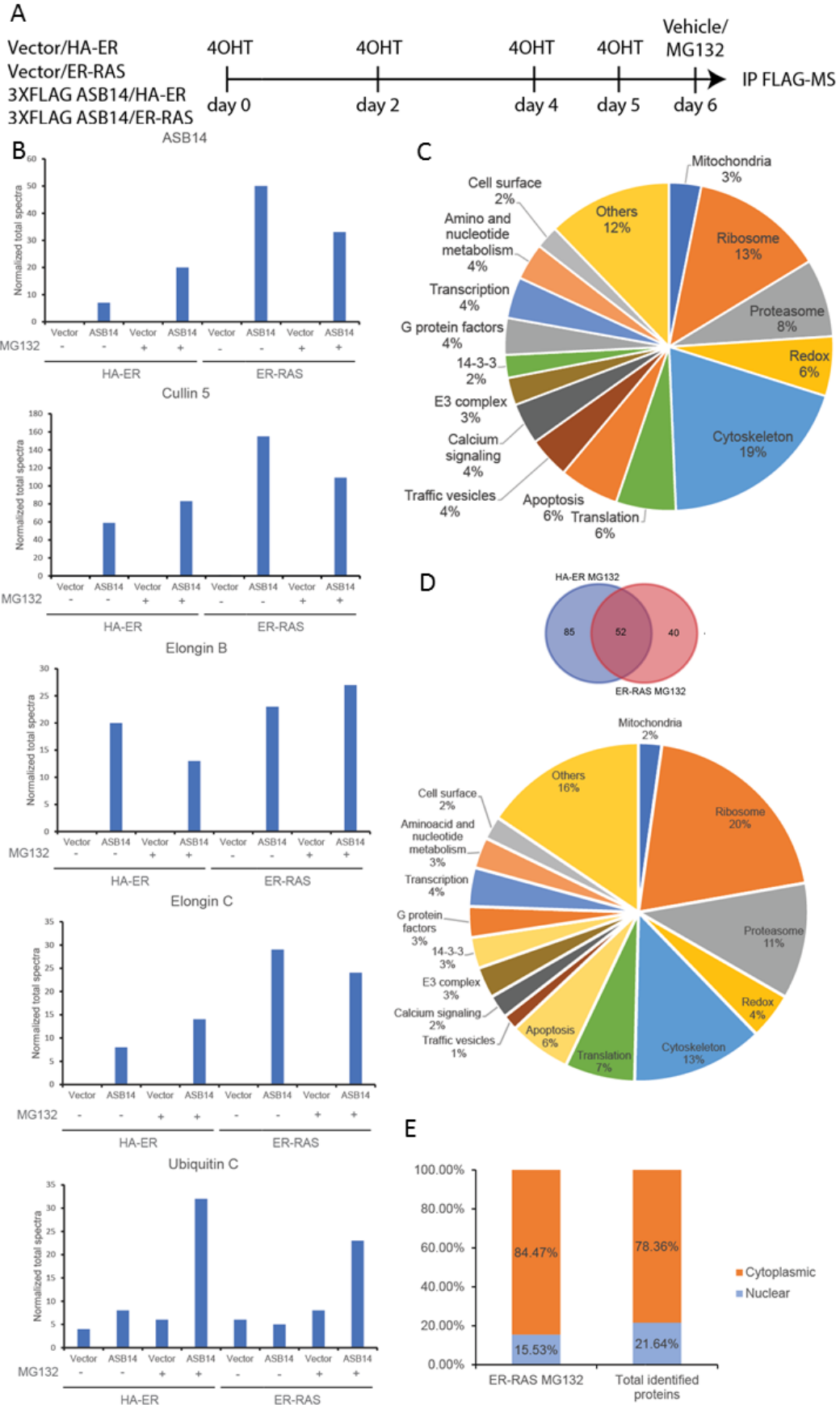


Figure 3.5: Identification of ASB14 interactors in Ras-induced senescence

(A) Workflow of the samples preparation for IP-MS. Cells were treated with 4-hydroxytamoxifen (4OHT) each 48 hours to induce the ER-RAS construct. The final 4OHT treatment was done 24 hours prior to cell lysates preparation. Cells were also treated with 20 μ M MG132 or DMSO as vehicle. (B) Relative abundance of the indicated proteins normalized over total spectra in the immunoprecipitates. (C) GO-terms for the immunoprecipitated proteins in all conditions expressing 3xFLAG ASB14. Data are expressed as the percentage of proteins belonging to each GO-term. (D) Venn diagram comparing the proteins identified in the 3xFLAG ASB14 immunoprecipitates from senescent cells (ER-RAS) or control cells (HA-ER) treated with 20 μ M MG132. The 40 exclusive ER-RAS MG132 proteins were then classified by their GO-terms. Data are expressed as the percentage of proteins belonging to each GO-term. (E) Subcellular localization of the 40 proteins identified uniquely in the senescent cells treated with 20 μ M MG132 (ER-RAS MG132; left), and of the immunoprecipitated proteins in all conditions expressing 3xFLAG ASB14 (right). The subcellular localization data was assessed using the UniProt database.

In addition to targets, there is a variety of proteins that regulate E3 ligases. The cullin binding subunits often does not directly contact the substrate needing additional adaptors (Angers et al., 2006). It is then possible that some of the partners of ASB14 we identified play a role in substrate recognition. We found that ASB14 binds to MYCBP (Fig 6A), a protein highly expressed in pancreatic cancer (Fig 6B). Another interesting ASB14-binding protein is POTEE, which is often upregulated in cancers (Fig 6C). POTEE binds ASB14 but this binding is lost in RAS-senescent cells, likely because POTEE is downregulated during senescence (Fig 6D). Of note both MYCBP and POTEE levels are not affected after knockdown of ASB14, indicating that they are not likely targets of its E3 ligase activity.

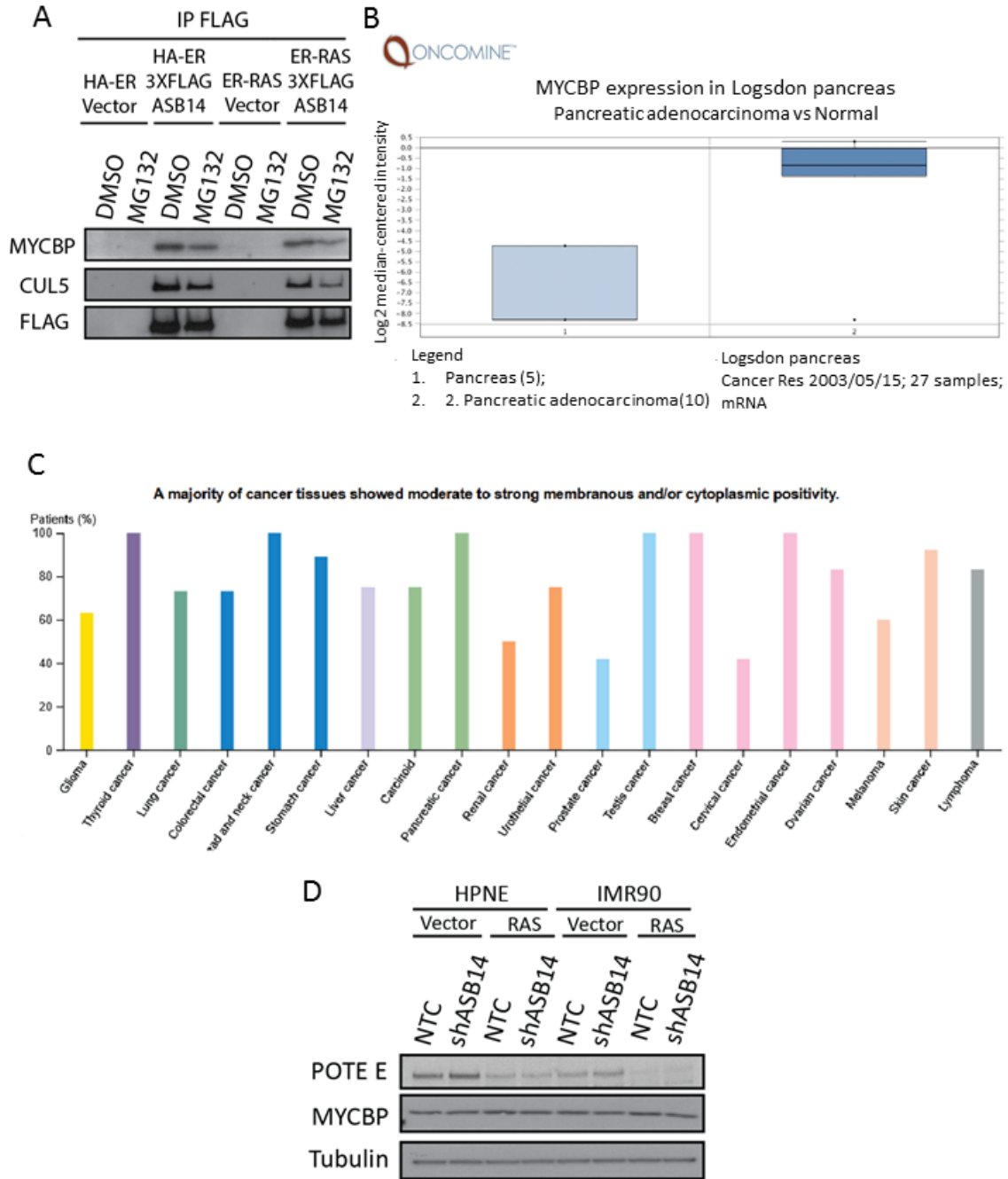


Figure 3.6: Analysis of two ASB14 interactors

(A) MYCBP differential mRNA expression in pancreatic adenocarcinoma samples compared to healthy pancreatic samples. Data are expressed as the log₂ of the median-centered intensity from micro-array-based techniques in (Logsdon et al., 2003). Data provided by the OncoPrint database. (B) Western blot of MYCBP, CUL5 and FLAG of immunoprecipitates from IMR90 cells prepared as in 5A. (C) Expression of POTEE in different types of cancer. Data are expressed as the percentage of tissues expressing moderate to strong

POTEE signal by immunohistochemistry. A minimum of 4 different tissues by cancer type were analyzed. Data and image provided by the Human Protein Atlas database (Uhlén et al., 2015). **(D)** Western blot of POTEE, MYCBP and tubulin from HPNE cells as in 4D and from IMR90 expressing H-RasV12 (RAS) or an empty vector (Vector), and a shRNA against ASB14 (shASB14) or a non targeting shRNA (NTC). Protein extracts were collected at day 14 post-infection.

3.2.5. Discussion

Senescent cells are characterized by a specific pattern of proteasomal-mediated protein degradation (SAPD) (Deschênes-Simard et al., 2013). As E3 ubiquitin ligases play a critical role in the ubiquitin-proteasome pathway, we hypothesized that these enzymes could also be implicated in senescence and tumor suppression. An unbiased shRNA screening led us to the identification of ASB14 as an important E3 ubiquitin ligase gene for oncogene-induced senescence. ASB14 is a previously uncharacterized cullin-5-RING-ligase (CRL5), and its loss by shRNA mediates a Ras-induced senescence bypass in MEFs and in HPNE cells. Then, we developed an ASB14 antibody in order to characterize ASB14 expression in tissues. Our immunohistochemical analysis revealed that ASB14 staining is strong and cytoplasmic in normal pancreas, and weaker and nuclear in pancreatic cancer tissues. We also analyzed ASB14 interactome in Ras-induced senescence and we found a large amount of cytoplasmic proteins. Then, we focused on MYCBP and POTEE.

E3 ubiquitin ligases confer the substrate specificity for ubiquitination. Ubiquitination was first described as a mechanism for proteasomal-degradation targeting, but also serves as a modulator of protein function, protein trafficking, chromatin modifications and so on (Zheng and Shabek, 2017). The ASB14 interactome we report here may include targets for proteasome-dependent protein degradation. However, so far, we have not been able to identify such targets. We focused our initial efforts on MYCBP and POTEE, but we have not been able to observe an increase in the levels of these proteins after knockdown of ASB14. It is possible that ASB14 could act by targeting a modified form of MYCBP and POTEE. An alternative explanation would be that ASB14 do not mediate degradation of these proteins but a change in localization or function.

Intriguingly, POTEE interacts with ASB14 in proliferating cells but not in senescent cells. Furthermore, POTEE protein levels strongly decrease in Ras-induced senescence in two different cell lines, but they are not recovered by ASB14 knockdown. We think that POTEE could inactivate or sequester ASB14 in proliferating cells, and that its decrease could allow ASB14 activity in Ras-induced senescent cells. Interestingly, POTEE has been associated with pancreatic cancer progression and poor prognosis in patients (Hao et al., 2020), which could be consistent with a loss of function of ASB14 in this scenario. Also, with our current data, we can not exclude that MYCBP could act as an ASB14 regulator too.

Our results suggest that ASB14 could regulate tumor suppression in pancreatic cancer. Further work is required to precisely elucidate ASB14 function and regulation. Our data suggest that ASB14 localization could play a role on its function and its tumour suppression ability. To sum up, our work provides a rationale for identification of new tumor suppressor E3 ubiquitin ligases. The discovery of tumor suppressor E3 ubiquitin ligases is relevant and could lead to the identification of new molecular biomarkers for predicting patient prognosis as well as the development of therapeutic anticancer strategies.

3.2.6. Acknowledgments

We thank Éric Bonneil and the IRIC Proteomics Core Facility for proteomic analysis. We thank the molecular pathology platform at CR-CHUM for ASB14 immunostainings and technical support. This work was funded by grants from the CIHR (Canadian Institute for Health and Research) to G.F. G.F. is supported by the CIBC chair for breast cancer research at the CR-CHUM

Declaration of interest statement

We have no conflict of interest to declare.

3.2.7. Supplementary data

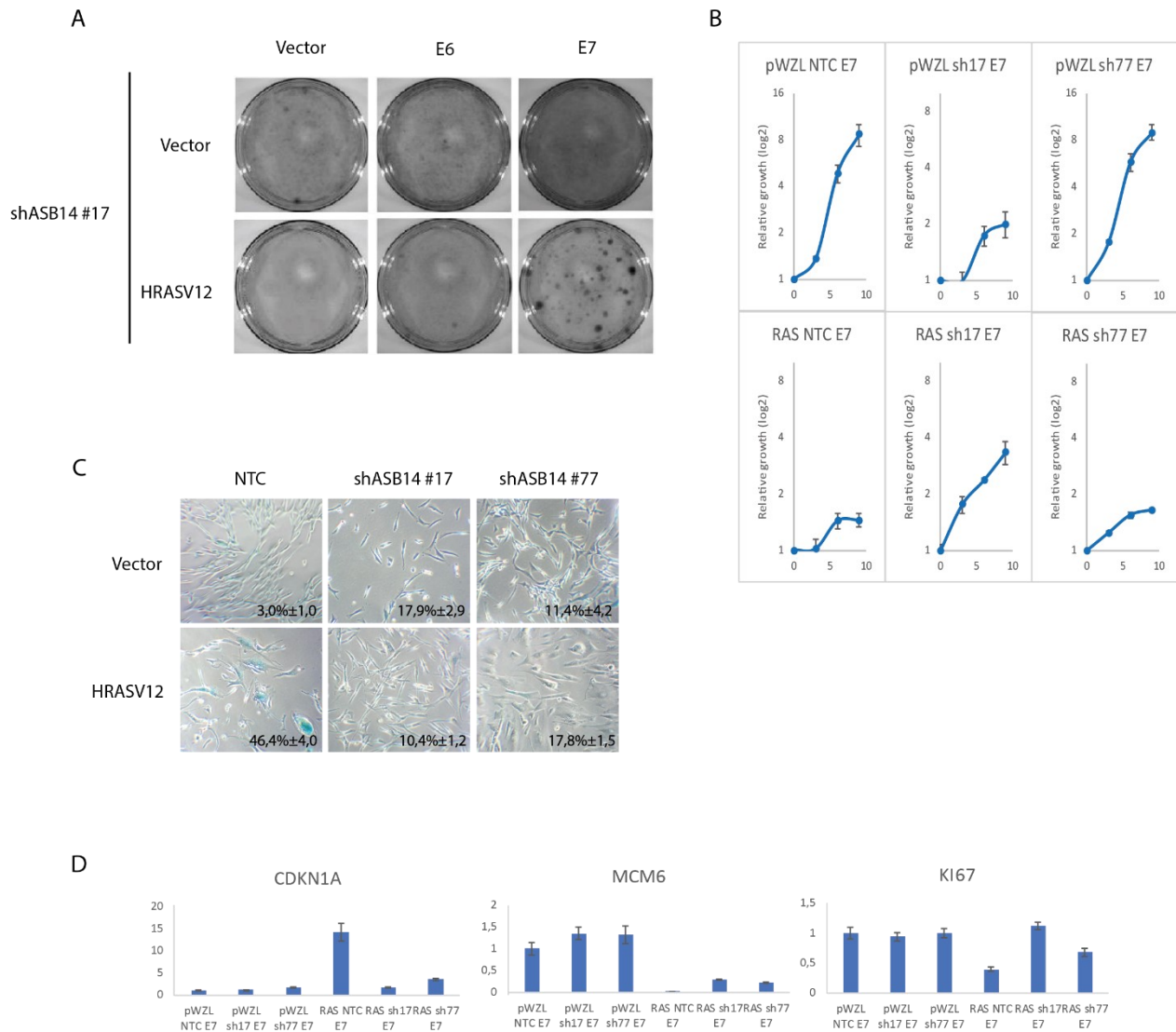


Figure S3.1: OIS bypass mediated by ASB14 knockdown requires RB pathway disruption in human fibroblasts

(A) Colony assay of IMR90 expressing H-RasV12 (RAS) or an empty vector (Vector), E6 or E7 oncoprotein or an empty vector (vector) and shRNA against ASB14. (B) Growth curves of IMR90 expressing H-RasV12 (RAS) or an empty vector (pWZL), shRNA against ASB14 (shASB14) or a non targeting shRNA (NTC) and the E7 oncoprotein. Data are presented as mean \pm SD of triplicates. (C) SA- β gal assay for cells as in A. Data were quantified from 100 cell counts in triplicated and are presented as the mean percentage of positive cells \pm SD. (D) qPCR for CDKN1A, KI67 and MCM6 in cells as in (B).

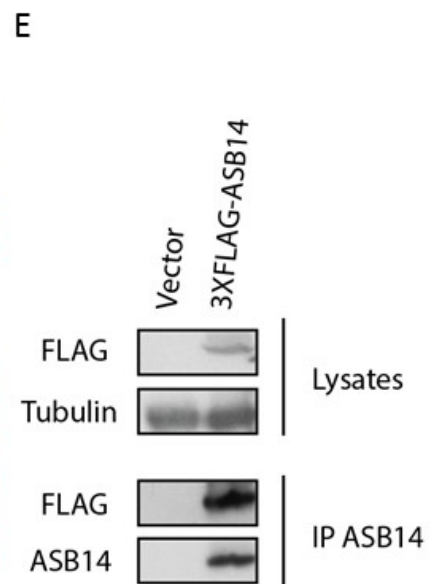
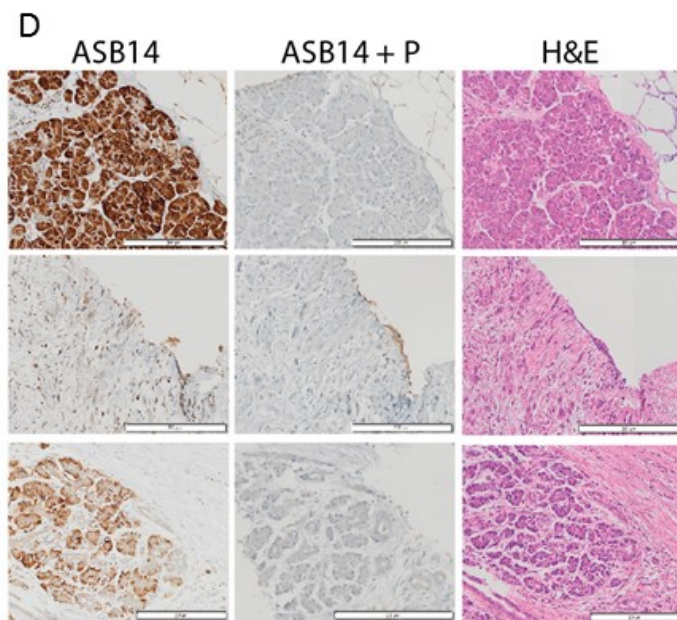
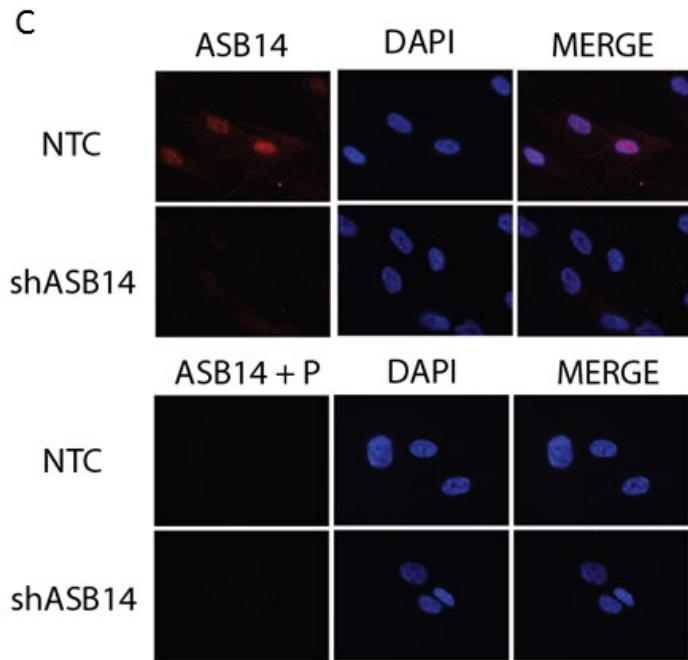
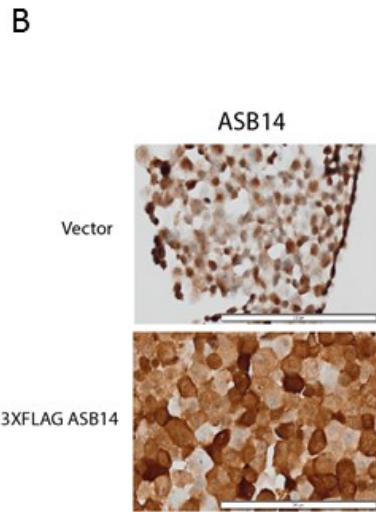
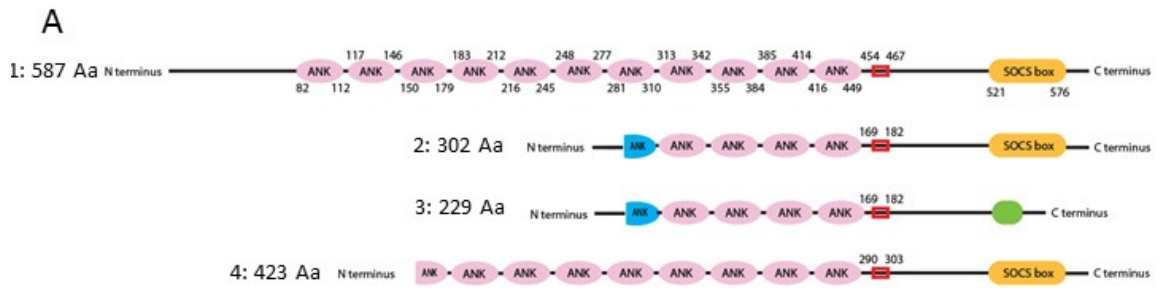


Figure S3.2: Characterization and validation of the ASB14 antibody

(A) ASB14 human protein isoforms. The ankyrin repeat domains (ANK) in pink are common for all the isoforms. The ankyrin repeat domains in blue are exclusive for isoforms 2 and 3 and different for the other ones. The SOCS-box domain is represented in yellow. The red box shows the region used to generate the ASB14 polyclonal antibody. The domain represented in green is exclusive for isoform 3 and it remains uncharacterized. **(B)** IHC staining of ASB14 (1:2000) in paraffin-embedded IMR90 cells expressing a 3xFLAG-tagged ASB14 (bottom) or an empty vector (top). Scale bar: 200 μm . **(C)** Fluorescent imaging of ASB14 (top) in IMR90 cells expressing a shRNA against ASB14 or a non-targeting shRNA (NTC). A peptide-blocking assay was also performed to assess the antibody specificity (bottom). Nuclear DNA (DAPI) is shown in blue. Scale bar: 10 μm . **(D)** Representative IHC staining of ASB14 in human pancreatic tissues. A peptide-blocking assay (center) and H&E staining (right) were performed on consecutive sections of the tissue. Scale bar: 200 μm . **(E)** Immunoprecipitation with anti-ASB14 antibody in HEK-293T cells transiently expressing 3xFLAG tagged ASB14 or an empty vector (vector). Lysates and immunoprecipitates were immunoblotted for the indicated proteins.

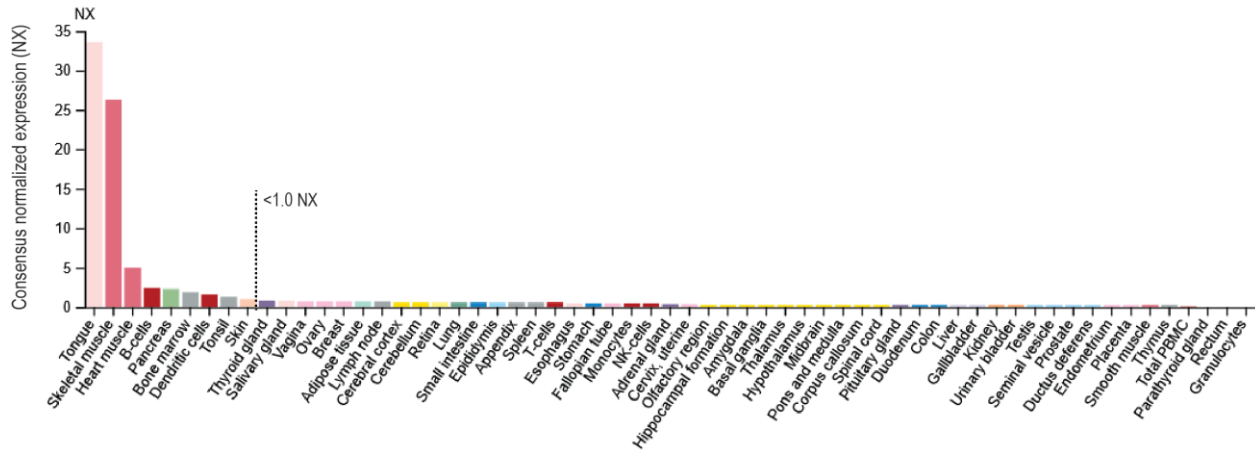


Figure S3.3: ASB14 expression in human tissues based on transcriptomics

ASB14 gene expression in human tissues based on transcriptomics by the three independent consortia Human Protein Atlas (HPA), FANTOM5 and GTEx. Data are shown as the consensus normalized expression (NX) of all three datasets. Human Protein Atlas color categories used in the graphic are also shown. Image credit: Human Protein Atlas (Uhlén et al., 2015).

Tableau S3.1 : Sequence of qPCR primers and shRNAs.

qPCR primers		
Gene	5' primer	3' primer
Asb14	TGGAGAAAGGGTTCATCGGTTT T	TTCCCAGAGAGATGCTGTAGCC
Ki67	AGGGTAACTCGTGGAACCAA	TTAACTTCTTGGTGCATACAATGTC
Pml	TTCGGACACCGAGAATCTGTC	GGCGAGGCTCTCATCCAAGG
ASB14	AAGACCCGGTAACTGCCTCCA	TGCAGAAGTAATTGACATTGGCCCC A
KI67	AGAAGACAGTACCGCAGATGA	CGGCTCACTAATTTAACGCTGG
MCM6	ATCCCTCTTGCCAAGGATTT	GAAAAGTTCCGCTCACAAGC
CDKN1A	ACCCTTGTGCCTCGCTCAGG	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCTGT
shRNA target sequence		
shAsb14 #1	GCGCTACAATACACATTGAAA	
shAsb14 #2	GCTGGATCAGAGAATCCGTAA	
shASB14 #1	GCCCTTCATTTGGAAATTCAA	
shASB14 #2	TACGGATCTTGCTGCCATTAA	

3.2.8. References

Acevedo, M., Vernier, M., Mignacca, L., Lessard, F., Huot, G., Moiseeva, O., Bourdeau, V., and Ferbeyre, G. (2016). A CDK4/6-Dependent Epigenetic Mechanism Protects Cancer Cells from PML-induced Senescence. *Cancer Res* 76, 3252-3264.

Andresen, C.A., Smedegaard, S., Sylvestersen, K.B., Svensson, C., Iglesias-Gato, D., Cazzamali, G., Nielsen, T.K., Nielsen, M.L., and Flores-Morales, A. (2014). Protein interaction screening for the ankyrin repeats and suppressor of cytokine signaling (SOCS) box (ASB) family identify Asb11 as a novel endoplasmic reticulum resident ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 289, 2043-2054.

Astle, M.V., Hannan, K.M., Ng, P.Y., Lee, R.S., George, A.J., Hsu, A.K., Haupt, Y., Hannan, R.D., and Pearson, R.B. (2011). AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene*.

Baell, J.B., Leaver, D.J., Hermans, S.J., Kelly, G.L., Brennan, M.S., Downer, N.L., Nguyen, N., Wichmann, J., McRae, H.M., Yang, Y., *et al.* (2018). Inhibitors of histone acetyltransferases KAT6A/B induce senescence and arrest tumour growth. *Nature* 560, 253-257.

Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633-637.

Caldwell, M.E., DeNicola, G.M., Martins, C.P., Jacobetz, M.A., Maitra, A., Hruban, R.H., and Tuveson, D.A. (2012). Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene* 31, 1599-1608.

Carriere, C., Gore, A.J., Norris, A.M., Gunn, J.R., Young, A.L., Longnecker, D.S., and Korc, M. (2011). Deletion of Rb accelerates pancreatic carcinogenesis by oncogenic Kras and impairs senescence in premalignant lesions. *Gastroenterology* 141, 1091-1101.

Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10, 51-57.

David, D., Nair, S.A., and Pillai, M.R. (2013). Smurf E3 ubiquitin ligases at the cross roads of oncogenesis and tumor suppression. *Biochim Biophys Acta* 1835, 119-128.

Deschênes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M.F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., Igelmann, S., Mallette, F.A., Saba-El-Leil, M.K., Meloche, S., *et al.* (2013). Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev* 27, 900-915.

Deschênes-Simard, X., Lessard, F., Gaumont-Leclerc, M.F., Bardeesy, N., and Ferbeyre, G. (2014). Cellular senescence and protein degradation: breaking down cancer. *Cell Cycle* 13, 1840-1858.

Deschenes-Simard, X., Parisotto, M., Rowell, M.C., Le Calve, B., Igelmann, S., Moineau-Vallee, K., Saint-Germain, E., Kalegari, P., Bourdeau, V., Kottakis, F., *et al.* (2019). Circumventing senescence is associated with stem cell properties and metformin sensitivity. *Aging Cell*, e12889.

Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.

Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Lin, A.W., Querido, E., McCurrach, M.E., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2002). Oncogenic ras and p53 Cooperate To Induce Cellular Senescence. 22, 3497-3508.

Guerra, C., Collado, M., Navas, C., Schuhmacher, A.J., Hernandez-Porras, I., Canamero, M., Rodriguez-Justo, M., Serrano, M., and Barbacid, M. (2011). Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 19, 728-739.

Hao, Q., Gao, L., Niu, W., Chen, L., Zhang, P., and Chen, Z. (2020). POTEE stimulates the proliferation of pancreatic cancer by activating the PI3K/Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling. *Biofactors* 46, 685-692.

Harada, T., Chelala, C., Crnogorac-Jurcevic, T., and Lemoine, N.R. (2009). Genome-wide analysis of pancreatic cancer using microarray-based techniques. *Pancreatology* 9, 13-24.

Huang, L., Holtzinger, A., Jagan, I., BeGora, M., Lohse, I., Ngai, N., Nostro, C., Wang, R., Muthuswamy, L.B., Crawford, H.C., *et al.* (2015). Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med* 21, 1364-1371.

Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R.S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A.W., *et al.* (2011). SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* *471*, 104-109.

Jeanblanc, M., Ragu, S., Gey, C., Contrepolis, K., Courbeyrette, R., Thuret, J.Y., and Mann, C. (2012). Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion. *Oncogene* *31*, 3072-3085.

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., *et al.* (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* *321*, 1801-1806.

Kohroki, J., Nishiyama, T., Nakamura, T., and Masuho, Y. (2005). ASB proteins interact with Cullin5 and Rbx2 to form E3 ubiquitin ligase complexes. *FEBS Lett* *579*, 6796-6802.

Kondo, K., Kim, W.Y., Lechpammer, M., and Kaelin, W.G., Jr. (2003). Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol* *1*, E83.

Lessard, F., Igelmann, S., Trahan, C., Huot, G., Saint-Germain, E., Mignacca, L., Del Toro, N., Lopes-Paciencia, S., Le Calvé, B., Montero, M., *et al.* (2018). Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway. *Nat Cell Biol* *20*, 789-799.

Lin, H.K., Chen, Z., Wang, G., Nardella, C., Lee, S.W., Chan, C.H., Yang, W.L., Wang, J., Egia, A., Nakayama, K.I., *et al.* (2010). Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* *464*, 374-379.

Liu, B., Yi, J., Yang, X., Liu, L., Lou, X., Zhang, Z., Qi, H., Wang, Z., Zou, J., Zhu, W.G., *et al.* (2019). MDM2-mediated degradation of WRN promotes cellular senescence in a p53-independent manner. *Oncogene* *38*, 2501-2515.

Logsdon, C.D., Simeone, D.M., Binkley, C., Arumugam, T., Greenson, J.K., Giordano, T.J., Misek, D.E., Kuick, R., and Hanash, S. (2003). Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res* *63*, 2649-2657.

Mallete, F.A., and Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle* 6, 1831-1836.

Mallete, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F., and Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 21, 43-48.

Mallete, F.A., Goumard, S., Gaumont-Leclerc, M.F., Moiseeva, O., and Ferbeyre, G. (2004). Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* 23, 91-99.

Parisotto, M., Grelet, E., El Bizri, R., Dai, Y., Terzic, J., Eckert, D., Gargowitsch, L., Bornert, J.M., and Metzger, D. (2018). PTEN deletion in luminal cells of mature prostate induces replication stress and senescence in vivo. *J Exp Med* 215, 1749-1763.

Senft, D., Qi, J., and Ronai, Z.A. (2018). Ubiquitin ligases in oncogenic transformation and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 18, 69-88.

Sherr, C.J. (2012). Ink4-Arf locus in cancer and aging. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1, 731-741.

Sinha, V.C., Qin, L., and Li, Y. (2015). A p53/ARF-dependent anticancer barrier activates senescence and blocks tumorigenesis without impacting apoptosis. *Mol Cancer Res* 13, 231-238.

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., *et al.* (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419.

Vernier, M., Bourdeau, V., Gaumont-Leclerc, M.F., Moiseeva, O., Bégin, V., Saad, F., Mes-Masson, A.M., and Ferbeyre, G. (2011). Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev* 25, 41-50.

Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., *et al.* (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 518, 495-501.

Yang, J.H., Li, J.H., Shao, P., Zhou, H., Chen, Y.Q., and Qu, L.H. (2011). starBase: a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data. *Nucleic Acids Res* 39, D202-209.

Young, A.R., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., *et al.* (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 23, 798-803.

Zheng, N., and Shabek, N. (2017). Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Biochemistry* 86, 129-157.

4. Discussion

La transition vers une cellule cancéreuse est une conséquence de l'accumulation de mutations sur des oncogènes et sur des gènes de suppresseurs de tumeur². La sénescence est un mécanisme de suppression tumorale induit chez des cellules susceptibles de subir une transformation oncogénique³⁰. Face à l'accumulation des mutations, les cellules sénescents peuvent déclencher des mécanismes de régulation protéique qui contrent les altérations génétiques acquises : d'une part, certaines protéines ribosomiques des cellules sénescents peuvent s'accumuler à l'extérieur du ribosome et affecter la fonction des régulateurs du cycle cellulaire, comme CDK4¹⁶. D'une autre part, la mise en place de la sénescence est menée à terme par un programme de dégradation de protéines spécifiques (SAPD), qui contribue à la suppression tumorale^{209, 210}.

Nous pensons que les effecteurs responsables de cette régulation protéique pourraient constituer des nouveaux suppresseurs de tumeurs. Les objectifs de cette thèse étaient en premier lieu de caractériser le rôle de la protéine ribosomique RPL22 comme régulateur du cycle cellulaire et la sénescence. En second lieu, nous voulions identifier des effecteurs du SAPD afin de caractériser leurs fonctions dans la suppression tumorale.

4.1. Discussion du chapitre 2

4.1.1. Résumé des résultats présentés dans le chapitre 2

La sénescence cellulaire est caractérisée par la présence de défauts dans la voie de la biogenèse des ribosomes¹⁶. Ces défauts sont associés à une diminution de certains facteurs de ribogenèse ainsi qu'une accumulation des précurseurs des ARNr et des protéines ribosomiques dans le noyau. Notre laboratoire a montré que lors de la sénescence, la protéine ribosomique RPS14/uS11 (désormais, RPS14) s'accumule dans le nucléoplasme, où elle s'associe avec CDK4 et inhibe sa fonction. L'analyse de l'interactome de cette kinase lors de la sénescence induite par la perte du facteur de la ribogenèse RSL1D1 a montré que d'autres protéines ribosomiques pourraient agir de manière similaire à RPS14, notamment RPL22, dont plusieurs études suggèrent une fonction dans la suppression tumorale^{239, 264, 267, 268}.

Dans l'article présenté dans le chapitre 2, nous avons voulu étudier le rôle de RPL22 dans le cycle cellulaire ainsi que sa capacité à affecter la fonction de CDK4. Nous avons observé que lors de sa surexpression, RPL22 peut s'accumuler dans le noyau et interagir avec CDK4, la cycline D1 ainsi qu'avec le complexe CDK4-cycline D1. De plus, la surexpression de RPL22 favorise un arrêt du cycle cellulaire dépendant des voies p16^{INK4a}-RB et p53-p21^{CIP1}. Enfin, nous avons montré

que l'action de RPL22 sur CDK4 diminue la phosphorylation de RB. En résumé, nous avons montré que RPL22 constitue un nouveau CKI de type RPIC, ce qui implique un mécanisme additionnel de RPL22 dans la suppression tumorale.

4.1.2. RPL22, le cycle cellulaire et la sénescence

Dans cet article, nous avons montré que la surexpression de RPL22 induit un phénotype sénescence. Nos résultats ont révélé que lors de la surexpression de RPL22, une fraction de celle-ci peut s'accumuler dans le noyau, majoritairement dans le nucléole. En effet, lorsque l'on surexprime RPL22, seulement une minorité des protéines produites à partir de la construction rétrovirale se retrouvent en dehors du ribosome, ce qui indique qu'une légère accumulation extra-ribosomique de RPL22 est suffisante pour favoriser la mise en place du phénotype sénescence. Par ailleurs, la forte accumulation de RPL22-MYC dans la fraction ribosomique impliquerait donc des changements dans la composition des ribosomes des cellules infectées, qui pourraient également contribuer au phénotype induit par la surexpression de RPL22. En outre, cela indiquerait que l'étiquette (*tag*) MYC n'empêche pas le recrutement de RPL22 dans les ribosomes. Il est à noter que RPS14, le premier RPIC identifié, s'accumule principalement dans le nucléoplasme et pas dans le nucléole. Nos données non publiées suggèrent que RPS14 mais pas RPL22 subit des modifications post-traductionnelles qui pourraient réguler sa localisation nucléaire.

RPL22 a été identifié dans le même interactome de CDK4 que RPS14 en utilisant un seuil de sélection moins strict. Ce n'est donc pas une surprise que l'interaction de RPL22 avec CDK4 et/ou cycline D1 soit moins forte que dans le cas de RPS14 et que la surexpression de RPL22 induise un phénotype sénescence moins robuste que celui induit par RPS14. Puisque les complexes CDK4-cycline D1 sont dans leur majorité nucléoplasmiques, la fraction extra-ribosomique de RPS14 aurait plus de possibilités d'interagir avec ceux-ci que la fraction nucléolaire de RPL22. Cependant, des fonctions nucléolaires des complexes CDK-cycline ont déjà été reportées^{432, 433}. Notamment, les complexes CDK4-cycline D1 peuvent phosphoryler le facteur transcription nucléolaire UBF (*Upstream Binding transcription Factor*), ce qui stimule son activité et favorise la transcription des ARNr en réponse à des stimuli pro-prolifératifs. RPL22 pourrait donc interagir avec la fraction nucléolaire des complexes CDK4-cycline D1 afin d'empêcher la phosphorylation d'UBF et affecter la biogenèse des ribosomes et la progression du cycle cellulaire. Par ailleurs, à jour 12 post-infection rétrovirale seulement 53.1% des cellules exprimant la construction RPL22-

MYC présentent cette accumulation nucléolaire. Une explication pouvant justifier cette proportion est que la surexpression de RPL22 soit davantage impliquée dans l'acquisition du phénotype sénescence que dans son maintien sur le long terme. Ainsi, 12 jours suivant l'infection, certaines cellules ont peut-être déjà commencé à contourner l'arrêt du cycle cellulaire initié par la surexpression de RPL22. Or, puisque la surexpression de RPL22 peut également être détectée dans le nucléoplasme, une autre possibilité que nous ne pouvons pas exclure est que la fraction nucléoplasmique de RPL22 puisse effectivement interagir avec CDK4-cycline D1 de la même manière que RPS14. Dans cette configuration, l'accumulation de RPL22 dans le nucléole serait plutôt un mécanisme de séquestration empêchant son interaction avec le complexe CDK4-cycline D1 et favorisant la progression du cycle cellulaire.

De la même manière que RPS14, l'arrêt du cycle cellulaire induit par la surexpression de RPL22 semble affecter la voie de RB. Les cellules surexprimant RPL22 ont une expression réduite des cibles des facteurs de transcription E2F comme MCM6, FANCD2 (*Fanconi Anemia Complementation Group D2*), CENPA (*Centromere Protein A*) ainsi qu'une diminution des niveaux de la phosphorylation de RB au niveau de la sérine en position 795. D'un autre côté, la surexpression de RPL22 dans des fibroblastes humains ne semble pas être associée à la variation de l'expression de p53 ou bien de sa forme phosphorylée au niveau de la sérine 15. En accord avec cette observation, l'expression de certaines de ses cibles transcriptionnelles telles que p21^{CIP1} et GADD45A n'est également pas modifiée. Cependant, l'arrêt du cycle cellulaire médié par RPL22 peut être contourné par l'expression des oncoprotéines E6 et E7 (qui inactivent les voies de p53 ou RB, respectivement) ainsi que par des shARN ciblant p53 ou RB. Ce résultat suggère que p53 soit impliquée dans cette forme de sénescence. En fait, la fraction extra-ribosomique de RPL22 a déjà été associée à la voie p53 de plusieurs manières différentes. Notamment, RPL22 peut bloquer l'interaction entre l'E3 ubiquitine ligase HDM2/MDM2 et p53. En conséquence, l'expression de p53 est stabilisée²³⁹. De plus, RPL22 peut contribuer à l'activité du complexe RPL5/uL18-RPL11/uL5, qui a également un rôle dans l'activation de la voie de p53^{238, 240, 243}. Ces rôles de RPL22 sur la voie de p53 expliqueraient pourquoi nous observons un contournement de l'arrêt du cycle cellulaire induit par la surexpression de RPL22 avec E6 ou avec le shARN contre p53. L'absence de marqueurs d'activation de la voie de p53 dans notre modèle d'étude pourrait être due au fait que les effets de RPL22 sur les voies de p53 et de RB ne sont pas forcement simultanés. Cao et collègues ont reporté le rôle de RPL22 sur p53 en analysant les marqueurs d'activation de

cette voie entre 30h et 48h après la surexpression de RPL22. Dans notre cas, à jour 12 post-infection, nous ne sommes pas capables de les détecter. Cependant, nous observons une légère stabilisation de p53 à jour 3 post-infection. Ceci suggère que l'effet de la fraction extra-ribosomique de RPL22 sur la voie de p53 pourrait être plus important dans des étapes plus précoces du phénotype. Le contournement de l'arrêt de cycle cellulaire médié par RPL22 en coinfectant avec E6 ou le shp53 arriverait parce que ces constructions sont infectées simultanément. De plus, cette activation de p53 peut promouvoir, entre autres, l'apoptose. L'induction de l'apoptose dans une portion des cellules exprimant la construction RPL22 pourrait également expliquer pourquoi nous observons l'accumulation nucléolaire de RPL22 dans seulement le 53,1% des cellules infectées. D'un autre côté, RPL22 peut interagir avec l'ARNm de p53 et inhiber sa traduction²⁴⁵. Une autre possibilité est que dans notre modèle d'étude, l'effet de RPL22 sur la stabilisation et l'activation de p53 soit compensé par son rôle dans l'inhibition de la traduction de p53, ce qui nous empêcherait d'observer des effets sur p53 ou ses cibles.

Nous avons observé que la surexpression de RPL22 affecte également le cycle cellulaire dans des cellules de cancer de prostate PC3 dépourvues de p53. Cependant, Cao et collègues ont analysé le rôle de RPL22 dans des lignées cellulaires cancéreuses possédant des mutations inactivatrices de p53 et n'ont pas détecté d'effets sur la prolifération, suggérant que RPL22 agit par un mécanisme dépendant fortement de p53. Ceci pourrait être dû aux différences dans le timing des méthodes expérimentales utilisées. En effet, Cao et collègues ont analysé la prolifération de leurs cellules par essai de formation de colonies après 10 jours de sélection de la construction RPL22 avec des antibiotiques, ce qui aurait donné le temps à certaines des cellules cancéreuses infectées de contourner l'arrêt du cycle et de générer des colonies. En revanche, nous avons évalué la prolifération à partir du jour 3 post-sélection, en fixant les cellules chaque 2 jours, ce qui facilite l'observation des changements subtils sur le taux de prolifération. Nous pensons que dans les conditions où p53 est fonctionnel, la surexpression de RPL22 agirait sur les voies de p53 et RB. Cependant, dans des conditions où p53 est inactif, RPL22 agirait uniquement sur la voie de RB, ce qui produirait un arrêt du cycle cellulaire moins robuste.

L'arrêt du cycle cellulaire induit par la surexpression de RPL22 est dépourvu du SASP. Ceci pourrait être expliqué par les résultats de Rao et collègues, qui montrent un rôle de RPL22 dans l'inhibition du facteur de transcription NF- κ B, un des régulateurs principaux du SASP. De

plus, la perte de fonction de NF- κ B couplée à l'inactivation de p53 chez des fibroblastes humains produit un contournement de la sénescence¹⁴⁷, ce qui pourrait également expliquer nos résultats avec E6 et avec le shARN contre p53. Cette absence de SASP a également été observée dans la sénescence induite par RPS14 ainsi que par la surexpression de p16^{INK4a}^{16, 434}. D'un autre côté, contrairement à la sénescence induite par RPS14, nous ne détectons pas d'accumulation de corps nucléaires de PML suivant la surexpression de RPL22. Puisque ces structures ont été associées à la stabilité du phénotype sénescence^{125, 129}, ceci pourrait donner une explication supplémentaire au fait que l'arrêt induit par RPL22 soit moins stable que celui induit par RPS14.

Nous avons également évalué l'effet de la perte d'expression de RPL22 sur le cycle cellulaire. La diminution des niveaux de RPL22 par l'action de shARN ralentit la prolifération de fibroblastes normaux et des cellules dépourvues de p53 (PC3). Ceci a également été observé par d'autres groupes dans des cellules normales⁴³⁵ et cancéreuses²⁷⁰. Puisque RPL22 semble agir comme un suppresseur de tumeur, on aurait pu s'attendre à ce que sa perte contribue à la prolifération cellulaire. Par ailleurs, la perte d'expression de RPS14 produit un phénotype similaire. Bien que l'expression de RPL22 ne soit essentielle ni pour la biogenèse des ribosomes ni la traduction, d'autres fonctions ont été identifiées pour cette protéine. Par exemple, RPL22 peut interagir avec la protéine Ago2 (*Argonaute RISC catalytic component 2*)⁴³⁶, qui a un rôle clé dans la maturation des micro-ARN. En outre, RPL22 peut lier l'ARN de la télomérase²⁵⁴. De plus, RPL22 a un rôle dans l'activation de la voie de BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*) en régulant la traduction de SMAD1⁴³⁷ (*SMAD family member 1*). Récemment, RPL22 a également été associé à la signalisation de la voie TGF- β ⁴³⁸. La perturbation d'une ou plusieurs de ces fonctions par la perte d'expression de RPL22 pourrait contribuer à la perte de la capacité de prolifération. En outre, nous avons observé que le shARN B induit une plus forte diminution de la prolifération que le shARN A, même si ce dernier semble être plus efficace. Il a déjà été montré que la perte de RPL22 peut être compensée par l'expression de son paralogue RPL22L1, qui a été associée à des fonctions antagonistes et pro-tumorales par rapport à RPL22^{264, 439}. Nous pensons que l'expression de RPL22L1 pourrait être augmentée dans les conditions où le shARN contre RPL22 est le plus efficace et que ceci pourrait favoriser le contournement de l'arrêt du cycle cellulaire. Toutefois, les mécanismes génétiques de l'induction de RPL22L1 en réponse à la perte de RPL22 ne sont pas connus. Nous pourrions lancer l'hypothèse que lorsque les niveaux de RPL22 diminuent et atteignent un seuil, la cellule engage des mécanismes afin d'induire l'expression de RPL22L1. Ce

seuil est peut-être atteint lorsque l'un des allèles de RPL22 est inactivé (comme dans les cas des cancers colorectal, du poumon ou gastrique) ainsi que dans la condition expérimentale shARN A. De plus, les mécanismes moléculaires des fonctions pro-oncogéniques de RPL22L1 ne sont pas encore connus. En fait, nous pouvons lancer l'hypothèse que RPL22L1 pourrait contribuer à la progression tumorale en inhibant les fonctions suppressives des protéines RPL22 restantes dans la cellule. Par exemple, RPL22L1 pourrait affecter l'interaction de RPL22 avec CDK4 et/ou cycline D1. Il serait donc intéressant d'analyser l'expression et la localisation de RPL22L1 et de RPL22 ainsi que la capacité de formation de colonies dans cellules exprimant les shARN A et B. Nous aurions peut-être pu observer un regain de la prolifération des cellules infectées avec le shARN A dans une expérience à plus long terme. Cependant, bien que l'inactivation d'un des allèles de RPL22 soit associée à la progression tumorale, l'inactivation des deux allèles semble réduire la formation de métastases dans un modèle murin de lymphome⁴⁴⁰. En définitive, nous devons continuer les efforts afin de mieux comprendre l'effet des variations des niveaux de RPL22 sur la progression tumorale ainsi que le mécanisme d'action du paralogue RPL22L1.

Une des limitations de notre étude est l'absence de données sur la protéine RPL22 endogène. Il aurait été intéressant d'évaluer les niveaux d'expression ainsi que la localisation de RPL22 dans différents modèles de sénescence (OIS, TIS, *in vivo*, etc.) afin de valider la pertinence de nos résultats. Nous avons essayé d'effectuer des *western blots* et des immunofluorescences de la protéine RPL22 endogène, mais nous avons trouvé des problèmes techniques avec les deux anticorps utilisés. Par ailleurs, il y a peu de données dans la littérature sur l'expression physiologique de RPL22. Quelques exemples sont l'étude de Yang et collègues, qui a montré que les niveaux protéiques et d'ARNm de RPL22 sont diminués dans des tissus provenant des patients atteints de cancer de poumon comparés avec des poumons sains²⁷⁰; et l'article de Zeng et collègues, qui montre des données sur l'accumulation de la protéine RPL22 endogène dans des échantillons de peau provenant de patients atteints de psoriasis⁴⁴¹.

Enfin, nous avons montré que RPL22 peut lier le complexe CDK4-Cycline D1, mais aussi CDK4 et cycline D1 indépendamment. Il serait intéressant de déterminer quelles régions de RPL22 sont nécessaires pour son activité comme RPIC, et d'évaluer si RPL22 pourrait agir sur d'autres types de CDK ou de cyclines. Les implications de ces résultats dans le développement des thérapies seront discutées dans la prochaine section.

4.1.3. Protéines ribosomiques en tant que suppresseurs de tumeur

La découverte de RPL22 comme un CKI du type RPIC est pertinente d'un point de vue clinique. Étant donné l'importance des CDK dans la progression des cancers, il y a un intérêt collectif pour l'identification de composés qui pourraient réguler leur activité. Par exemple, après des années de développement, les inhibiteurs de CDK4/6 palbociclib, abemaciclib et ribociclib ont été approuvés pour le traitement des cancer du sein⁴⁴². La découverte des domaines d'interaction entre RPL22 et le complexe CDK4-cycline D1 pourrait contribuer au développement d'autres composés inhibiteurs de CDK4. La découverte d'un nouveau mécanisme de suppression tumorale de RPL22 indépendant de p53 est encourageant car les thérapies basées sur cette protéine ribosomique pourraient donc s'utiliser dans les cancers où p53 est muté. De plus, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que cette protéine ribosomique puisse agir en tant qu'inhibiteur sur d'autres CDK ou encore, d'autres kinases. Par exemple, Yang et collègues ont montré que RPL22 peut interagir avec CK2 α (*Casein Kinase 2 α*) et inhiber sa fonction dans des cellules cancéreuses de poumon⁴⁴³. CK2 α est une cible thérapeutique prometteuse puisqu'elle est impliquée dans la progression du cycle cellulaire et ses niveaux d'expression sont élevés dans plusieurs types de cancer⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁷. De plus, il a déjà été montré que l'inhibition de CK2 α induit la sénescence chez des cellules cancéreuses⁴⁴⁴. RPL22 pourrait également contribuer à la suppression tumorale en inhibant cette kinase. RPL22 a donc plusieurs rôles différents dans la progression du cycle cellulaire et la sénescence, dépendants ou indépendants de p53. De plus, le phénotype sénescence déclenché par la surexpression de RPL22 est dépourvu du SASP, qui est responsable de beaucoup des effets pernicieux de la sénescence cellulaire. Cela pourrait donc suggérer que les thérapies basées sur cette protéine ribosomique pourraient avoir moins d'effets indésirables.

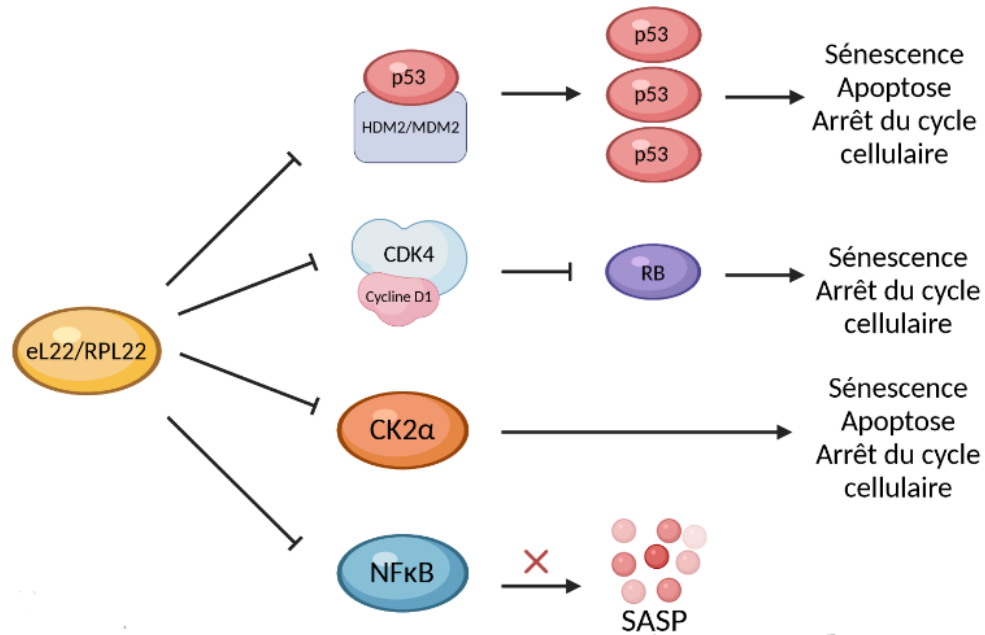


Figure 4.1 : Mécanismes de régulation du cycle cellulaire par RPL22/eL22

RPL22 peut affecter le cycle cellulaire de différentes manières. D'un côté, RPL22 peut bloquer l'interaction entre l'E3 ligase HDM2/MDM2 et p53, ce qui produit la stabilisation et activation de cette dernière²³⁹. De plus, RPL22 peut contribuer à l'activité du complexe RPL5/uL18-RPL11/uL5, qui est également un régulateur positif de p53^{238, 240}. D'un autre côté, nous avons montré que RPL22 peut agir comme un inhibiteur de CDK4, ce qui produit l'activation de la voie de RB et l'induction de la sénescence¹⁵. RPL22 peut également inhiber la kinase CK2 α ⁴⁴³ dont sa perte de fonction a été associée à la stabilisation de p53 ainsi qu'à l'inactivation du facteur de transcription NF- κ B^{444, 448-450}. Enfin, RPL22 peut également inhiber NF- κ B via l'activation du facteur Lin28B (*Lin-28 Homolog B*)²⁶⁴.

Puisque les cellules cancéreuses nécessitent une forte synthèse de ribosomes afin de soutenir leur taux de prolifération et de synthèse protéique, plusieurs stratégies antitumorales ont été conçues dans le but de cibler la ribogenèse. La perturbation de la voie de la biogenèse des ribosomes par ces composés anticancéreux peut produire une accumulation extra-ribosomique de certaines protéines ribosomiques. Ces dernières peuvent donc contribuer à l'effet antitumoral en rétablissant l'activation des voies suppressives p53-p21^{CIP1} et/ou p16^{INK4a}-RB. Par exemple, le traitement avec de l'actinomycine D, un agent chimio-thérapeutique qui agit en inhibant la transcription, produit une relocalisation des protéines ribosomiques RPL5/uL18, RPL11/uL5 et

RPL23/uL14 (*Ribosomal Protein L23/Large ribosomal subunit protein uL14*), lesquelles ont déjà été associées à l'activation de la voie p53. Aussi, le traitement avec CX-5461, un inhibiteur de l'ARN polymérase I, produit un changement de localisation de RPS14 et pourrait expliquer certaines des propriétés anti-cancéreuses de ce composé¹⁶. Il serait intéressant d'observer les niveaux et la localisation de RPL22 après le traitement avec l'un de ces composés chimiothérapeutiques, afin d'évaluer si RPL22 contribue également à leur capacité de bloquer la prolifération cellulaire.

En plus de RPL22 et RPS14, nous pensons que d'autres protéines ribosomiques pourraient également constituer des RPIC, notamment les autres candidats identifiés dans l'interactome de CDK4¹⁵ (RPS3A/eS1, RPS4X/eS4, RPL7/uL30, RPL15/eL15 et RPL24/eL24). Le rôle de certaines protéines ribosomiques dans le cycle cellulaire et notamment sur la voie p53 a déjà été bien établi. La découverte des nouvelles protéines ribosomiques comme RPIC impliquerait un mécanisme de suppression tumorale indépendant de p53, ce qui a un fort intérêt clinique car plus de 50% des cancers humains présentent des mutations sur *TP53*^{31, 32}. De plus, les cellules cancéreuses présentent souvent des marqueurs de stress nucléolaire, qui mènent à une accumulation en dehors du ribosome de certaines protéines ribosomiques, où elles peuvent acquérir d'autres fonctions et réguler le cycle cellulaire. Les cellules cancéreuses arborent fréquemment des mutations de RPL22 ainsi que dans d'autres protéines ribosomiques associées à la suppression tumorale, ce qui implique que ces cellules ont dû contourner les mécanismes déclenchés par ces protéines afin de poursuivre la progression tumorale. De plus, les modifications dans les niveaux ou bien la localisation des protéines ribosomiques indiquerait que les ribosomes présents dans les cellules cancéreuses auraient des changements dans leur composition voire efficacité. Par exemple, certaines altérations ribosomiques associées aux cellules cancéreuses promeuvent la traduction de certains proto-oncogènes (BCL-2⁴⁵¹, VEGF⁴⁵²), tandis qu'elles diminuent la production de protéines suppressives (comme p53⁴⁵³). Le ciblage de ces ribosomes propres aux cellules cancéreuses, connus comme onco-ribosomes, pourrait également constituer une nouvelle stratégie antitumorale⁴⁵⁴.

4.2. Discussion du chapitre 3

4.2.1. Résumé des résultats présentés en chapitre 3

La mise en place de la sénescence cellulaire passe par un programme de dégradation de protéines spécifiques, connu comme SAPD. Ce dernier pourrait expliquer plusieurs caractéristiques associées aux cellules sénescents. Ce programme de dégradation est mené à terme par le système ubiquitine-protéasome (UPS), un mécanisme finement régulé par une multitude de protéines différentes. Parmi ces protéines, les E3 ubiquitine ligases déterminent la spécificité de l'UPS en interagissant sélectivement avec les cibles à dégrader. Nous pensons que des E3 ubiquitine ligases spécifiques pourraient contrôler le SAPD et la sénescence cellulaire. Afin d'identifier les E3 ubiquitine ligases importantes pour la sénescence, nous avons utilisé une technique de criblage par perte de fonction en utilisant une librairie de shARN ciblant des gènes codant pour des E3 ubiquitine ligases. Ce criblage a été effectué dans le contexte de la sénescence induite par l'oncogène *RAS* et a révélé l'E3 ubiquitine ligase ASB14 comme étant importante pour ce processus.

Nos résultats montrent que l'E3 ubiquitine ligase ASB14 est importante pour la sénescence cellulaire car sa perte de fonction par l'action de shARN mène à un contournement de ce processus dans un modèle de fibroblastes murins (MEF) et de cellules épithéliales pancréatiques (HPNE). Le contournement de l'OIS par la perte d'ASB14 dans des fibroblastes humains nécessite la perte de fonction de RB, ce qui suggère un rôle d'ASB14 dans la voie de p53. La protéine ASB14 est très peu caractérisée et ses rôles sont inconnus. Nous avons donc généré des anticorps afin de mieux étudier cette E3 ligase. L'analyse d'ASB14 sur des tissus humains a révélé une très forte expression de cette dernière dans le pancréas sain, tandis que ses niveaux diminuent dans les tumeurs pancréatiques. Enfin, nous avons identifié les partenaires d'interaction d'ASB14 dans le contexte de la sénescence induite par l'oncogène RAS.

4.2.2. ASB14 et son rôle dans la sénescence cellulaire

Pendant ce doctorat, un criblage de perte de fonction par shARN nous a permis d'identifier des gènes d'E3 ubiquitine ligases importants pour la sénescence induite par l'oncogène RAS. Nous avons découvert que la perte de fonction des gènes *Asb14*, *Rc3h1* (*RING Finger and CCCH-type domains 1*) et *Pcgfl* (*Polycomb Group RING Finger 1*) était suffisante pour produire un contournement de la sénescence induite par l'oncogène RAS. Curieusement, aucun rôle n'a été

identifié pour ces gènes dans la dégradation protéique. D'une part, l'E3 ligase ASB14 n'a pas été caractérisée et ses fonctions ne sont pas encore identifiées. Ensuite, la protéine RC3H1 a été plutôt associée à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. En fait, elle est impliquée dans la stabilisation et la traduction des ARNm^{455, 456}. D'un autre côté, PCGF1 fait partie du complexe répressif PRC1 (*Polycomb Repressive Complex 1*), impliqué dans la régulation épigénétique de la chromatine^{457, 458}. Nous avons décidé de nous centrer sur ASB14, car contrairement à *RC3H1* et *PCGF1*, le gène *ASB14* est plutôt inactivé ou altéré dans différents types de cancer (données provenant de la base de données cBioPortal), ce qui suggère un rôle d'ASB14 dans la suppression tumorale.

L'approche utilisée lors du criblage a des avantages et des inconvénients. D'un côté, l'utilisation des cellules de souris facilite l'observation de cellules contournant la sénescence, car la régulation de celle-ci est plus simple chez la souris que chez l'humain⁴⁵⁹. Cependant, ceci ajoute une étape supplémentaire de validation dans des cellules humaines afin de déterminer si nos résultats sont pertinents pour la sénescence et la suppression tumorale chez l'humain. De plus, dans nos conditions nous avons juste évalué la capacité de contourner la sénescence par la reprise de la capacité de prolifération, ce qui est simple et facile à évaluer visuellement, mais qui aurait pu également donner lieu à de faux positifs. Afin de résoudre ces limitations, nous avons confirmé nos résultats du criblage avec deux shARN différents dans des MEF, dans des fibroblastes humaines (IMR90) ainsi que dans des cellules épithéliales pancréatiques (HPNE). Dans le modèle de MEF, nous avons observé que la perte d'expression d'Asb14 produit une reprise de la capacité de prolifération dans les cellules sénescents ainsi qu'une diminution de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence. De plus, dans ces conditions nous observons une accumulation du marqueur de prolifération Ki67 et une diminution de l'ARNm de Pml, une des cibles de p53. Chez les cellules humaines, nous sommes capables de reproduire le contournement de l'OIS en coinfectant le shASB14 avec l'oncoprotéine E7, mais pas avec E6. Ces données suggèrent qu'ASB14 pourrait jouer un rôle sur la voie de p53. Curieusement, dans les modèles étudiés, la perte d'expression d'ASB14 produit également une diminution de la capacité de prolifération dans les cellules contrôles. ASB14 semble être alors important dans la régulation de la prolifération en conditions physiologiques. Il serait intéressant de confirmer nos résultats de perte d'expression d'ASB14 en utilisant la technologie CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated protein 9*). Enfin, nous ne pouvons pas exclure que la

perte d'expression d'ASB14 dans les cellules sénescentes soit compensée par un autre membre de la famille ASB.

Nos données suggèrent également qu'il existe des fonctions similaires parmi la protéine Asb14 chez la souris et son orthologue chez l'humain. L'isoforme 1 d'ASB14 présente un 83% d'homologie avec l'isoforme 1 chez la souris et leurs domaines de répétition ankyrine semblent être assez similaires. Pour la suite du projet, nous nous sommes centrés sur le gène *ASB14* chez l'humain. Ce dernier est assez complexe et peut produire plusieurs isoformes qui diffèrent dans la quantité des domaines de répétitions ankyrine et/ou la présence du domaine SOCS-box (comme dans le cas de l'isoforme 3). Les isoformes analysées dans ce projet sont celles dont il y a des preuves de leur existence au niveau protéique selon la base de données PubMed. Ces isoformes semblent être générées par la présence de sites alternatifs d'initiation de la transcription. Puisque nous n'avons pas eu des résultats encourageants avec les anticorps contre ASB14 disponibles dans le marché, nous avons conçu un anticorps anti-ASB14 ciblant une région commune des quatre isoformes. Il est à noter que ces isoformes pourraient avoir des rôles et/ou des localisations différents.

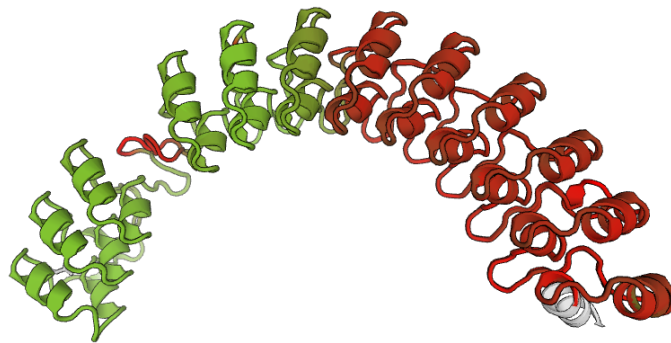


Figure 4.2 : Superposition des structures de l'isoforme 1 d'ASB14 humain et d'Asb14 murin

Modèle des structures effectué par homologie en utilisant le serveur SwissModel⁴⁶⁰. La structure d'ASB14 humain a été modélisée à partir des acides aminés 49-452 de l'isoforme 1 d'ASB14 humain (Uniprot A6NK59); MolProbity Score = 1.73. Pour la structure d'Asb14 murin, le modèle a été effectué à partir de la séquence des acides aminés 57-450 de l'isoforme 1 (Uniprot A0A5F8MPW7); MolProbity Score = 1.59. Le N-terminale et les répétitions ankyrine se trouvent à la droite du modèle, tandis que le C-terminale et les domaines SOCS-box se trouvent à la gauche. Les régions colorées en vert indiquent une homologie de séquence et de structure. Les régions colorées en rouge indiquent la présence de structures similaires sans avoir des séquences identiques. Les régions indiquées en blanc indiquent les parties non superposées de

chaque structure. Le *MolProbity Score* représente la quantité d'acides aminés qui pourraient interférer avec la structure modélisée⁴⁶¹.

Dans les trois modèles étudiés, les niveaux d'expression d'ASB14 augmentent dans les cellules sénescentes. L'analyse des données de ChIP-Seq a montré que le facteur de transcription GATA4 pourrait interagir avec des régions adjacentes au gène ASB14. Notamment, plusieurs bases de données ont identifié des sites de liaison sur la séquence prédite comme étant le promoteur d'ASB14 (prédiction effectuée par Promoter 2.0⁴⁶²). *GATA4* est un gène important pour la sénescence cellulaire et pour le développement du SASP¹⁵⁰. Nous avons observé que la surexpression de GATA4 produit une augmentation de l'expression d'ASB14, au niveau transcriptionnel et protéique, suggérant un rôle de GATA4 dans la régulation d'ASB14. Nous devons continuer nos analyses afin d'élucider si cette régulation est effectuée de manière directe (en induisant l'ARNm ou en stabilisant la protéine) ou indirecte (par le biais d'autres effecteurs). Il serait donc intéressant d'observer les niveaux des composants du SASP dans les modèles étudiés afin d'évaluer si la perte d'ASB14 pourrait affecter le développement de ce dernier.

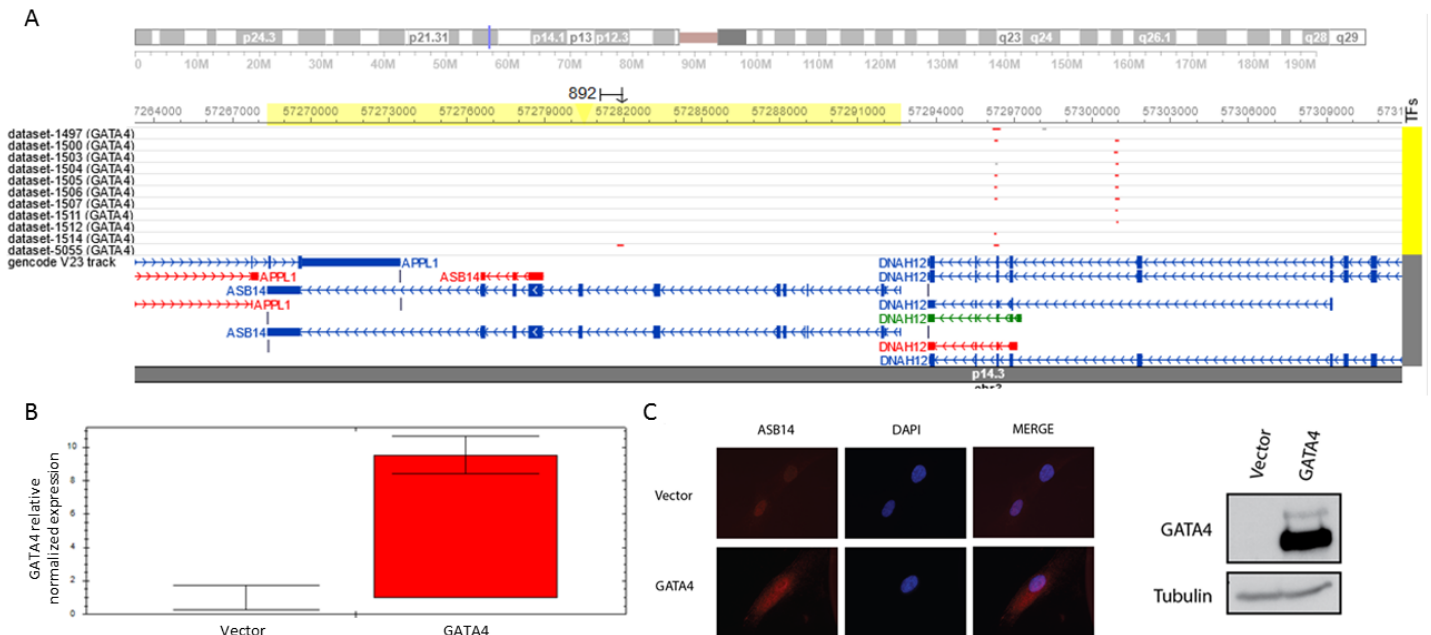


Figure 4.3 GATA4 pourrait être un régulateur de l'expression d'ASB14

(A) Données de ChIP-Seq de 11 expériences différentes montrant une interaction entre le facteur de transcription GATA4 et des régions adjacentes au gène *ASB14* dans le chromosome 3 (points rouges).

Données de hTFtarget⁴⁶³. L'ensemble de données 1497 correspond à des données extraites de cellules cancéreuses (AGS) tandis que les autres proviennent des cellules normales (HUES64 et BJ). **(B)** Analyse par qPCR des niveaux de l'ARNm d'ASB14 dans des cellules IMR90 infectées avec un vecteur lentiviral contenant le cDNA (*complementary DNA*) de GATA4 ou avec un vecteur contrôle. Les analyses ont été effectuées 7 jours après l'infection lentivirale. (n=3) **(C)** Immunofluorescences d'ASB14 dans les mêmes cellules que (B). L'ADN nucléaire est représenté en bleu (DAPI). La surexpression de GATA4 a été validée par *western blot*.

Néanmoins, la surexpression d'ASB14 ne semble pas avoir un effet sur l'induction ou le maintien du phénotype sénescence. Puisque nos données suggèrent qu'ASB14 a un rôle important dans la sénescence, nous avons émis plusieurs hypothèses qui pourraient expliquer l'absence d'effet de la surexpression. Ces possibilités ne s'excluent pas mutuellement.

1. La surexpression n'est pas assez forte et/ou nous n'avons pas réussi à atteindre des niveaux d'expression suffisants pour observer un effet dans la sénescence ou la capacité de prolifération. Nos expériences ont été effectuées avec des plasmides exprimant les isoformes d'ASB14 sous le contrôle d'un promoteur 5'LTR (*Long Terminal Repeat*) ou d'un promoteur régulé par la tétracycline. Dans les deux cas, nous n'avons pas réussi à observer des effets significatifs sur la prolifération.

2. La construction ASB14 pourrait se faire dégrader rapidement une fois surexprimée. Il a déjà été observé que plusieurs éléments de reconnaissance des substrats des CRL présentent une courte demi-vie car ils peuvent s'auto-ubiquitiner⁴⁶⁴. De plus, Andresen et collègues ont identifié qu'un des partenaires d'interaction d'ASB14 est ASB14 lui-même³⁷⁴. Puis, nous observons une stabilisation de la protéine ASB14 surexprimée lorsque l'on traite les cellules avec du MG132, un inhibiteur du protéasome.

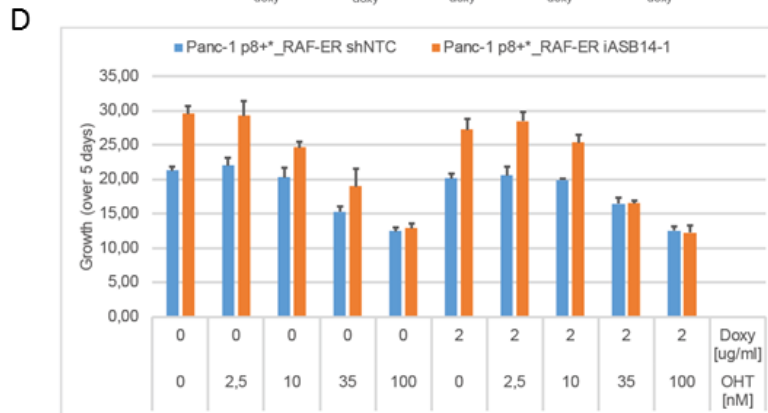
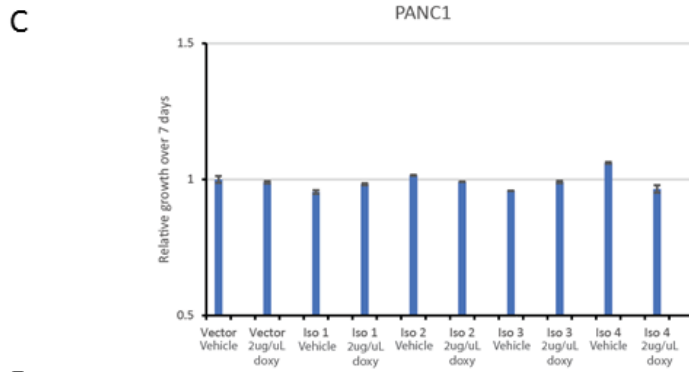
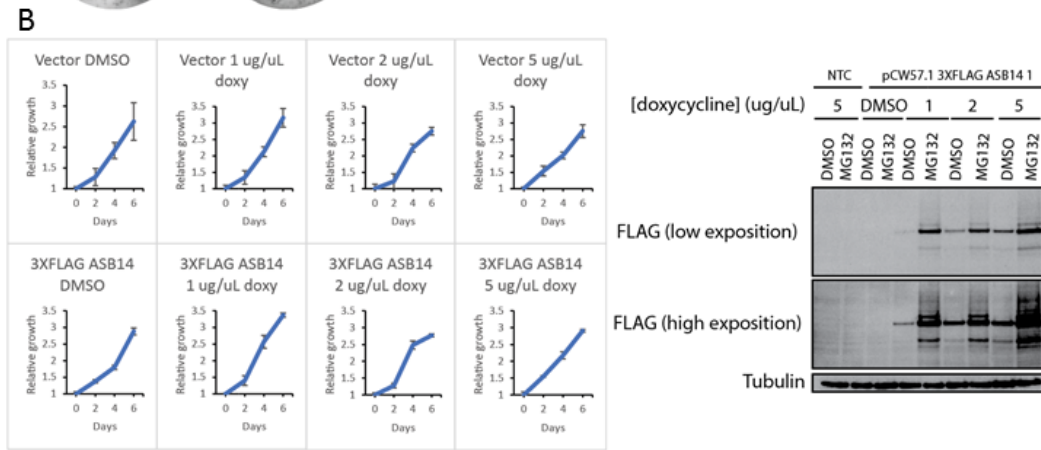
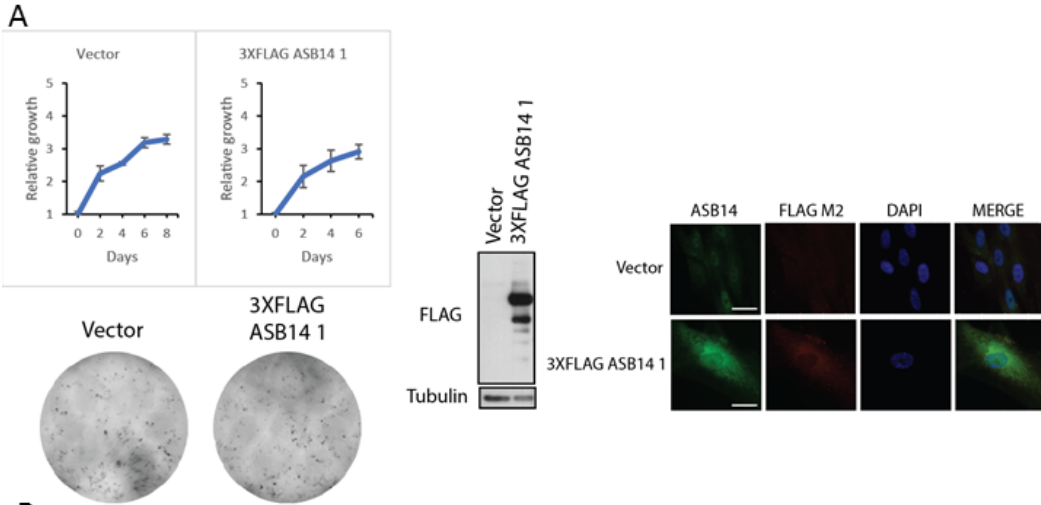


Figure 4.4 : La surexpression d'ASB14 n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules normales et cancéreuses

Dans tous les cas, la prolifération a été évalué par coloration au crystal violet, comme décrit sur (125) **(A)** Analyse de la prolifération des fibroblastes humains IMR90 exprimant l'isoforme 1 d'ASB14 couplée à une étiquette (*tag*) 3XFLAG sous le contrôle d'un promoteur 5'LTR ou le vecteur d'expression MSCV-puro-linker vide comme contrôle. La surexpression a été effectuée par transfert rétroviral suivi d'un traitement de 3 jours avec de la puromycine afin de sélectionner les cellules infectées. Les niveaux d'expression de 3XFLAG-ASB14 sont montrés par *western blot* (la bande d'une plus forte intensité est à la même taille que la taille prédite pour la protéine fusion) et par immunofluorescence. ASB14 est représenté en vert, l'étiquette FLAG est représenté en rouge et l'ADN nucléaire (DAPI) est montré en bleu; barre d'échelle : 50 μm . **(B)** Analyse de la prolifération des cellules cancéreuses pancréatiques PANC1 exprimant l'isoforme 1 d'ASB14 couplée à une étiquette 3XFLAG sous le contrôle d'un promoteur régulé par la tétracycline. Un plasmide vide est utilisé comme contrôle. Les cellules ont été traitées avec des différentes doses de doxycycline afin d'analyser l'effet de l'induction de différents niveaux d'expression de 3XFLAG-ASB14 sur la prolifération. Les niveaux d'expression d'ASB14 sont montrés par *western blot*. Avant l'extraction de protéines, les cellules ont été traitées avec 20 μM de l'inhibiteur du protéasome MG132 ou avec du DMSO. **(C)** Analyse de la prolifération des cellules PANC1 exprimant les différentes isoformes d'ASB14 couplées à une étiquette 3XFLAG sous le contrôle d'un promoteur régulé par la tétracycline. Un plasmide vide est utilisé comme contrôle. Le graphique montre le ratio du signal à 590 nm obtenu à jour 7 post-induction sur le signal obtenu à jour 0, relativisé sur le ratio des cellules exprimant le vecteur vide et traitées avec le véhicule (DMSO). **(D)** Analyse de la prolifération des cellules PANC1 exprimant une version constitutivement active de la kinase RAF (RAF-ER) sous le contrôle du promoteur du récepteur d'estrogènes (ER) ainsi que l'isoforme 1 d'ASB14 couplée à une étiquette 3XFLAG sous le contrôle d'un promoteur régulé par la tétracycline (iASB14-1). Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de 4-OHT (4-hydroxytamoxifen) et de doxycycline afin d'induire les constructions RAF-ER et iASB14 respectivement. Un plasmide vide est utilisé comme contrôle de l'induction par la doxycycline (bleu). Le graphique montre el ratio su signal à 590nm obtenu à jour 5 post-induction sur le signal obtenu à jour 0. Il est à noter que l'expression de RAF induit un arrêt prolifératif similaire à la sénescence dans les cellules PANC1, qui n'est pas renforcé lors de l'expression d'ASB14.

3. Puisque l'activité E3 ubiquitine ligase d'ASB14 dépend de la formation d'un complexe CRL, nous devrions peut-être surexprimer les autres composantes du complexe afin d'observer un effet. De plus, puisque les complexes CRL ont besoin d'être neddylés pour être actifs⁴⁶⁵, nous devrions

peut-être forcer la neddylation du complexe CRL5-ASB14 dans notre système (par exemple, en coexprimant NEDD8). Cependant, cette possibilité est moins probable puisque l'expression d'autres membres de la famille ASB par eux-mêmes semble être suffisante pour la dégradation de leurs substrats et/ou leur activité^{381, 385, 390, 413, 416}.

4. Nous pourrions avoir besoin d'un signal additionnel afin de rendre l'ASB14 surexprimé actif. Par exemple, la protéine FEM1B (*FEM-1 homolog B*), un des éléments de reconnaissance des substrats des E3 ligases de type CRL2 reconnaît son substrat FNIP1 (*Folliculin-Interacting Protein 1*) en conditions de stress réducteur⁴⁶⁶. En effet, la réduction de résidus cystéine spécifiques sur FNIP1 permettraient la reconnaissance de la protéine par les domaines de répétitions ankyrine de FEM1B. De plus, nous savons que les cellules sénescents présentent une accumulation de NADH⁶⁷. ASB14 pourrait donc agir de manière similaire à FEM1B en reconnaissant ses substrats en présence d'un stress réducteur (ou dans d'autres conditions intracellulaires liées avec l'induction de la sénescence). Une autre possibilité est que la localisation d'ASB14 soit dynamique et que le signal requis pour l'activité d'ASB14 régule sa localisation et ainsi son activité.

4.2.3. Cibles d'ASB14

Afin de mieux comprendre le rôle d'ASB14, nous avons effectué l'identification par IP-MS de ses partenaires d'interaction dans des cellules sénescents et proliférantes. Nos données suggèrent que l'isoforme 1 d'ASB14 forme des complexes CRL5 conventionnels, car nous avons détecté la protéine d'échafaudage cullin 5 ainsi que les protéines adaptatrices elongin B et C. Nous avons également détecté certaines protéines qui avaient déjà été préalablement identifiés dans l'interactome publié par Andresen et collègues, comme RPL23/uL14, RPS6/eS6 (*Ribosomal Protein S6*), PHB (*Prohibitin*), SLC25A1 (*Solute Carrier family 25 member 1*) et CYC1 (*Cytochrome C1*), ce qui suggère une certaine redondance des substrats d'ASB14 parmi les cellules cancéreuses et les fibroblastes.

L'interactome d'ASB14 a révélé qu'un grand nombre de ses partenaires d'interaction sont des protéines ribosomiques. Plus précisément, nous avons détecté 31 protéines ribosomiques dans l'analyse par IP-MS. Nous avons observé que la plupart de ces protéines sont stabilisées dans les cellules RAS après le traitement avec MG132, ce qui suggère qu'ASB14 pourrait cibler certaines protéines ribosomiques lors de la sénescence cellulaire. Puisque la plupart des protéines détectées sont cytoplasmiques, nous pourrions assumer que les protéines ribosomiques ciblées par ASB14

font partie des ribosomes et/ou se trouvent dans le cytosol. Nous pensons qu'ASB14 pourrait donc favoriser la localisation nucléaire de certaines protéines ribosomiques lors de la sénescence, en dégradant celles qui restent dans le cytosol. Ainsi, ASB14 pourrait promouvoir des rôles extra-ribosomiques pour certaines protéines ribosomiques. Une autre possibilité est qu'ASB14 joue un rôle dans la dégradation des ribosomes. Notamment, il a déjà été montré que certaines E3 ubiquitine ligases peuvent cibler les protéines ribosomiques des ribosomes bloqués afin d'éliminer les ribosomes défectueux⁴⁶⁷⁻⁴⁶⁹. Par exemple, les ARNm possédant des séquences riches en poly-adénine peuvent générer des interactions qui bloquent les ribosomes et inhibent ainsi la traduction protéique. Dans ces cas, l'ubiquitination des protéines ribosomiques présentes dans les ribosomes bloqués permet l'activation des voies de contrôle de qualité de ribosomes qui promeuvent le recyclage des sous-unités ribosomiques défailantes. Ceci implique que certaines E3 ubiquitine ligases participent aux mécanismes de surveillance des ARNm en ciblant les ribosomes défectueux^{470, 471}. De plus, Nguyen et collègues ont montré que l'enzyme E2-E3 UBE2O (*Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 O*) peut ubiquitiner une multitude de protéines ribosomiques lors de la différenciation des réticulocytes, ce qui promeut l'élimination de leurs ribosomes ainsi que des changements dans leur protéome⁴⁷². Lors de l'induction de la sénescence, ASB14 pourrait participer aux mécanismes de dégradation des ribosomes, en contribuant au contrôle de qualité des ceux-ci et/ou en régulant le remodelage du protéome vers un protéome « sénescence ». ASB14 pourrait également jouer un rôle dans la régulation de la stœchiométrie des protéines ribosomiques dans la formation de nouveaux ribosomes^{473, 474}. En fait, notre groupe de recherche a déjà reporté que les ribosomes des cellules sénescence sont moins susceptibles de générer des extensions dans les peptides synthétisés par des mécanismes de translecture¹⁹³ (*readthrough*). ASB14 pourrait contribuer à générer donc une population de ribosomes associée au phénotype sénescence.

Dans l'analyse des partenaires d'interaction d'ASB14, nous avons également identifié beaucoup de protéines du cytosquelette. ASB14 semble interagir avec un plus grand nombre de ces protéines dans les cellules proliférantes que dans les cellules sénescence (même après le traitement avec MG132). Dans des conditions physiologiques, ASB14 pourrait donc être un régulateur de la dynamique du cytosquelette. Ceci pourrait impliquer que lors de l'induction de la sénescence, ASB14 effectuerait d'autres fonctions indépendantes du cytosquelette, ce qui pourrait permettre l'expansion et la morphologie des cellules sénescence. Curieusement, la protéine ASB2, très similaire à ASB14 en termes d'organisation des domaines protéiques, peut également cibler des

protéines du cytosquelette (filamines A et B)^{409, 410}. De plus, ASB2 est un des seuls membres de la famille ASB impliqué dans la suppression tumorale. Une autre possibilité intéressante est qu'ASB14 pourrait être « séquestrée » dans les filaments du cytosquelette en conditions physiologiques et que lors de la mise en place de la sénescence elle soit libérée afin d'effectuer ses fonctions suppressives

Les protéines ribosomiques et les protéines du cytosquelette sont les plus abondantes dans la cellule⁴⁷⁵. Cependant, nous pensons que les interactions détectées sont spécifiques puisque nous avons effectué l'expérience de spectrométrie de masses sur la même quantité de protéines par condition. Puis, nous avons normalisé les spectres détectés pour chaque protéine sur le total de spectres détectés. Ensuite, nous avons enlevé de l'analyse les protéines détectés dans les conditions contrôle (*Vector* ; exprimant uniquement l'étiquette 3XFLAG). Nous avons également filtré nos données avec la base de données CRAPome⁴⁷⁶, qui regroupe des données des contrôles négatifs provenant d'autres expériences d'IP-MS. Enfin, beaucoup de protéines du cytosquelette ont uniquement été détectées dans la condition HA-ER (cellules proliférantes) et pas dans les cellules sénescents. D'un autre côté, les protéines ribosomiques ont majoritairement été détectées dans les cellules sénescents (ER-RAS), ce qui suggère une certaine spécificité des interactions obtenues.

L'analyse des partenaires d'interaction d'ASB14 pourrait nous donner quelques indices sur son mécanisme d'action. Par exemple, nous avons observé qu'ASB14 pourrait interagir avec p62, une protéine des autophagosomes qui reconnaît des protéines ubiquitinées afin d'assurer leur dégradation par autophagie. Notamment, p62 peut interagir avec le facteur de transcription GATA4 et réguler sa dégradation par autophagie¹⁵⁰. De plus, dans la section précédente, nous avons présenté des données suggérant que GATA4 est un puissant inducteur de l'expression d'ASB14. Nous pensons que p62 pourrait être une cible de dégradation d'ASB14. Dans ce cas, nous pourrions imaginer un modèle de rétrocontrôle positif dans lequel GATA4 induit ASB14 lors de la sénescence, puis ASB14 contribue au maintien de l'expression de GATA4 en dégradant p62. Nous pensons étudier plus en détail ce partenaire d'interaction d'ASB14 dans nos travaux futurs.

Nous avons observé que les partenaires d'interaction trouvés dans l'interactome d'ASB14 ne correspondent pas exactement aux cibles du modèle original du SAPD^{209, 210}. Il faut tenir compte que les conditions dans lesquelles nous avons analysé l'interactome d'ASB14 ne sont pas exactement les mêmes que celles dans lesquelles le SAPD a été identifié. Nous pensons que le

SAPD est un processus dynamique, qui pourrait cibler des protéines différentes selon le type de stimulus responsable de la mise en place de la sénescence et du type cellulaire. De plus, étant donné la quantité d'E3 ubiquitine ligases dans le protéome humain, il est très probable que le SAPD implique plusieurs de ces enzymes. Nous ne connaissons pas non plus le mécanisme qui permet de sélectionner spécifiquement les protéines à dégrader lors du SAPD. Puisque le SAPD est dépendant de l'activité des kinases ERK1/2, nous pensons que la phosphorylation serait un signal important afin de promouvoir la dégradation de ses cibles. Pour valider cette hypothèse, nous pourrions effectuer une analyse du phospho-protéome dans les cellules sénescents exprimant ASB14 afin d'observer s'il y a une stabilisation de certaines protéines phosphorylées à la suite d'un traitement avec du MG132. En définitive, nous devons plus étudier l'interaction entre les domaines de répétitions ankyrine d'ASB14 et les partenaires d'interaction identifiés afin de mieux comprendre comment la reconnaissance des substrats pourrait s'effectuer.

4.2.4. ASB14 et son rôle dans le pancréas

L'analyse des niveaux d'ASB14 par immunohistochimie dans différents tissus humains normaux a montré une forte accumulation cytoplasmique d'ASB14 dans le pancréas. Plus précisément, le signal ASB14 est localisé dans le cytoplasme des cellules acinaires, alors qu'il est indétectable dans les îlots de Langerhans. Ces résultats ont été validés par deux pathologistes, qui ont confirmé la présence d'un signal spécifique du marquage ASB14 dans le pancréas ainsi que certaines cellules du stroma d'autres tissus, tandis que le signal est indétectable ou peu spécifique dans le reste des tissus analysés. Curieusement, plusieurs bases de données (Human Protein Atlas, PubMed) ont reporté des niveaux élevés de l'ARNm d'ASB14 quasi-exclusivement dans la langue ainsi que dans les muscles squelettique et cardiaque, ce qui ne correspond pas à notre analyse au niveau protéique. Nous pensons que ASB14 pourrait être alors régulée au niveau post-transcriptionnel. Nous avons analysé la région 5'UTR (*5' Untranslated Region*) de l'ARNm d'ASB14 avec le logiciel Mfold⁴⁷⁷, qui a prédit la formation de plusieurs structures secondaires. La formation de ces structures dans certaines conditions pourrait favoriser ou empêcher la traduction de l'ARNm d'ASB14, ce qui pourrait expliquer les différences entre les niveaux d'ARNm et protéiques. Ceci ajoute un niveau de complexité à la régulation d'ASB14.

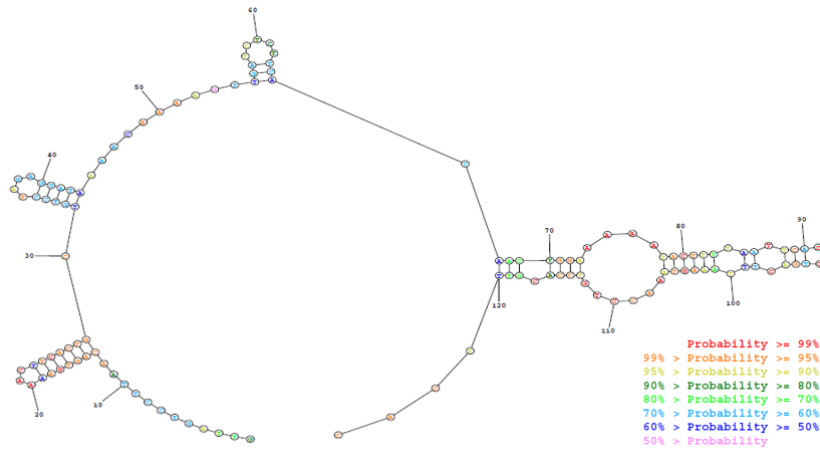


Figure 4.5 : Prédiction de la structure du 5'UTR de l'ARNm d'ASB14

Structure prédite par le logiciel Mfold⁴⁷⁷. La séquence analysée correspond aux nucléotides 1-124 de l'ARNm de l'isoforme 1 d'ASB14.

Bien que la plupart de protéines ASB semble avoir des rôles pro-oncogéniques, nos données suggèrent qu'ASB14 pourrait être important pour la suppression tumorale dans le pancréas. En effet, les niveaux d'ARNm d'ASB14 ainsi que le nombre de copies du gène *ASB14* sont diminués dans des échantillons de cancer de pancréas analysés par les logiciels StarBase et Oncomine. Puis, la perte d'expression d'ASB14 produit un contournement de la sénescence induite par KRAS^{V12} chez des cellules pancréatiques humaines. Contrairement aux fibroblastes, ce contournement ne dépend pas de la perte de fonction de la voie de p16^{INK4a}-RB, ce qui suggère que la valeur suppressive d'ASB14 est particulièrement importante dans ce type de cellules. Ceci est intéressant puisque la plupart des cancers se développent à partir de cellules épithéliales et ce modèle d'étude serait plus représentatif³. De plus, notre analyse par immunohistochimie sur des tissus provenant de patients atteints de PDAC a révélé que l'expression d'ASB14 est généralement diminuée dans les tissus cancéreux. Ceci suggère que la perte d'ASB14 est nécessaire à la progression tumorale dans ce type de cancer. En outre, nous avons observé des niveaux élevés d'ASB14 dans les régions pancréatiques saines adjacentes, ce qui a confirmé les résultats obtenus dans le TMA (*Tissue Microarray*) de tissus normaux. Nous avons également essayé d'analyser l'expression d'ASB14 dans des régions précancéreuses de différents degrés (PanIN). Cependant, la faible quantité de ce type de lésions dans les tissus analysés ne nous a pas permis d'établir de corrélations entre le degré de progression du cancer et le niveau d'expression ou localisation d'ASB14. L'analyse des

niveaux d'ASB14 sur un plus grand nombre d'échantillons nous permettrait de confirmer nos résultats actuels ainsi que de mieux évaluer l'expression d'ASB14 dans des PanIN.

L'expression d'ASB14 semble être exclusivement cytoplasmique dans les régions saines du pancréas, tandis qu'elle est plutôt nucléaire dans les régions cancéreuses. De plus, lors de l'analyse de l'interactome d'ASB14 dans la sénescence induite par RAS nous avons détecté majoritairement des protéines cytoplasmiques. Ceci suggère qu'une expression cytoplasmique d'ASB14 pourrait être associée à la suppression tumorale, tandis qu'une expression nucléaire pourrait être plus associée à la progression tumorale. Cependant, nous avons observé que lors de la sénescence induite par GATA4, ASB14 s'accumule principalement dans le noyau. Nous devons effectuer plus d'analyses afin d'élucider quel est le rôle d'ASB14 dans le noyau. Notamment, l'étude de l'interactome d'ASB14 nucléaire pourrait nous donner des indices afin de répondre à cette question. Puis, il serait également intéressant d'évaluer si la présence d'ASB14 dans le noyau serait due à la modification ou à la translocation d'une isoforme spécifique ou bien à l'induction d'une isoforme nucléaire. Puisqu'il ne semble pas avoir une séquence de localisation nucléaire (NLS) sur aucune des isoformes d'ASB14, nous pourrions évaluer si l'ajout d'un NLS sur la séquence des isoformes d'ASB14 promouvrait la sénescence ou la transformation.

Dans l'analyse des partenaires d'interaction d'ASB14, nous avons détecté la protéine MYCBP (*MYC Binding Protein*), un proto-oncogène qui joue un rôle dans l'activation transcriptionnelle de MYC⁴⁷⁸. Cette dernière est l'une des cibles du SAPD et son expression est essentielle pour la progression du PDAC^{210, 479}. Dans notre modèle d'étude, nous n'avons pas observé une stabilisation des niveaux de MYCBP dans les cellules exprimant des shRNA contre ASB14, ce qui suggère que MYCBP n'est pas une cible de dégradation d'ASB14. Nous avons lancé l'hypothèse qu'ASB14 pourrait donc affecter la fonction ou la localisation de MYCBP afin de l'inhiber et ainsi réduire indirectement les niveaux de MYC. Une autre possibilité est qu'ASB14 cible une version modifiée de MYCBP. Nous devons effectuer plus d'analyses afin de déterminer précisément le lien entre MYCBP et ASB14 et ses conséquences fonctionnelles.

Dans l'interactome d'ASB14, nous avons également détecté la protéine du cytosquelette POTE (*POTE -Prostate, Ovary, Testes and Embryo- ankyrin domain family member E*). Celle-ci promeut la progression tumorale via l'activation de NF- κ B⁴⁸⁰. L'expression de POTE est faible dans des cellules normales et très élevée dans plusieurs types de cancers, notamment le cancer

colorectal, de pancréas, d'ovaire et de prostate⁴⁸⁰⁻⁴⁸². Dans l'analyse des partenaires d'interaction d'ASB14, POTEE a uniquement été détecté dans les cellules proliférantes. Nous pensons que POTEE pourrait être un inhibiteur de la fonction d'ASB14. En effet, la diminution des niveaux de POTEE lors de la sénescence pourrait promouvoir une fonction suppressive d'ASB14. Cette hypothèse pourrait être validée à court terme en analysant si la perte de fonction de POTEE favorise l'effet de la surexpression d'ASB14. Un autre partenaire d'interaction pro-oncogénique identifié dans l'interactome est la thioredoxine, un proto-oncogène dont l'expression est augmentée dans plusieurs types de cancers et qui a été relié à la résistance aux chimiothérapies⁴⁸³. En effet, les niveaux élevés de thioredoxine sont associés à des temps de survie plus courts chez les patients atteints⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁷, notamment d'un adénocarcinome canalaire pancréatique^{483, 487, 488}. Nous pensons que la perte d'ASB14 dans ce type de cancer serait une manière de maintenir l'expression de la thioredoxine dans des niveaux élevés et ainsi d'assurer la croissance tumorale.

4.2.5. ASB14 et la suppression tumorale

Les mécanismes d'action ainsi que la régulation d'ASB14 restent encore à élucider de manière précise. Pendant ce doctorat, nous avons obtenu des résultats suggérant qu'ASB14 est un suppresseur de tumeur dans l'adénocarcinome canalaire du pancréas. Ceci est intéressant puisque ce type de cancer est très agressif et les traitements conventionnels (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie) ne permettent pas de stabiliser la maladie sur le long terme⁴⁸⁹. En conséquence, la survie à cinq ans pour les patients atteints demeure très faible³ (au Canada, la survie nette après cinq ans est de 8%). Dès lors, l'analyse du niveau d'expression d'ASB14 pourrait à l'avenir constituer un outil diagnostique et permettre d'adapter le traitement en fonction du patient.

La découverte d'une nouvelle E3 ligase en tant que suppresseur de tumeur est pertinente du point de vue clinique puisqu'il y a un fort intérêt pour le développement de thérapies basées sur ce type d'enzymes, spécialement les ligases de type CRL, responsables de la dégradation de 20% des protéines d'une cellule³⁵². L'identification de molécules qui reconstituent l'activité d'ASB14 dans le contexte du cancer pancréatique pourrait constituer une nouvelle stratégie antitumorale. De plus, le ciblage des cibles pro-oncogéniques d'ASB14 pourrait également contribuer à la suppression tumorale. Pour ceci, une stratégie pourrait consister à développer des PROTACs (*Proteolysis Targeting Chimera*), des molécules qui peuvent lier le substrat à dégrader et forcer son interaction avec une E3 ligase au choix afin de promouvoir sa dégradation protéasomale⁴⁹⁰. Le PROTAC

pourrait être conçu afin de lier une E3 ubiquitine ligase surexprimée dans le PDAC, comme RNF13⁴⁹¹ (*RING Finger protein 13*) ou NEDD4⁴⁹². Ceci permettrait de reproduire l'effet d'ASB14 dans les cellules cancéreuses, même s'il n'est pas exprimé. L'utilisation de PROTACs a plusieurs avantages par rapport à l'inhibition pharmacologique :

1. L'inhibition pharmacologique affecte uniquement l'activité enzymatique de la cible, tandis que les PROTACs produisent son élimination, ce qui empêcherait également les rôles non-enzymatiques de celle-ci (par exemple, des fonctions structurales).
2. Puisque les PROTACs promeuvent l'élimination de leurs cibles, ceci permet leur dissociation et leur réassociation à une autre molécule substrat, ce qui permet d'effectuer des traitements à des doses plus faibles.

La stratégie de la « létalité synthétique » (*Synthetic lethality*) pourrait également être intéressante pour le développement de thérapies basées sur ASB14. Deux gènes sont synthétiquement létaux quand les altérations sur l'un d'eux permettent la viabilité cellulaire tandis que les perturbations sur les deux promeuvent la mort cellulaire. Puisque nous pensons que les cellules cancéreuses subissent des altérations dans le gène ASB14, l'identification des gènes synthétiquement létaux avec ASB14 pourrait nous permettre de cibler spécifiquement ces cellules sans nuire aux cellules saines. Pour ce faire, nous pourrions effectuer un criblage en utilisant une librairie de shARN dans des cellules cancéreuses dépourvues d'ASB14, afin d'identifier des gènes dont la perte de fonction induit la mort cellulaire dans ce contexte. Cette approche a déjà été utilisée avec succès pour l'identification des gènes ou des composés synthétiquement létaux dans des cellules possédant des mutations inactivatrices du gène *VHL*, qui code pour une E3 ubiquitine ligase suppressive⁴⁹³⁻⁴⁹⁵.

5. Conclusions

Durant cette thèse, nous nous sommes centrés sur deux processus de régulation post-traductionnelle associés à la sénescence : les défauts dans la voie de la biogenèse des ribosomes (SARD) ainsi que la dégradation sélective de protéines (SAPD). L'étude de ces mécanismes nous a permis d'identifier respectivement les protéines RPL22 et ASB14 comme étant importantes pour la sénescence et la suppression tumorale.

Premièrement, cette thèse a permis de mieux comprendre le rôle de la protéine ribosomique RPL22 dans le cycle cellulaire. RPL22 est l'une des protéines ribosomiques identifiées en tant que partenaire d'interaction de CDK4 dans le contexte de la sénescence induite par la perte du facteur de la ribogenèse RSL1D1. Nos résultats montrent que l'expression de RPL22 promeut un arrêt du cycle cellulaire. Nous avons également découvert que RPL22 peut s'accumuler dans le noyau et interagir avec CDK4. Enfin, nous avons montré que l'action de RPL22 sur CDK4 résulte en une activation de la voie de RB, ce qui confirme le rôle de RPL22 dans l'inhibition de CDK4. Nos résultats suggèrent que, tout comme RPS14, RPL22 pourrait également agir comme une protéine ribosomique inhibitrice de CDK (RPIC). La découverte d'un nouveau RPIC pourrait avoir des implications thérapeutiques importantes, notamment dans le développement des molécules reproduisant l'effet inhibiteur sur CDK4 ou bien promouvant l'accumulation extra-ribosomique de certaines protéines ribosomiques.

En second lieu, cette thèse nous a permis de découvrir des gènes d'E3 ubiquitine ligases importants pour la sénescence. En effet, nous avons découvert que l'E3 ubiquitine ligase ASB14 est impliquée dans la sénescence et la suppression tumorale. Les résultats présentés dans cette thèse montrent que la perte d'ASB14 produit un contournement de la sénescence induite par l'oncogène RAS chez des modèles murins et humains. Puis, le développement d'un anticorps contre ASB14 nous a permis d'effectuer des analyses par immunohistochimie de cette E3 ubiquitine ligase sur des tissus humains. Nos résultats montrent une forte expression d'ASB14 dans le pancréas sain, tandis que ses niveaux diminuent dans les tumeurs pancréatiques. Nous avons également identifié l'interactome d'ASB14 dans le contexte de la sénescence induite par RAS. Ensemble, nos données suggèrent qu'ASB14 pourrait être un suppresseur de tumeur dans le pancréas. L'étude de cette protéine ouvre la porte à bien des découvertes qui pourraient être pertinentes du point de vue clinique. Par exemple, nos données suggèrent que l'analyse des niveaux d'ASB14 pourrait contribuer au diagnostic de l'adénocarcinome canalaire pancréatique.

L'établissement de la sénescence implique une réorganisation du protéome ainsi que l'activation des mécanismes traductionnels et post-traductionnels spécifiques aux cellules sénescents. Nous pensons que le SAPD fait partie des mécanismes engagés afin de favoriser les changements vers un protéome pro-sénescents. Par exemple, le SAPD cible certaines protéines impliquées dans la ribogenèse, ce qui promeut l'établissement des SARD. Ces derniers ont un impact direct sur la composition des ribosomes et sur la relocalisation de certaines protéines ribosomiques en réponse au stress nucléolaire, comme RPS14 et RPL22. De plus, les changements au niveau des ribosomes pourraient directement affecter le processus de traduction. D'un autre côté, le SAPD est mis en place par des E3 ubiquitine ligase spécifiques, qui auraient un rôle crucial dans l'établissement d'un protéome pro-sénescents. Notamment, ASB14 ferait partie de celles-ci. Cependant, il est peu probable qu'ASB14 soit l'unique E3 ubiquitine ligase impliquée dans ce mécanisme. Étant donné le nombre des gènes codant pour des E3 ubiquitine ligases dans le génome humain, nous pouvons penser que le SAPD implique plusieurs E3 ubiquitine ligases. Ces dernières pourraient être induites à différentes étapes du phénotype afin de favoriser la dégradation d'un ensemble spécifique de protéines à un instant donné.

Enfin, les travaux présentés dans cette thèse nous ont permis d'identifier des fonctions pro-sénescents et antiprolifératives pour les protéines RPL22 et ASB14. Bien que la sénescence soit un processus avec des implications pro- et antitumorales, l'étude des mécanismes de régulation protéique qui sont associés à ce phénomène nous a permis d'identifier des nouveaux suppresseurs de tumeur qui pourraient éventuellement être utilisés pour le développement de thérapies anticancéreuses.

6. Références bibliographiques

1. Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell*. (W.W. Norton, 2017).
2. Hahn, W.C. & Weinberg, R.A. Rules for Making Human Tumor Cells. **347**, 1593-1603 (2002).
3. Statistiques canadiennes sur le cancer. *Société canadienne du cancer* (2020).
4. Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology* **15**, 122 (2014).
5. Connell-Crowley, L., Harper, J.W. & Goodrich, D.W. Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol Biol Cell* **8**, 287-301 (1997).
6. Weintraub, S.J. *et al.* Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* **375**, 812-815 (1995).
7. Hwang, H.C. & Clurman, B.E. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* **24**, 2776-2786 (2005).
8. Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. & Draetta, G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo j* **11**, 961-971 (1992).
9. Yam, C.H., Fung, T.K. & Poon, R.Y. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1317-1326 (2002).
10. Gavet, O. & Pines, J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell* **18**, 533-543 (2010).
11. Abbas, T. & Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer* **9**, 400-414 (2009).
12. Sherr, C.J. & Roberts, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-1512 (1999).
13. Zhao, R., Choi, B.Y., Lee, M.-H., Bode, A.M. & Dong, Z. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16INK4a) in Cancer. *EBioMedicine* **8**, 30-39 (2016).
14. Bury, M., Le Calvé, B., Ferbeyre, G., Blank, V. & Lessard, F. New Insights into CDK Regulators: Novel Opportunities for Cancer Therapy. *Trends Cell Biol* (2021).
15. Del Toro, N. *et al.* Ribosomal protein RPL22/eL22 regulates the cell cycle by acting as an inhibitor of the CDK4-cyclin D complex. *Cell Cycle* **18**, 759-770 (2019).
16. Lessard, F. *et al.* Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway. *Nat Cell Biol* **20**, 789-799 (2018).

17. Hanahan, D. & Weinberg, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
18. Alexandrov, L.B. & Stratton, M.R. Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev* **24**, 52-60 (2014).
19. Croce, C.M. Oncogenes and Cancer. **358**, 502-511 (2008).
20. Chow, A.Y. Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nature Education* **3**, 7 (2010).
21. Schubert, S., Shannon, K. & Bollag, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews Cancer* **7**, 295-308 (2007).
22. Leicht, D.T. *et al.* Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1773**, 1196-1212 (2007).
23. Sen, B. & Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. *Journal of Signal Transduction* **2011**, 865819 (2011).
24. Campbell, K.J. & Tait, S.W.G. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol* **8**, 180002 (2018).
25. Quintás-Cardama, A. & Cortes, J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* **113**, 1619-1630 (2009).
26. Gabay, M., Li, Y. & Felsher, D.W. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**, a014241 (2014).
27. Yarden, Y. & Pines, G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature Reviews Cancer* **12**, 553-563 (2012).
28. Parish, A. *et al.* Fibroblast growth factor family aberrations in cancers: clinical and molecular characteristics. *Cell Cycle* **14**, 2121-2128 (2015).
29. Biegging, K.T., Mello, S.S. & Attardi, L.D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **14**, 359-370 (2014).
30. Lowe, S.W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307-315 (2004).
31. Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M. & Rotter, V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer* **2**, 466-474 (2011).

32. Petitjean, A. *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* **28**, 622-629 (2007).
33. Giacinti, C. & Giordano, A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25**, 5220-5227 (2006).
34. Kamb, A. *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* **264**, 436-440 (1994).
35. Nobori, T. *et al.* Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* **368**, 753-756 (1994).
36. Bignell, G.R. *et al.* Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature* **463**, 893-898 (2010).
37. Dyson, N.J. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev* **30**, 1492-1502 (2016).
38. Chalhoub, N. & Baker, S.J. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual review of pathology* **4**, 127-150 (2009).
39. Kim, W.Y. & Kaelin, W.G. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* **22**, 4991-5004 (2004).
40. Semmler, L., Reiter-Brennan, C. & Klein, A. BRCA1 and Breast Cancer: a Review of the Underlying Mechanisms Resulting in the Tissue-Specific Tumorigenesis in Mutation Carriers. *J Breast Cancer* **22**, 1-14 (2019).
41. Acosta, J.C. & Gil, J. Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends in Cell Biology* **22**, 211-219 (2012).
42. Greaves, M. & Maley, C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306-313 (2012).
43. Visvader, J.E. Cells of origin in cancer. *Nature* **469**, 314-322 (2011).
44. Michor, F., Iwasa, Y. & Nowak, M.A. Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer* **4**, 197-205 (2004).
45. Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J. & Kern, S.E. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **6**, 2969-2972 (2000).
46. Orth, M. *et al.* Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiat Oncol* **14**, 141-141 (2019).

47. Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N. & DePinho, R.A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *20*, 1218-1249 (2006).
48. Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**, 513-522 (2005).
49. Campisi, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. **75**, 685-705 (2013).
50. He, S. & Sharpless, N.E. Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000-1011 (2017).
51. Hayflick, L. The Limited In Vitro Lifetime Of Human Diploid Cell Strains *Exp Cell Res* **37**, 614-636 (1965).
52. Hayflick, L. & Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621 (1961).
53. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J. & Peeper, D.S. The essence of senescence. *Genes Dev* **24**, 2463-2479 (2010).
54. Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460 (1990).
55. Collado, M. & Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer* **10**, 51-57 (2010).
56. Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J. & Sedivy, J.M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* **14**, 501-513 (2004).
57. Fumagalli, M. *et al.* Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol* **14**, 355-365 (2012).
58. Parrinello, S. *et al.* Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* **5**, 741-747 (2003).
59. Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A. & D'Arca, D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, 3565127 (2016).
60. Chang, B.D. *et al.* Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 389-394 (2002).
61. Schmitt, C.A. *et al.* A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell* **109**, 335-346 (2002).

62. Saleh, T. *et al.* Therapy-Induced Senescence: An "Old" Friend Becomes the Enemy. *Cancers (Basel)* **12** (2020).
63. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. & Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593-602 (1997).
64. Alimonti, A. *et al.* A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest* **120**, 681-693 (2010).
65. Moiseeva, O., Mallette, F.A., Mukhopadhyay, U.K., Moores, A. & Ferbeyre, G. DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Mol Biol Cell* **17**, 1583-1592 (2006).
66. Trost, T.M. *et al.* Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells. *Cancer Res* **65**, 840-849 (2005).
67. Wiley, Christopher D. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism* **23**, 303-314 (2016).
68. Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschênes-Simard, X. & Ferbeyre, G. Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol* **29**, 4495-4507 (2009).
69. Drygin, D. *et al.* Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res* **71**, 1418-1430 (2011).
70. Nishimura, K. *et al.* Perturbation of ribosome biogenesis drives cells into senescence through 5S RNP-mediated p53 activation. *Cell Rep* **10**, 1310-1323 (2015).
71. Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **22**, 75-95 (2021).
72. Lopes-Paciencia, S. *et al.* The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine* **117**, 15-22 (2019).
73. Coppé, J.P., Desprez, P.Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* **5**, 99-118 (2010).

74. Coppé, J.-P. *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLOS Biology* **6**, e301 (2008).
75. Braig, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660-665 (2005).
76. Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725-730 (2005).
77. Bennecke, M. *et al.* Ink4a/Arf and oncogene-induced senescence prevent tumor progression during alternative colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* **18**, 135-146 (2010).
78. Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720-724 (2005).
79. Collado, M. *et al.* Senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**, 642-642 (2005).
80. Kohsaka, S. *et al.* A population of BJ fibroblasts escaped from Ras-induced senescence susceptible to transformation. *Biochem Biophys Res Commun* **410**, 878-884 (2011).
81. Patel, P.L., Suram, A., Mirani, N., Bischof, O. & Herbig, U. Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence. 201602379 (2016).
82. Saleh, T., Tyutyunyk-Massey, L. & Gewirtz, D.A. Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy. **79**, 1044-1046 (2019).
83. Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657-667 (2008).
84. Sagiv, A. & Krizhanovsky, V. Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology* **14**, 617-628 (2013).
85. Xue, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656-660 (2007).
86. Kang, T.W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547-551 (2011).
87. Ruscetti, M. *et al.* NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tumor control by a cytostatic drug combination. *Science* **362**, 1416-1422 (2018).

88. Fleury, H. *et al.* Exploiting interconnected synthetic lethal interactions between PARP inhibition and cancer cell reversible senescence. *Nature Communications* **10**, 2556 (2019).
89. Wang, C. *et al.* Inducing and exploiting vulnerabilities for the treatment of liver cancer. *Nature* **574**, 268-272 (2019).
90. Sieben, C.J., Sturmlechner, I., van de Sluis, B. & van Deursen, J.M. Two-Step Senescence-Focused Cancer Therapies. *Trends Cell Biol* **28**, 723-737 (2018).
91. Muñoz-Espín, D. *et al.* Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**, 1104-1118 (2013).
92. Storer, M. *et al.* Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**, 1119-1130 (2013).
93. Villiard, É. *et al.* Senescence gives insights into the morphogenetic evolution of anamniotes. *Biol Open* **6**, 891-896 (2017).
94. Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* **31**, 722-733 (2014).
95. Canino, C. *et al.* SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. *Oncogene* **31**, 3148-3163 (2012).
96. Ancrile, B., Lim, K.H. & Counter, C.M. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev* **21**, 1714-1719 (2007).
97. Wang, T. *et al.* Senescent Carcinoma-Associated Fibroblasts Upregulate IL8 to Enhance Prometastatic Phenotypes. *Mol Cancer Res* **15**, 3-14 (2017).
98. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. **98**, 12072-12077 (2001).
99. Tato-Costa, J. *et al.* Therapy-Induced Cellular Senescence Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Increases Invasiveness in Rectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* **15**, 170-178.e173 (2016).
100. Mosteiro, L. *et al.* Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* **354** (2016).
101. Mosteiro, L., Pantoja, C., de Martino, A. & Serrano, M. Senescence promotes in vivo reprogramming through p16(INK)(4a) and IL-6. *Aging Cell* **17** (2018).

102. Milanovic, M. *et al.* Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* **553**, 96-100 (2018).
103. Prieto-Vila, M., Takahashi, R.U., Usuba, W., Kohama, I. & Ochiya, T. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int J Mol Sci* **18** (2017).
104. Deschênes-Simard, X. *et al.* Circumventing senescence is associated with stem cell properties and metformin sensitivity. *Aging Cell* **18**, e12889 (2019).
105. Baker, D.J. *et al.* Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184-189 (2016).
106. Dimri, G.P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **92**, 9363-9367 (1995).
107. Fulop, T. *et al.* Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Frontiers in Immunology* **8**, 1960 (2018).
108. Ferrucci, L. & Fabbri, E. Inflammaging: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol* **15**, 505-522 (2018).
109. Childs, B.G. *et al.* Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* **354**, 472-477 (2016).
110. Cho, J.H. *et al.* CD9 induces cellular senescence and aggravates atherosclerotic plaque formation. *Cell Death & Differentiation* **27**, 2681-2696 (2020).
111. Palmer, A.K. *et al.* Cellular Senescence in Type 2 Diabetes: A Therapeutic Opportunity. *Diabetes* **64**, 2289-2298 (2015).
112. Aguayo-Mazzucato, C. & Midha, A. Beta-cell senescence in type 2 diabetes. *Aging* **11**, 9967-9968 (2019).
113. Baker, D.J. & Petersen, R.C. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *The Journal of Clinical Investigation* **128**, 1208-1216 (2018).
114. Bussian, T.J. *et al.* Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* **562**, 578-582 (2018).
115. Bhat, R. *et al.* Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease. *PLOS ONE* **7**, e45069 (2012).
116. Ogrodnik, M. *et al.* Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis. *Cell Metab* **29**, 1061-1077.e1068 (2019).

117. Merkt, W., Bueno, M., Mora, A.L. & Lagares, D. Senotherapeutics: Targeting senescence in idiopathic pulmonary fibrosis. *Semin Cell Dev Biol* **101**, 104-110 (2020).
118. Hohmann, M.S., Habiels, D.M., Coelho, A.L., Verri, W.A., Jr. & Hogaboam, C.M. Quercetin Enhances Ligand-induced Apoptosis in Senescent Idiopathic Pulmonary Fibrosis Fibroblasts and Reduces Lung Fibrosis In Vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* **60**, 28-40 (2019).
119. Farr, J.N. *et al.* Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nature Medicine* **23**, 1072-1079 (2017).
120. Xu, M. *et al.* Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* **24**, 1246-1256 (2018).
121. Crespo-Garcia, S. *et al.* Pathological angiogenesis in retinopathy engages cellular senescence and is amenable to therapeutic elimination via BCL-xL inhibition. *Cell Metab* **33**, 818-832.e817 (2021).
122. Lee, S. *et al.* Virus-induced senescence is driver and therapeutic target in COVID-19. *Nature* (2021).
123. Itahana, K., Dimri, G. & Campisi, J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* **268**, 2784-2791 (2001).
124. Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A. & Hara, E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest* **51**, 146-153 (2004).
125. Vernier, M. *et al.* Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev* **25**, 41-50 (2011).
126. Ezhevsky, S.A. *et al.* Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10699-10704 (1997).
127. de Stanchina, E. *et al.* PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* **13**, 523-535 (2004).
128. Chicas, A. *et al.* Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell* **17**, 376-387 (2010).
129. Vernier, M. & Ferbeyre, G. Complete senescence: RB and PML share the task. *Cell Cycle* **13**, 696 (2014).

130. Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506 (2003).
131. Jackson, S.P. The DNA-damage response: new molecular insights and new approaches to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* **37**, 483-494 (2009).
132. Takeuchi, S. *et al.* Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res* **70**, 9381-9390 (2010).
133. Collins, C.J. & Sedivy, J.M. Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. *Aging Cell* **2**, 145-150 (2003).
134. Bracken, A.P. *et al.* The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev* **21**, 525-530 (2007).
135. Jacobs, J.J. *et al.* Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* **13**, 2678-2690 (1999).
136. Agger, K. *et al.* The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev* **23**, 1171-1176 (2009).
137. Barradas, M. *et al.* Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes Dev* **23**, 1177-1182 (2009).
138. Pomerantz, J. *et al.* The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-723 (1998).
139. Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 729-740 (2007).
140. d'Adda di Fagagna, F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-198 (2003).
141. Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633-637 (2006).
142. Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638-642 (2006).
143. Mallette, F.A. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle* **6**, 1831-1836 (2007).
144. Lee, A.C. *et al.* Ras Proteins Induce Senescence by Altering the Intracellular Levels of Reactive Oxygen Species*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 7936-7940 (1999).

145. Ogrunc, M. *et al.* Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. *Cell Death & Differentiation* **21**, 998-1012 (2014).
146. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M. & Lunec, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **17**, 1195-1214 (2003).
147. Chien, Y. *et al.* Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & development* **25**, 2125-2136 (2011).
148. Kuilman, T. *et al.* Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**, 1019-1031 (2008).
149. Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**, 973-979 (2009).
150. Kang, C. *et al.* The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. **349**, aaa5612 (2015).
151. Sharpless, N.E. & Sherr, C.J. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer* **15**, 397-408 (2015).
152. Herranz, N. & Gil, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest* **128**, 1238-1246 (2018).
153. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology* **28**, 436-453 (2018).
154. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M. & Narita, M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev* **28**, 99-114 (2014).
155. Baus, F., Gire, V., Fisher, D., Piette, J. & Dulić, V. Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *Embo j* **22**, 3992-4002 (2003).
156. Gire, V. & Dulic, V. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle* **14**, 297-304 (2015).
157. Bursuker, I., Rhodes, J.M. & Goldman, R. Beta-galactosidase--an indicator of the maturational stage of mouse and human mononuclear phagocytes. *J Cell Physiol* **112**, 385-390 (1982).
158. Kopp, H.G., Hooper, A.T., Shmelkov, S.V. & Rafii, S. Beta-galactosidase staining on bone marrow. The osteoclast pitfall. *Histol Histopathol* **22**, 971-976 (2007).
159. Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* **114**, 1299-1307 (2004).

160. Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J. & Sedivy, J.M. Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21CIP1, but Not p16INK4a. *Molecular Cell* **14**, 501-513 (2004).
161. Beauséjour, C.M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. **22**, 4212-4222 (2003).
162. Rheinwald, J.G. *et al.* A Two-Stage, p16(INK4A)- and p53-Dependent Keratinocyte Senescence Mechanism That Limits Replicative Potential Independent of Telomere Status. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 6930-6930 (2002).
163. Shapiro, G.I. *et al.* Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res* **55**, 505-509 (1995).
164. Zuckerman, V., Wolynec, K., Sionov, R.V., Haupt, S. & Haupt, Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol* **219**, 3-15 (2009).
165. Jin, S. *et al.* The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. *J Biol Chem* **275**, 16602-16608 (2000).
166. Narita, M. *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-716 (2003).
167. Freund, A., Laberge, R.M., Demaria, M. & Campisi, J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* **23**, 2066-2075 (2012).
168. Shimi, T. *et al.* The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev* **25**, 2579-2593 (2011).
169. Shah, P.P. *et al.* Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes Dev* **27**, 1787-1799 (2013).
170. Nielsen, S.J. *et al.* Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**, 561-565 (2001).
171. Rodier, F. *et al.* DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* **124**, 68-81 (2011).
172. Orjalo, A.V., Bhaumik, D., Gengler, B.K., Scott, G.K. & Campisi, J. Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17031-17036 (2009).
173. Coppé, J.P. *et al.* A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* **5**, e9188 (2010).

174. Eren, M. *et al.* PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in Klotho mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 7090-7095 (2014).
175. Lee, H.-C., Yin, P.-H., Chi, C.-W. & Wei, Y.-H. Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *Journal of Biomedical Science* **9**, 517-526 (2002).
176. Passos, J.F. *et al.* Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular systems biology* **6**, 347-347 (2010).
177. Callender, L.A. *et al.* Mitochondrial mass governs the extent of human T cell senescence. *Aging Cell* **19**, e13067 (2020).
178. Chapman, J., Fielder, E. & Passos, J.F. Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Lett* **593**, 1566-1579 (2019).
179. Passos, J.F. *et al.* Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* **5**, e110 (2007).
180. Wiley, C.D. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab* **23**, 303-314 (2016).
181. Mai, S., Klinkenberg, M., Auburger, G., Bereiter-Hahn, J. & Jendrach, M. Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *J Cell Sci* **123**, 917-926 (2010).
182. Dalle Pezze, P. *et al.* Dynamic modelling of pathways to cellular senescence reveals strategies for targeted interventions. *PLoS Comput Biol* **10**, e1003728 (2014).
183. Dikic, I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem* **86**, 193-224 (2017).
184. Labbadia, J. & Morimoto, R.I. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem* **84**, 435-464 (2015).
185. Gonskikh, Y. & Polacek, N. Alterations of the translation apparatus during aging and stress response. *Mechanisms of Ageing and Development* **168**, 30-36 (2017).
186. Hanna, J., Guerra-Moreno, A., Ang, J. & Micoogullari, Y. Protein Degradation and the Pathologic Basis of Disease. *Am J Pathol* **189**, 94-103 (2019).
187. Sabath, N. *et al.* Cellular proteostasis decline in human senescence. **117**, 31902-31913 (2020).

188. Payea, M.J., Anerillas, C., Tharakan, R. & Gorospe, M. Translational Control during Cellular Senescence. **41**, e00512-00520 (2021).
189. Abbadie, C. & Pluquet, O. Unfolded Protein Response (UPR) Controls Major Senescence Hallmarks. *Trends in Biochemical Sciences* **45**, 371-374 (2020).
190. Díaz-Villanueva, J.F., Díaz-Molina, R. & García-González, V. Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *Int J Mol Sci* **16**, 17193-17230 (2015).
191. Baßler, J. & Hurt, E. Eukaryotic Ribosome Assembly. **88**, 281-306 (2019).
192. Lessard, F., Brakier-Gingras, L. & Ferbeyre, G. Ribosomal Proteins Control Tumor Suppressor Pathways in Response to Nucleolar Stress. *Bioessays* **41**, e1800183 (2019).
193. del Toro, N. *et al.* The retinoblastoma tumor suppressor limits ribosomal readthrough during oncogene induced senescence. 788380 (2019).
194. Serrano, M. Dissecting the role of mTOR complexes in cellular senescence. *Cell Cycle* **11**, 2231-2232 (2012).
195. Weichhart, T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology* **64**, 127-134 (2018).
196. Guillon, J., Toutain, B., Boissard, A., Guette, C. & Coqueret, O. tRNA biogenesis and specific Aminoacyl-tRNA Synthetases regulate senescence stability under the control of mTOR. 2020.2004.2030.068114 (2020).
197. Chen, Z.P. & Chen, K.Y. Dramatic attenuation of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A during senescence of IMR-90 human diploid fibroblasts. **170**, 248-254 (1997).
198. Byun, H.-O. *et al.* Cathepsin D and Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 as Promising Markers of Cellular Senescence. **69**, 4638-4647 (2009).
199. Wu, S. *et al.* mTORC1-Rps15 Axis Contributes to the Mechanisms Underlying Global Translation Reduction During Senescence of Mouse Embryonic Fibroblasts. **7** (2019).
200. Young, A.R. *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**, 798-803 (2009).
201. Dörr, J.R. *et al.* Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* **501**, 421-425 (2013).
202. Takauji, Y. *et al.* Restriction of protein synthesis abolishes senescence features at cellular and organismal levels. *Scientific Reports* **6**, 18722 (2016).

203. Matos, L., Gouveia, A.M. & Almeida, H. ER Stress Response in Human Cellular Models of Senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **70**, 924-935 (2015).
204. Druelle, C. *et al.* ATF6 α regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts. *Oncotarget* **7**, 67699-67715 (2016).
205. Kim, H.S. *et al.* The p38-activated ER stress-ATF6 α axis mediates cellular senescence. *Faseb j* **33**, 2422-2434 (2019).
206. Blazanin, N. *et al.* ER stress and distinct outputs of the IRE1 α RNase control proliferation and senescence in response to oncogenic Ras. **114**, 9900-9905 (2017).
207. Denoyelle, C. *et al.* Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* **8**, 1053-1063 (2006).
208. Pluquet, O., Pourtier, A. & Abbadie, C. The unfolded protein response and cellular senescence. A Review in the Theme: Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. **308**, C415-C425 (2015).
209. Deschênes-Simard, X., Lessard, F., Gaumont-Leclerc, M.F., Bardeesy, N. & Ferbeyre, G. Cellular senescence and protein degradation: breaking down cancer. *Cell Cycle* **13**, 1840-1858 (2014).
210. Deschênes-Simard, X. *et al.* Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev* **27**, 900-915 (2013).
211. Stults, D.M., Killen, M.W., Pierce, H.H. & Pierce, A.J. Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. *Genome Res* **18**, 13-18 (2008).
212. Thomson, E., Ferreira-Cerca, S. & Hurt, E. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. **126**, 4815-4821 (2013).
213. Lafontaine, D.L.J. Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nature Structural & Molecular Biology* **22**, 11-19 (2015).
214. Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.-M. & Lamond, A.I. The Nucleolus under Stress. *Molecular Cell* **40**, 216-227 (2010).
215. Shav-Tal, Y. *et al.* Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol Biol Cell* **16**, 2395-2413 (2005).
216. Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., Thiry, M., Sirri, V. & Lafontaine, D.L.J. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. **1**, 415-431 (2010).

217. Montanaro, L., Treré, D. & Derenzini, M. Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am J Pathol* **173**, 301-310 (2008).
218. Bhat, M. *et al.* Targeting the translation machinery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 261-278 (2015).
219. Wild, T. *et al.* A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export. *PLoS biology* **8**, e1000522-e1000522 (2010).
220. Zhou, X., Liao, W.J., Liao, J.M., Liao, P. & Lu, H. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *J Mol Cell Biol* **7**, 92-104 (2015).
221. Kirn-Safran, C.B. *et al.* Global growth deficiencies in mice lacking the ribosomal protein HIP/RPL29. **236**, 447-460 (2007).
222. Volarevic, S. *et al.* Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* **288**, 2045-2047 (2000).
223. Shi, Y. *et al.* Ribosomal proteins S13 and L23 promote multidrug resistance in gastric cancer cells by suppressing drug-induced apoptosis. *Exp Cell Res* **296**, 337-346 (2004).
224. Guo, X. *et al.* Human ribosomal protein S13 promotes gastric cancer growth through down-regulating p27(Kip1). *J Cell Mol Med* **15**, 296-306 (2011).
225. Kondoh, N. *et al.* Enhanced expression of S8, L12, L23a, L27 and L30 ribosomal protein mRNAs in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* **21**, 2429-2433 (2001).
226. Chen, B. *et al.* Downregulation of ribosomal protein S6 inhibits the growth of non-small cell lung cancer by inducing cell cycle arrest, rather than apoptosis. *Cancer Lett* **354**, 378-389 (2014).
227. Amsterdam, A. *et al.* Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biol* **2**, E139 (2004).
228. Wang, Q. *et al.* Cloning and characterization of full-length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpressed in esophageal cancer. *Gene* **263**, 205-209 (2001).
229. Henry, J.L., Coggin, D.L. & King, C.R. High-level expression of the ribosomal protein L19 in human breast tumors that overexpress erbB-2. *Cancer Res* **53**, 1403-1408 (1993).
230. Ajore, R. *et al.* Deletion of ribosomal protein genes is a common vulnerability in human cancer, especially in concert with TP53 mutations. *EMBO Mol Med* **9**, 498-507 (2017).
231. Xiong, X. *et al.* Ribosomal protein S27-like is a physiological regulator of p53 that suppresses genomic instability and tumorigenesis. *Elife* **3**, e02236 (2014).

232. Sun, X.X., DeVine, T., Challagundla, K.B. & Dai, M.S. Interplay between ribosomal protein S27a and MDM2 protein in p53 activation in response to ribosomal stress. *J Biol Chem* **286**, 22730-22741 (2011).
233. Cui, D. *et al.* The ribosomal protein S26 regulates p53 activity in response to DNA damage. *Oncogene* **33**, 2225-2235 (2014).
234. Chen, D. *et al.* Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* **26**, 5029-5037 (2007).
235. Zhang, Y. *et al.* Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic Acids Res* **38**, 6544-6554 (2010).
236. Bai, D., Zhang, J., Xiao, W. & Zheng, X. Regulation of the HDM2-p53 pathway by ribosomal protein L6 in response to ribosomal stress. *Nucleic Acids Res* **42**, 1799-1811 (2014).
237. Zhou, X., Hao, Q., Liao, J., Zhang, Q. & Lu, H. Ribosomal protein S14 unties the MDM2-p53 loop upon ribosomal stress. *Oncogene* **32**, 388-396 (2013).
238. Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M. & Vousden, K.H. Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* **3**, 577-587 (2003).
239. Cao, B. *et al.* Cancer-mutated ribosome protein L22 (RPL22/eL22) suppresses cancer cell survival by blocking p53-MDM2 circuit. *Oncotarget* **8**, 90651-90661 (2017).
240. Marechal, V., Elenbaas, B., Piette, J., Nicolas, J.C. & Levine, A.J. The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol* **14**, 7414-7420 (1994).
241. Liu, Y., Deisenroth, C. & Zhang, Y. RP-MDM2-p53 Pathway: Linking Ribosomal Biogenesis and Tumor Surveillance. *Trends Cancer* **2**, 191-204 (2016).
242. Dai, M.S. *et al.* Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* **24**, 7654-7668 (2004).
243. Dai, M.S. & Lu, H. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* **279**, 44475-44482 (2004).
244. Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G. & Kastan, M.B. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* **123**, 49-63 (2005).

245. Rashkovan, M. *et al.* Miz-1 regulates translation of Trp53 via ribosomal protein L22 in cells undergoing V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E5411-5419 (2014).
246. Pecoraro, A., Carotenuto, P., Russo, G. & Russo, A. Ribosomal protein uL3 targets E2F1 and Cyclin D1 in cancer cell response to nucleolar stress. *Scientific Reports* **9**, 15431 (2019).
247. Pagliara, V. *et al.* 5-FU targets rpL3 to induce mitochondrial apoptosis via cystathionine- β -synthase in colon cancer cells lacking p53. *Oncotarget* **7**, 50333-50348 (2016).
248. Liao, J.M., Zhou, X., Gatignol, A. & Lu, H. Ribosomal proteins L5 and L11 co-operatively inactivate c-Myc via RNA-induced silencing complex. *Oncogene* **33**, 4916-4923 (2014).
249. Han, S.H., Chung, J.H., Kim, J., Kim, K.S. & Han, Y.S. New role of human ribosomal protein S3: Regulation of cell cycle via phosphorylation by cyclin-dependent kinase 2. *Oncol Lett* **13**, 3681-3687 (2017).
250. Lavergne, J.-P., Conquet, F., Reboud, J.-P. & Reboud, A.-M. Role of acidic phosphoproteins in the partial reconstitution of the active 60 S ribosomal subunit. *FEBS Letters* **216**, 83-88 (1987).
251. Toczyski, D.P., Matera, A.G., Ward, D.C. & Steitz, J.A. The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocalizes ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3463-3467 (1994).
252. Shu-Nu, C., Lin, C.-H. & Lin, A. An acidic amino acid cluster regulates the nucleolar localization and ribosome assembly of human ribosomal protein L22. *FEBS Letters* **484**, 22-28 (2000).
253. Dobbelstein, M. & Shenk, T. In vitro selection of RNA ligands for the ribosomal L22 protein associated with Epstein-Barr virus-expressed RNA by using randomized and cDNA-derived RNA libraries. *J Virol* **69**, 8027-8034 (1995).
254. Le, S., Sternglanz, R. & Greider, C.W. Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell* **11**, 999-1010 (2000).
255. Leopardi, R., Ward, P.L., Ogle, W.O. & Roizman, B. Association of herpes simplex virus regulatory protein ICP22 with transcriptional complexes containing EAP, ICP4, RNA polymerase II, and viral DNA requires posttranslational modification by the U(L)13 protein kinase. **71**, 1133-1139 (1997).
256. Wood, J., Frederickson, R.M., Fields, S. & Patel, A.H. Hepatitis C virus 3'X region interacts with human ribosomal proteins. *Journal of virology* **75**, 1348-1358 (2001).

257. Ni, J.Q., Liu, L.P., Hess, D., Rietdorf, J. & Sun, F.L. Drosophila ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. *Genes Dev* **20**, 1959-1973 (2006).
258. Matsson, H. *et al.* Targeted disruption of the ribosomal protein S19 gene is lethal prior to implantation. *Mol Cell Biol* **24**, 4032-4037 (2004).
259. Oliver, E.R., Saunders, T.L., Tarlé, S.A. & Glaser, T. Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development* **131**, 3907-3920 (2004).
260. O'Leary, M.N. *et al.* The ribosomal protein Rpl22 controls ribosome composition by directly repressing expression of its own paralog, Rpl22i1. *PLoS genetics* **9**, e1003708-e1003708 (2013).
261. Anderson, S.J. *et al.* Ablation of Ribosomal Protein L22 Selectively Impairs $\alpha\beta$ T Cell Development by Activation of a p53-Dependent Checkpoint. *Immunity* **26**, 759-772 (2007).
262. Stadanlick, J.E. *et al.* Developmental arrest of T cells in Rpl22-deficient mice is dependent upon multiple p53 effectors. *J Immunol* **187**, 664-675 (2011).
263. Fahl, S.P., Harris, B., Coffey, F. & Wiest, D.L. Rpl22 Loss Impairs the Development of B Lymphocytes by Activating a p53-Dependent Checkpoint. *J Immunol* **194**, 200-209 (2015).
264. Rao, S. *et al.* Inactivation of ribosomal protein L22 promotes transformation by induction of the stemness factor, Lin28B. *Blood* **120**, 3764-3773 (2012).
265. Novetsky, A.P. *et al.* Frequent mutations in the RPL22 gene and its clinical and functional implications. *Gynecol Oncol* **128**, 470-474 (2013).
266. Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333-339 (2013).
267. Ferreira, A.M. *et al.* High frequency of RPL22 mutations in microsatellite-unstable colorectal and endometrial tumors. *Hum Mutat* **35**, 1442-1445 (2014).
268. Finak, G. *et al.* Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* **14**, 518-527 (2008).
269. Kandoth, C. *et al.* Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* **497**, 67-73 (2013).
270. Yang, M. *et al.* Down-regulation of ribosomal protein L22 in non-small cell lung cancer. *Med Oncol* **30**, 646 (2013).

271. Nagarajan, N. *et al.* Whole-genome reconstruction and mutational signatures in gastric cancer. *Genome Biol* **13**, R115 (2012).
272. Schmidt, M. & Finley, D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**, 13-25 (2014).
273. Aneurillas, C., Abdelmohsen, K. & Gorospe, M. Regulation of senescence traits by MAPKs. *Geroscience* **42**, 397-408 (2020).
274. Cargnello, M. & Roux, P.P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**, 50-83 (2011).
275. Braicu, C. *et al.* A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers (Basel)* **11** (2019).
276. Eblen, S.T. Extracellular-Regulated Kinases: Signaling From Ras to ERK Substrates to Control Biological Outcomes. *Adv Cancer Res* **138**, 99-142 (2018).
277. Guo, Y.J. *et al.* ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med* **19**, 1997-2007 (2020).
278. Deschênes-Simard, X., Kottakis, F., Meloche, S. & Ferbeyre, G. ERKs in Cancer: Friends or Foes? **74**, 412-419 (2014).
279. Duhamel, S. *et al.* Sef Downregulation by Ras Causes MEK1/2 to Become Aberrantly Nuclear Localized Leading to Polyploidy and Neoplastic Transformation. *Cancer Research* **72**, 626 (2012).
280. Ferbeyre, G. Aberrant signaling and senescence associated protein degradation. *Exp Gerontol* **107**, 50-54 (2018).
281. Hershko, A., Ciechanover, A. & Rose, I.A. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 3107-3110 (1979).
282. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. & Ohsumi, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* **119**, 301-311 (1992).
283. Wang, D.-w., Peng, Z.-j., Ren, G.-f. & Wang, G.-x. The different roles of selective autophagic protein degradation in mammalian cells. *Oncotarget* **6**, 37098-37116 (2015).
284. Kaur, J. & Debnath, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 461-472 (2015).

285. Goehle, R.W. *et al.* The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J Pharmacol Exp Ther* **343**, 763-778 (2012).
286. Rajendran, P. *et al.* Autophagy and senescence: A new insight in selected human diseases. *J Cell Physiol* **234**, 21485-21492 (2019).
287. Komander, D. & Rape, M. The Ubiquitin Code. *Annual Review of Biochemistry* **81**, 203-229 (2012).
288. Finley, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* **78**, 477-513 (2009).
289. Varshavsky, A. The Ubiquitin System, Autophagy, and Regulated Protein Degradation. *Annual Review of Biochemistry* **86**, 123-128 (2017).
290. Schulman, B.A. & Harper, J.W. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 319-331 (2009).
291. Ye, Y. & Rape, M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 755-764 (2009).
292. Zheng, N. & Shabek, N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Biochemistry* **86**, 129-157 (2017).
293. Koegl, M. *et al.* A Novel Ubiquitination Factor, E4, Is Involved in Multiubiquitin Chain Assembly. *Cell* **96**, 635-644 (1999).
294. Hoppe, T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 183-187 (2005).
295. Komander, D., Clague, M.J. & Urbé, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 550-563 (2009).
296. Rousseau, A. & Bertolotti, A. Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**, 697-712 (2018).
297. Budenholzer, L., Cheng, C.L., Li, Y. & Hochstrasser, M. Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol* **429**, 3500-3524 (2017).
298. Ferrington, D.A. & Gregerson, D.S. Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Prog Mol Biol Transl Sci* **109**, 75-112 (2012).
299. Zheng, Q. *et al.* Dysregulation of Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegenerative Diseases. **8** (2016).

300. Sharma, A. & Trivedi, A.K. Regulation of apoptosis by E3 ubiquitin ligases in ubiquitin proteasome system. *Cell Biol Int* **44**, 721-734 (2020).
301. Zhang, B. *et al.* GIDE is a mitochondrial E3 ubiquitin ligase that induces apoptosis and slows growth. *Cell Res* **18**, 900-910 (2008).
302. Gao, K. *et al.* RNF12 promotes p53-dependent cell growth suppression and apoptosis by targeting MDM2 for destruction. *Cancer Lett* **375**, 133-141 (2016).
303. Zhong, Q., Gao, W., Du, F. & Wang, X. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* **121**, 1085-1095 (2005).
304. Zhu, H. *et al.* SPOP E3 Ubiquitin Ligase Adaptor Promotes Cellular Senescence by Degrading the SENP7 deSUMOylase. *Cell Reports* **13**, 1183-1193 (2015).
305. Ullah, K. *et al.* The E3 ubiquitin ligase STUB1 attenuates cell senescence by promoting the ubiquitination and degradation of the core circadian regulator BMAL1. *J Biol Chem* **295**, 4696-4708 (2020).
306. Teixeira, L.K. & Reed, S.I. Ubiquitin Ligases and Cell Cycle Control. **82**, 387-414 (2013).
307. Welcker, M. & Clurman, B.E. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer* **8**, 83-93 (2008).
308. Peters, J.M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644-656 (2006).
309. Jang, S.-M., Redon, C.E., Thakur, B.L., Bahta, M.K. & Aladjem, M.I. Regulation of cell cycle drivers by Cullin-RING ubiquitin ligases. *Experimental & Molecular Medicine* (2020).
310. Bulatov, E., Valiullina, A., Sayarova, R. & Rizvanov, A. Promising new therapeutic targets for regulation of inflammation and immunity: RING-type E3 ubiquitin ligases. *Immunol Lett* **202**, 44-51 (2018).
311. Pertel, T. *et al.* TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* **472**, 361-365 (2011).
312. Lee, J.H., Elly, C., Park, Y. & Liu, Y.C. E3 Ubiquitin Ligase VHL Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α to Maintain Regulatory T Cell Stability and Suppressive Capacity. *Immunity* **42**, 1062-1074 (2015).

313. Fukunaga, E. *et al.* Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent migration of breast cancer cells. *J Biol Chem* **283**, 35660-35667 (2008).
314. Jin, C. *et al.* Smad ubiquitination regulatory factor 2 promotes metastasis of breast cancer cells by enhancing migration and invasiveness. *Cancer Res* **69**, 735-740 (2009).
315. Tosco, P. *et al.* Correlation between Skp2 expression and nodal metastasis in stage I and II oral squamous cell carcinomas. *Oral Dis* **17**, 102-108 (2011).
316. Wang, D., Ma, L., Wang, B., Liu, J. & Wei, W. E3 ubiquitin ligases in cancer and implications for therapies. *Cancer Metastasis Rev* **36**, 683-702 (2017).
317. Bielskienė, K., Bagdonienė, L., Mozūraitienė, J., Kazbarienė, B. & Janulionis, E. E3 ubiquitin ligases as drug targets and prognostic biomarkers in melanoma. *Medicina* **51**, 1-9 (2015).
318. Uchida, C. & Kitagawa, M. RING-, HECT-, and RBR-type E3 Ubiquitin Ligases: Involvement in Human Cancer. *Curr Cancer Drug Targets* **16**, 157-174 (2016).
319. Ravid, T. & Hochstrasser, M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin–proteasome system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 679-689 (2008).
320. Hao, B., Oehlmann, S., Sowa, M.E., Harper, J.W. & Pavletich, N.P. Structure of a Fbw7-Skp1-cyclin E complex: multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases. *Mol Cell* **26**, 131-143 (2007).
321. Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179-186 (1986).
322. Tasaki, T. & Kwon, Y.T. The mammalian N-end rule pathway: new insights into its components and physiological roles. *Trends Biochem Sci* **32**, 520-528 (2007).
323. Shloush, J. *et al.* Structural and functional comparison of the RING domains of two p53 E3 ligases, Mdm2 and Pirh2. *J Biol Chem* **286**, 4796-4808 (2011).
324. Dominguez, C. *et al.* Structural model of the UbcH5B/CNOT4 complex revealed by combining NMR, mutagenesis, and docking approaches. *Structure* **12**, 633-644 (2004).
325. Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P.D. & Pavletich, N.P. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* **102**, 533-539 (2000).
326. Borden, K.L. *et al.* The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *Embo j* **14**, 1532-1541 (1995).

327. Brzovic, P.S., Rajagopal, P., Hoyt, D.W., King, M.C. & Klevit, R.E. Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat Struct Biol* **8**, 833-837 (2001).
328. Kohroki, J., Nishiyama, T., Nakamura, T. & Masuho, Y. ASB proteins interact with Cullin5 and Rbx2 to form E3 ubiquitin ligase complexes. *FEBS Lett* **579**, 6796-6802 (2005).
329. Petroski, M.D. & Deshaies, R.J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 9-20 (2005).
330. Maspero, E. *et al.* Structure of a ubiquitin-loaded HECT ligase reveals the molecular basis for catalytic priming. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**, 696-701 (2013).
331. Weber, J., Polo, S. & Maspero, E. HECT E3 Ligases: A Tale With Multiple Facets. **10** (2019).
332. Walden, H. & Rittinger, K. RBR ligase-mediated ubiquitin transfer: a tale with many twists and turns. *Nature Structural & Molecular Biology* **25**, 440-445 (2018).
333. Trempe, J.F. *et al.* Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science* **340**, 1451-1455 (2013).
334. Shimura, H. *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* **25**, 302-305 (2000).
335. Deshaies, R.J. & Joazeiro, C.A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**, 399-434 (2009).
336. Metzger, M.B., Pruneda, J.N., Klevit, R.E. & Weissman, A.M. RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 47-60 (2014).
337. Pruneda, J.N. *et al.* Structure of an E3:E2~Ub complex reveals an allosteric mechanism shared among RING/U-box ligases. *Mol Cell* **47**, 933-942 (2012).
338. Plechanovová, A., Jaffray, E.G., Tatham, M.H., Naismith, J.H. & Hay, R.T. Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature* **489**, 115-120 (2012).
339. Zimmerman, E.S., Schulman, B.A. & Zheng, N. Structural assembly of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 714-721 (2010).
340. Yu, X. *et al.* Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**, 1056-1060 (2003).
341. Sweeney, M.A. *et al.* The ubiquitin ligase Cullin-1 associates with chromatin and regulates transcription of specific c-MYC target genes. *Scientific Reports* **10**, 13942 (2020).

342. Jang, S.-M., Redon, C.E. & Aladjem, M.I. Chromatin-Bound Cullin-Ring Ligases: Regulatory Roles in DNA Replication and Potential Targeting for Cancer Therapy. **5** (2018).
343. Jang, S.-M., Redon, C.E., Thakur, B.L., Bahta, M.K. & Aladjem, M.I. Regulation of cell cycle drivers by Cullin-RING ubiquitin ligases. *Experimental & Molecular Medicine* **52**, 1637-1651 (2020).
344. Yan, Y., Zhang, X. & Legerski, R.J. Artemis interacts with the Cul4A-DDB1DDB2 ubiquitin E3 ligase and regulates degradation of the CDK inhibitor p27. *Cell Cycle* **10**, 4098-4109 (2011).
345. Tan, M. *et al.* SAG/RBX2/ROC2 E3 ubiquitin ligase is essential for vascular and neural development by targeting NF1 for degradation. *Dev Cell* **21**, 1062-1076 (2011).
346. Querido, E. *et al.* Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev* **15**, 3104-3117 (2001).
347. Cai, Q.L., Knight, J.S., Verma, S.C., Zald, P. & Robertson, E.S. EC5S ubiquitin complex is recruited by KSHV latent antigen LANA for degradation of the VHL and p53 tumor suppressors. *PLoS Pathog* **2**, e116 (2006).
348. Pugh, C.W. & Ratcliffe, P.J. The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Semin Cancer Biol* **13**, 83-89 (2003).
349. Xie, L. *et al.* Oxygen-regulated beta(2)-adrenergic receptor hydroxylation by EGLN3 and ubiquitylation by pVHL. *Sci Signal* **2**, ra33 (2009).
350. Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W. & Diehl, J.A. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* **24**, 8477-8486 (2004).
351. Hernández-Muñoz, I. *et al.* Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7635-7640 (2005).
352. Zhao, Y. & Sun, Y. Cullin-RING Ligases as attractive anti-cancer targets. *Curr Pharm Des* **19**, 3215-3225 (2013).

353. Willems, A.R., Schwab, M. & Tyers, M. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1695**, 133-170 (2004).
354. Reitsma, J.M. *et al.* Composition and Regulation of the Cellular Repertoire of SCF Ubiquitin Ligases. *Cell* **171**, 1326-1339.e1314 (2017).
355. Cai, W. & Yang, H. The structure and regulation of Cullin 2 based E3 ubiquitin ligases and their biological functions. *Cell Division* **11**, 7 (2016).
356. Pintard, L., Willems, A. & Peter, M. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *Embo j* **23**, 1681-1687 (2004).
357. Lee, J. & Zhou, P. DCAFs, the Missing Link of the CUL4-DDB1 Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell* **26**, 775-780 (2007).
358. Angers, S. *et al.* Molecular architecture and assembly of the DDB1–CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* **443**, 590-593 (2006).
359. Linossi, E.M. & Nicholson, S.E. The SOCS box—Adapting proteins for ubiquitination and proteasomal degradation. **64**, 316-323 (2012).
360. Luo, Y. *et al.* CUL7 E3 Ubiquitin Ligase Mediates the Degradation of Activation-Induced Cytidine Deaminase and Regulates the Ig Class Switch Recombination in B Lymphocytes. **203**, 269-281 (2019).
361. Dias, D.C., Dolios, G., Wang, R. & Pan, Z.-Q. CUL7: A DOC domain-containing cullin selectively binds Skp1·Fbx29 to form an SCF-like complex. **99**, 16601-16606 (2002).
362. Wang, K., Deshaies, R.J. & Liu, X. Assembly and Regulation of CRL Ubiquitin Ligases. *Adv Exp Med Biol* **1217**, 33-46 (2020).
363. Duda, D.M. *et al.* Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell* **134**, 995-1006 (2008).
364. Lyapina, S. *et al.* Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* **292**, 1382-1385 (2001).
365. Zheng, J. *et al.* CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol Cell* **10**, 1519-1526 (2002).
366. Hilton, D.J. *et al.* Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 114-119 (1998).

367. Sedgwick, S.G. & Smerdon, S.J. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 311-316 (1999).
368. Li, J., Mahajan, A. & Tsai, M.-D. Ankyrin Repeat: A Unique Motif Mediating Protein–Protein Interactions. *Biochemistry* **45**, 15168-15178 (2006).
369. Thomas, J.C., Matak-Vinkovic, D., Van Molle, I. & Ciulli, A. Multimeric Complexes among Ankyrin-Repeat and SOCS-box Protein 9 (ASB9), ElonginBC, and Cullin 5: Insights into the Structure and Assembly of ECS-type Cullin-RING E3 Ubiquitin Ligases. *Biochemistry* **52**, 5236-5246 (2013).
370. Muniz, J.R.C. *et al.* Molecular Architecture of the Ankyrin SOCS Box Family of Cul5-Dependent E3 Ubiquitin Ligases. *Journal of Molecular Biology* **425**, 3166-3177 (2013).
371. Mosavi, L.K., Cammett, T.J., Desrosiers, D.C. & Peng, Z.Y. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* **13**, 1435-1448 (2004).
372. Chung, A.S., Guan, Y.J., Yuan, Z.L., Albina, J.E. & Chin, Y.E. Ankyrin repeat and SOCS box 3 (ASB3) mediates ubiquitination and degradation of tumor necrosis factor receptor II. *Mol Cell Biol* **25**, 4716-4726 (2005).
373. Debrincat, M.A. *et al.* Ankyrin repeat and suppressors of cytokine signaling box protein asb-9 targets creatine kinase B for degradation. *J Biol Chem* **282**, 4728-4737 (2007).
374. Andresen, C.A. *et al.* Protein interaction screening for the ankyrin repeats and suppressor of cytokine signaling (SOCS) box (ASB) family identify Asb11 as a novel endoplasmic reticulum resident ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **289**, 2043-2054 (2014).
375. Diks, S.H. *et al.* d-Asb11 is an essential mediator of canonical Delta-Notch signalling. *Nat Cell Biol* **10**, 1190-1198 (2008).
376. Mistry, J. *et al.* Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research* **49**, D412-D419 (2021).
377. Li, J.-Y. *et al.* Ankyrin repeat and SOCS box containing protein 4 (Asb-4) colocalizes with insulin receptor substrate 4 (IRS4) in the hypothalamic neurons and mediates IRS4 degradation. *BMC Neuroscience* **12**, 95 (2011).
378. Nie, L. *et al.* Notch-induced Asb2 expression promotes protein ubiquitination by forming non-canonical E3 ligase complexes. *Cell Res* **21**, 754-769 (2011).
379. Uematsu, K. *et al.* ASB7 regulates spindle dynamics and genome integrity by targeting DDA3 for proteasomal degradation. *J Cell Biol* **215**, 95-106 (2016).

380. Li, J.Y. *et al.* Ankyrin repeat and SOCS box containing protein 4 (Asb-4) colocalizes with insulin receptor substrate 4 (IRS4) in the hypothalamic neurons and mediates IRS4 degradation. *BMC Neurosci* **12**, 95 (2011).
381. Kwon, S. *et al.* ASB9 interacts with ubiquitous mitochondrial creatine kinase and inhibits mitochondrial function. *BMC Biol* **8**, 23 (2010).
382. Guo, Y. *et al.* E3 ubiquitin ligase ASB8 negatively regulates interferon via regulating TBK1/IKKi homeostasis. *Mol Immunol* **121**, 195-203 (2020).
383. Shin, J.H. *et al.* AHR Regulates NK Cell Migration via ASB2-Mediated Ubiquitination of Filamin A. *Front Immunol* **12**, 624284 (2021).
384. Yang, G. *et al.* E3 Ubiquitin Ligase ASB17 Promotes Apoptosis by Ubiquitylating and Degrading BCLW and MCL1. *Biology (Basel)* **10** (2021).
385. Fan, H. *et al.* ASB13 inhibits breast cancer metastasis through promoting SNAI2 degradation and relieving its transcriptional repression of YAP. **34**, 1359-1372 (2020).
386. Anasa, V.V., Ravanan, P. & Talwar, P. Multifaceted roles of ASB proteins and its pathological significance. *Frontiers in Biology* **13**, 376-388 (2018).
387. Kim, K.S., Kim, M.S., Kim, S.K. & Baek, K.H. Murine Asb-17 expression during mouse testis development and spermatogenesis. *Zygote* **12**, 151-156 (2004).
388. Lee, M.R., Kim, S.K., Kim, J.S., Rhim, S.Y. & Kim, K.S. Expression of murine Asb-9 during mouse spermatogenesis. *Mol Cells* **26**, 621-624 (2008).
389. Davey, J.R. *et al.* Integrated expression analysis of muscle hypertrophy identifies Asb2 as a negative regulator of muscle mass. *JCI Insight* **1** (2016).
390. McDanel, T.G., Hannon, K. & Moody, D.E. Ankyrin repeat and SOCS box protein 15 regulates protein synthesis in skeletal muscle. **290**, R1672-R1682 (2006).
391. McDanel, T.G. & Spurlock, D.M. Ankyrin repeat and suppressor of cytokine signaling (SOCS) box-containing protein (ASB) 15 alters differentiation of mouse C2C12 myoblasts and phosphorylation of mitogen-activated protein kinase and Akt. *J Anim Sci* **86**, 2897-2902 (2008).
392. Tee, J.M. & Peppelenbosch, M.P. Anchoring skeletal muscle development and disease: the role of ankyrin repeat domain containing proteins in muscle physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**, 318-330 (2010).

393. Tee, J.M. *et al.* asb11 is a regulator of embryonic and adult regenerative myogenesis. *Stem Cells Dev* **21**, 3091-3103 (2012).
394. Sartori da Silva, M.A. *et al.* Essential role for the d-Asb11 cul5 Box domain for proper notch signaling and neural cell fate decisions in vivo. *PLoS One* **5**, e14023 (2010).
395. Li, R. *et al.* E3 ligase ASB8 promotes porcine reproductive and respiratory syndrome virus proliferation by stabilizing the viral Nsp1 α protein and degrading host IKK β kinase. *Virology* **532**, 55-68 (2019).
396. Du, W.Y. *et al.* The loss-of-function mutations and down-regulated expression of ASB3 gene promote the growth and metastasis of colorectal cancer cells. *Chin J Cancer* **36**, 11 (2017).
397. Tokuoka, M. *et al.* Clinical significance of ASB9 in human colorectal cancer. *Int J Oncol* **37**, 1105-1111 (2010).
398. Lai, K.-C., Chang, K.-W., Liu, C.-J. & Lee, T.-C. Enhanced expression of ASB6 and IFIT2 in oral squamous cell carcinoma. **66**, 215-215 (2006).
399. Au, V. *et al.* Expression of ankyrin repeat and SOCS box containing 4 (ASB4) confers migration and invasion properties of hepatocellular carcinoma cells. *Biosci Trends* **8**, 101-110 (2014).
400. Keller, K.E. & Wirtz, M.K. Working your SOCS off: The role of ASB10 and protein degradation pathways in glaucoma. *Exp Eye Res* **158**, 154-160 (2017).
401. Liu, Y.Z. *et al.* [Exogenous expression of SOCS box-deficient mutant ASB-8 suppresses the growth of lung adenocarcinoma SPC-A1 cells]. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* **35**, 548-553 (2003).
402. Kile, B.T. *et al.* Functional analysis of Asb-1 using genetic modification in mice. *Mol Cell Biol* **21**, 6189-6197 (2001).
403. Hou, P. *et al.* An unconventional role of an ASB family protein in NF- κ B activation and inflammatory response during microbial infection and colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118** (2021).
404. Yang, X.Y. *et al.* Identification of differentially expressed genes in metastatic and non-metastatic nasopharyngeal carcinoma cells by suppression subtractive hybridization. *Cell Oncol* **27**, 215-223 (2005).

405. Wu, W., Nie, L., Zhang, L. & Li, Y. The notch pathway promotes NF- κ B activation through Asb2 in T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Mol Biol Lett* **23**, 37 (2018).
406. Wu, W. & Sun, X.H. A mechanism underlying NOTCH-induced and ubiquitin-mediated JAK3 degradation. *J Biol Chem* **286**, 41153-41162 (2011).
407. Lamsoul, I. *et al.* ASB2 α regulates migration of immature dendritic cells. *Blood* **122**, 533-541 (2013).
408. Wang, J., Muntean, A.G. & Hess, J.L. ECSASB2 mediates MLL degradation during hematopoietic differentiation. *Blood* **119**, 1151-1161 (2012).
409. Bello, N.F. *et al.* The E3 ubiquitin ligase specificity subunit ASB2beta is a novel regulator of muscle differentiation that targets filamin B to proteasomal degradation. *Cell Death Differ* **16**, 921-932 (2009).
410. Heuzé, M.L. *et al.* ASB2 targets filamins A and B to proteasomal degradation. *Blood* **112**, 5130-5140 (2008).
411. Zhang, W. *et al.* ASB3 knockdown promotes mitochondrial apoptosis via activating the interdependent cleavage of Beclin1 and caspase-8 in hepatocellular carcinoma. *Science China Life Sciences* **62**, 1692-1702 (2019).
412. Townley-Tilson, W.H., Wu, Y., Ferguson, J.E., 3rd & Patterson, C. The ubiquitin ligase ASB4 promotes trophoblast differentiation through the degradation of ID2. *PLoS One* **9**, e89451 (2014).
413. Li, J.Y. *et al.* Ankyrin repeat and SOCS box containing protein 4 (Asb-4) interacts with GPS1 (CSN1) and inhibits c-Jun NH2-terminal kinase activity. *Cell Signal* **19**, 1185-1192 (2007).
414. Boengler, K. *et al.* The ankyrin repeat containing SOCS box protein 5: a novel protein associated with arteriogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 17-22 (2003).
415. Wilcox, A., Katsanakis, K.D., Bheda, F. & Pillay, T.S. Asb6, an adipocyte-specific ankyrin and SOCS box protein, interacts with APS to enable recruitment of elongins B and C to the insulin receptor signaling complex. *J Biol Chem* **279**, 38881-38888 (2004).
416. Liu, Y. *et al.* ASB7 Is a Novel Regulator of Cytoskeletal Organization During Oocyte Maturation. *Front Cell Dev Biol* **8**, 595917 (2020).

417. Liu, Y. *et al.* Molecular cloning and characterization of the human ASB-8 gene encoding a novel member of ankyrin repeat and SOCS box containing protein family. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 972-979 (2003).
418. Zhong, L. *et al.* Autoantibodies as potential biomarkers for breast cancer. *Breast Cancer Res* **10**, R40 (2008).
419. Keller, K.E. *et al.* Ankyrin repeat and suppressor of cytokine signaling box containing protein-10 is associated with ubiquitin-mediated degradation pathways in trabecular meshwork cells. *Mol Vis* **19**, 1639-1655 (2013).
420. Pasutto, F. *et al.* Variants in ASB10 are associated with open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet* **21**, 1336-1349 (2012).
421. Fingert, J.H. *et al.* Analysis of ASB10 variants in open angle glaucoma. *Hum Mol Genet* **21**, 4543-4548 (2012).
422. Micheal, S. *et al.* Variants in the ASB10 Gene Are Associated with Primary Open Angle Glaucoma. *PLoS One* **10**, e0145005 (2015).
423. Diks, S.H. *et al.* The novel gene asb11: a regulator of the size of the neural progenitor compartment. *J Cell Biol* **174**, 581-592 (2006).
424. Chen, F.Y. *et al.* BIK ubiquitination by the E3 ligase Cul5-ASB11 determines cell fate during cellular stress. *J Cell Biol* **218**, 3002-3018 (2019).
425. Chi, C., Murphy, L.C. & Hu, P. Recurrent copy number alterations in young women with breast cancer. *Oncotarget* **9**, 11541-11558 (2018).
426. Blenk, S. *et al.* Germinal center B cell-like (GCB) and activated B cell-like (ABC) type of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL): analysis of molecular predictors, signatures, cell cycle state and patient survival. *Cancer Inform* **3**, 399-420 (2007).
427. Wang, C., Yang, H. & Gao, C. Potential biomarkers for heart failure. *J Cell Physiol* **234**, 9467-9474 (2019).
428. McDaneld, T.G., Hancock, D.L. & Moody, D.E. Altered mRNA abundance of ASB15 and four other genes in skeletal muscle following administration of beta-adrenergic receptor agonists. *Physiol Genomics* **16**, 275-283 (2004).
429. Guo, J.H. *et al.* Expression of testis specific ankyrin repeat and SOCS box-containing 17 gene. *Arch Androl* **50**, 155-161 (2004).

430. Díaz-Casado, E. *et al.* Analysis of gene variants in the GASH/Sal model of epilepsy. *PLoS One* **15**, e0229953 (2020).
431. Šedová, L. *et al.* Isolation of a Genomic Region Affecting Most Components of Metabolic Syndrome in a Chromosome-16 Congenic Rat Model. *PLoS One* **11**, e0152708 (2016).
432. Voit, R., Hoffmann, M. & Grummt, I. Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *Embo j* **18**, 1891-1899 (1999).
433. Sirri, V., Hernandez-Verdun, D. & Roussel, P. Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *J Cell Biol* **156**, 969-981 (2002).
434. Coppé, J.P. *et al.* Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem* **286**, 36396-36403 (2011).
435. Sun, K. *et al.* The effects of siRNA against RPL22 on ET-1-induced proliferation of human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Int J Mol Med* **30**, 351-357 (2012).
436. Zhou, R. *et al.* Comparative analysis of argonaute-dependent small RNA pathways in *Drosophila*. *Mol Cell* **32**, 592-599 (2008).
437. Zhang, Y. *et al.* Control of hematopoietic stem cell emergence by antagonistic functions of ribosomal protein paralogs. *Dev Cell* **24**, 411-425 (2013).
438. Ni, K. *et al.* The lncRNA ADAMTS9-AS2 Regulates RPL22 to Modulate TNBC Progression via Controlling the TGF- β Signaling Pathway. *Front Oncol* **11**, 654472-654472 (2021).
439. Rao, S. *et al.* RPL22L1 induction in colorectal cancer is associated with poor prognosis and 5-FU resistance. *PloS one* **14**, e0222392-e0222392 (2019).
440. Rao, S. *et al.* Ribosomal Protein Rpl22 Controls the Dissemination of T-cell Lymphoma. *Cancer research* **76**, 3387-3396 (2016).
441. Zeng, J. *et al.* RPL22 Overexpression Promotes Psoriasis-Like Lesion by Inducing Keratinocytes Abnormal Biological Behavior. *Frontiers in immunology* **12**, 699900-699900 (2021).
442. Bury, M., Le Calvé, B., Ferbeyre, G., Blank, V. & Lessard, F. New Insights into CDK Regulators: Novel Opportunities for Cancer Therapy. *Trends Cell Biol* **31**, 331-344 (2021).

443. Yang, M. *et al.* Interaction of ribosomal protein L22 with casein kinase 2 α : a novel mechanism for understanding the biology of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* **32**, 139-144 (2014).
444. Dixit, D., Sharma, V., Ghosh, S., Mehta, V.S. & Sen, E. Inhibition of Casein kinase-2 induces p53-dependent cell cycle arrest and sensitizes glioblastoma cells to tumor necrosis factor (TNF α)-induced apoptosis through SIRT1 inhibition. *Cell Death & Disease* **3**, e271-e271 (2012).
445. Pinna, L.A. & Meggio, F. Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res* **3**, 77-97 (1997).
446. Siddiqui-Jain, A. *et al.* CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Res* **70**, 10288-10298 (2010).
447. Tawfic, S. *et al.* Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol Histopathol* **16**, 573-582 (2001).
448. Litchfield, D.W. & Lüscher, B. Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation. *Mol Cell Biochem* **127-128**, 187-199 (1993).
449. Ahmed, K. Nuclear matrix and protein kinase CK2 signaling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **9**, 329-336 (1999).
450. Glover, C.V., 3rd On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **59**, 95-133 (1998).
451. Kampen, K.R. *et al.* The ribosomal RPL10 R98S mutation drives IRES-dependent BCL-2 translation in T-ALL. *Leukemia* **33**, 319-332 (2019).
452. Girardi, T. *et al.* The T-cell leukemia-associated ribosomal RPL10 R98S mutation enhances JAK-STAT signaling. *Leukemia* **32**, 809-819 (2018).
453. Bellodi, C., Kopmar, N. & Ruggero, D. Dereglulation of oncogene-induced senescence and p53 translational control in X-linked dyskeratosis congenita. *Embo j* **29**, 1865-1876 (2010).
454. Kampen, K.R., Sulima, S.O., Vereecke, S. & De Keersmaecker, K. Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Research* **48**, 1013-1028 (2020).
455. Murakawa, Y. *et al.* RC3H1 post-transcriptionally regulates A20 mRNA and modulates the activity of the IKK/NF- κ B pathway. *Nature Communications* **6**, 7367 (2015).

456. Corral, V.M., Schultz, E.R., Eisenstein, R.S. & Connell, G.J. Roquin is a major mediator of iron-regulated changes to transferrin receptor-1 mRNA stability. *iScience* **24**, 102360 (2021).
457. Wong, Sarah J. *et al.* KDM2B Recruitment of the Polycomb Group Complex, PRC1.1, Requires Cooperation between PCGF1 and BCORL1. *Structure* **24**, 1795-1801 (2016).
458. Gearhart, M.D., Corcoran, C.M., Wamstad, J.A. & Bardwell, V.J. Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets. *Mol Cell Biol* **26**, 6880-6889 (2006).
459. Itahana, K., Campisi, J. & Dimri, G.P. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* **5**, 1-10 (2004).
460. Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* **46**, W296-w303 (2018).
461. Chen, V.B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D* **66**, 12-21 (2010).
462. Knudsen, S. Promoter2.0: for the recognition of PolII promoter sequences. *Bioinformatics* **15**, 356-361 (1999).
463. Zhang, Q. *et al.* hTFtarget: A Comprehensive Database for Regulations of Human Transcription Factors and Their Targets. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **18**, 120-128 (2020).
464. Zhou, P. & Howley, P.M. Ubiquitination and degradation of the substrate recognition subunits of SCF ubiquitin-protein ligases. *Mol Cell* **2**, 571-580 (1998).
465. Kawakami, T. *et al.* NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase. *Embo j* **20**, 4003-4012 (2001).
466. Manford, A.G. *et al.* A Cellular Mechanism to Detect and Alleviate Reductive Stress. *Cell* **183**, 46-61.e21 (2020).
467. Garzia, A. *et al.* The E3 ubiquitin ligase and RNA-binding protein ZNF598 orchestrates ribosome quality control of premature polyadenylated mRNAs. *Nat Commun* **8**, 16056 (2017).
468. Ikeuchi, K. *et al.* Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways. **38**, e100276 (2019).

469. Matsuo, Y. *et al.* Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nature Communications* **8**, 159 (2017).
470. Juskiewicz, S. *et al.* ZNF598 Is a Quality Control Sensor of Collided Ribosomes. *Mol Cell* **72**, 469-481.e467 (2018).
471. Juskiewicz, S. & Hegde, R.S. Initiation of Quality Control during Poly(A) Translation Requires Site-Specific Ribosome Ubiquitination. *Molecular Cell* **65**, 743-750.e744 (2017).
472. Nguyen, A.T. *et al.* UBE2O remodels the proteome during terminal erythroid differentiation. **357**, eaan0218 (2017).
473. Sung, M.K., Reitsma, J.M., Sweredoski, M.J., Hess, S. & Deshaies, R.J. Ribosomal proteins produced in excess are degraded by the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell* **27**, 2642-2652 (2016).
474. Sung, M.-K. *et al.* A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *eLife* **5**, e19105 (2016).
475. Ly, T. *et al.* Proteome-wide analysis of protein abundance and turnover remodelling during oncogenic transformation of human breast epithelial cells. *Wellcome Open Res* **3**, 51-51 (2018).
476. Mellacheruvu, D. *et al.* The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods* **10**, 730-736 (2013).
477. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* **31**, 3406-3415 (2003).
478. Taira, T. *et al.* AMY-1, a novel C-MYC binding protein that stimulates transcription activity of C-MYC. **3**, 549-565 (1998).
479. Sodir, N.M. *et al.* MYC Instructs and Maintains Pancreatic Adenocarcinoma Phenotype. *Cancer Discov* **10**, 588-607 (2020).
480. Shen, Z. *et al.* POTEE drives colorectal cancer development via regulating SPHK1/p65 signaling. *Cell Death & Disease* **10**, 863 (2019).
481. Bera, T.K. *et al.* POTE Paralogs Are Induced and Differentially Expressed in Many Cancers. **66**, 52-56 (2006).
482. Wang, Q. *et al.* Serum levels of the cancer-testis antigen POTEE and its clinical significance in non-small-cell lung cancer. *PLoS One* **10**, e0122792 (2015).

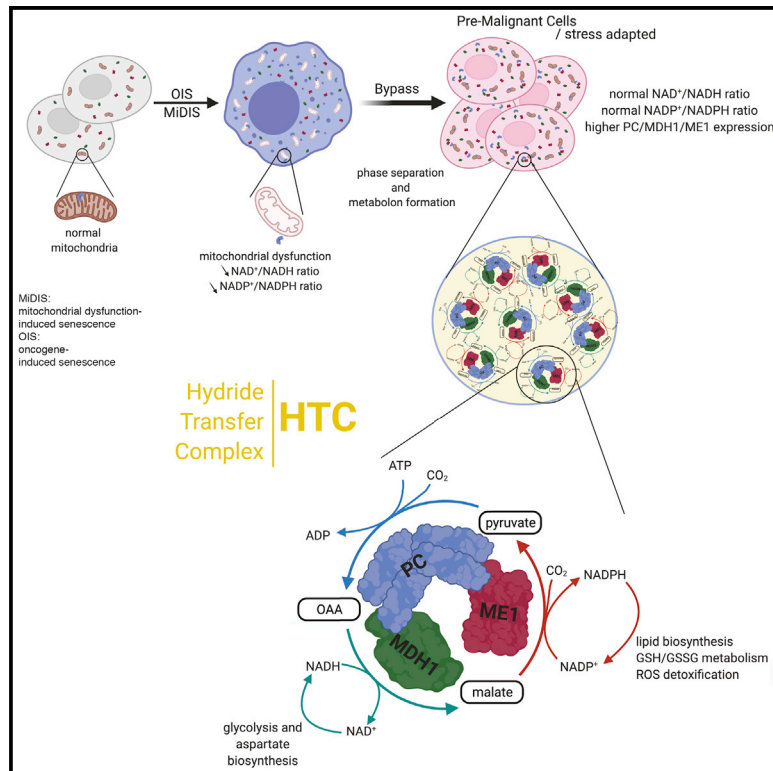
483. Ramanathan, R.K. *et al.* A randomized phase II study of PX-12, an inhibitor of thioredoxin in patients with advanced cancer of the pancreas following progression after a gemcitabine-containing combination. *Cancer Chemother Pharmacol* **67**, 503-509 (2011).
484. Grogan, T.M. *et al.* Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. *Hum Pathol* **31**, 475-481 (2000).
485. Nakamura, H. *et al.* Expression of thioredoxin and glutaredoxin, redox-regulating proteins, in pancreatic cancer. *Cancer Detect Prev* **24**, 53-60 (2000).
486. Raffel, J. *et al.* Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *J Lab Clin Med* **142**, 46-51 (2003).
487. Seo, M.S. *et al.* Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* **275**, 20346-20354 (2000).
488. Schultz, M.A. *et al.* Thioredoxin system-mediated regulation of mutant Kras associated pancreatic neoplasia and cancer. *Oncotarget* **8**, 92667-92681 (2017).
489. Sarantis, P., Koustas, E., Papadimitropoulou, A., Papavassiliou, A.G. & Karamouzis, M.V. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. *World J Gastrointest Oncol* **12**, 173-181 (2020).
490. Sun, X. *et al.* PROTACs: great opportunities for academia and industry. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **4**, 64 (2019).
491. Zhang, Q., Meng, Y., Zhang, L., Chen, J. & Zhu, D. RNF13: a novel RING-type ubiquitin ligase over-expressed in pancreatic cancer. *Cell Research* **19**, 348-357 (2009).
492. Weng, M., Luo, Z.-L., Wu, X.-L. & Zeng, W.-Z. The E3 ubiquitin ligase NEDD4 is translationally upregulated and facilitates pancreatic cancer. **8** (2017).
493. Bommi-Reddy, A. *et al.* Kinase requirements in human cells: III. Altered kinase requirements in VHL-/- cancer cells detected in a pilot synthetic lethal screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16484-16489 (2008).
494. Chan, D.A. *et al.* Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Sci Transl Med* **3**, 94ra70 (2011).
495. Turcotte, S. *et al.* A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell* **14**, 90-102 (2008).

Annexe

Dans cette annexe se retrouve la version intégrale d'un article de recherche dans lequel je suis deuxième auteure. J'ai contribué en effectuant toutes les immunohistochimies et les quantifications de celles-ci. J'ai également fait les purifications de mitochondries menant à la figure S10. Cet article a été publié dans le journal *Molecular Cell* le 16 septembre 2021.

A hydride transfer complex reprograms NAD metabolism and bypasses senescence

Graphical abstract



Authors

Sebastian Igelmann, Frédéric Lessard, Oro Uchenunu, ..., James G. Omichinski, Ivan Topisirovic, Gerardo Ferbeyre

Correspondence

ivan.topisirovic@mcgill.ca (I.T.),
g.ferbeyre@umontreal.ca (G.F.)

In brief

Igelmann et al. identified a hydride transfer complex (HTC) that drives metabolic reprogramming to overcome senescence and induces tumorigenesis. HTC consists of pyruvate carboxylase, malate dehydrogenase 1 and malic enzyme 1 and catalyzes a metabolic cycle whose net effect is to supply NAD⁺ and NADPH, which are key cofactors for many essential metabolic reactions.

Highlights

- PC, MDH1, and ME1 form a hydride transfer complex (HTC) in the cytoplasm
- HTC transfers reducing equivalents from NADH to NADP⁺
- HTC promotes tumor formation by bypassing senescence
- HTC confers fitness to cells under hypoxia or mitochondrial dysfunction



Article

A hydride transfer complex reprograms NAD metabolism and bypasses senescence

Sebastian Igelmann,^{1,18} Frédéric Lessard,^{18,19} Oro Uchenunu,^{2,3,19} Jacob Bouchard,^{18,19} Ana Fernandez-Ruiz,^{1,19} Marie-Camille Rowell,¹ Stéphane Lopes-Paciencia,¹ David Papadopoli,^{2,6} Aurélien Fouillen,^{4,18} Katia Julissa Ponce,⁴ Geneviève Huot,¹⁸ Lian Mignacca,¹⁸ Mehdi Benfdil,¹⁸ Paloma Kalegari,^{1,18} Haytham M. Wahba,^{12,18} Jan Pencik,^{7,14,15} Nhung Vuong,¹ Jordan Quenneville,⁹ Jordan Guillon,¹ Véronique Bourdeau,¹⁸ Laura Hulea,¹⁰ Etienne Gagnon,^{9,13} Lukas Kenner,^{7,8,16,17} Richard Moriggl,¹¹ Antonio Nanci,⁴ Michael N. Pollak,² James G. Omichinski,¹⁸ Ivan Topisirovic,^{2,3,5,6,*} and Gerardo Ferbeyre^{1,18,20,*}

¹CRCHUM, 900 Saint-Denis St, Montréal, QC H2X 0A9, Canada

²Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, Montréal, QC H3T1E2, Canada

³Department of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, QC H4A3T2, Canada

⁴Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

⁵Department of Biochemistry, McGill University, Montreal, QC H4A 3T2, Canada

⁶Gerald Bronfman Department of Oncology, McGill University, Montreal, QC H4A3T2, Canada

⁷Department of Pathology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

⁸Unit of Laboratory Animal Pathology, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria

⁹Institut de recherche en immunologie et en cancérologie (IRIC), Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

¹⁰Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Montréal, QC H1T 2M4, Canada, Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

¹¹Institute of Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine Vienna, 1210 Vienna, Austria

¹²Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Beni-Suef University, Beni-Suef 62521, Egypt

¹³Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

¹⁴Molecular and Cell Biology Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA 92037, USA

¹⁵Center for Biomarker Research in Medicine, 8010 Graz, Austria

¹⁶Christian Doppler Laboratory for Applied Metabolomics, Vienna, Austria

¹⁷CBmed GmbH - Center for Biomarker Research in Medicine, Graz, Styria, Austria

¹⁸Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

¹⁹These authors contributed equally

²⁰Lead contact

*Correspondence: ivan.topisirovic@mcgill.ca (I.T.), g.ferbeyre@umontreal.ca (G.F.)

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.028>

SUMMARY

Metabolic rewiring and redox balance play pivotal roles in cancer. Cellular senescence is a barrier for tumorigenesis circumvented in cancer cells by poorly understood mechanisms. We report a multi-enzymatic complex that reprograms NAD metabolism by transferring reducing equivalents from NADH to NADP⁺. This hydride transfer complex (HTC) is assembled by malate dehydrogenase 1, malic enzyme 1, and cytosolic pyruvate carboxylase. HTC is found in phase-separated bodies in the cytosol of cancer or hypoxic cells and can be assembled *in vitro* with recombinant proteins. HTC is repressed in senescent cells but induced by p53 inactivation. HTC enzymes are highly expressed in mouse and human prostate cancer models, and their inactivation triggers senescence. Exogenous expression of HTC is sufficient to bypass senescence, rescue cells from complex I inhibitors, and cooperate with oncogenic RAS to transform primary cells. Altogether, we provide evidence for a new multi-enzymatic complex that reprograms metabolism and overcomes cellular senescence.

INTRODUCTION

Senescence is a broadly acting tumor suppressor mechanism wherein cells bearing oncogenic mutations cannot expand due to a chronic state of mitochondrial dysfunction, oxidative stress, DNA damage, and activation of tumor suppressors (Wiley and Campisi, 2016). Dysfunctional mitochondria are a hallmark of senescent cells in response to short telomeres (Passos et al., 2007)

or oncogenes (Moiseeva et al., 2009). Mitochondrial dysfunction-associated senescence is characterized by decreased NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide)/NADH ratio (Wiley et al., 2016), increased reactive oxygen species (ROS), and reduced ATP as compared with non-senescent cells (Moiseeva et al., 2009; Passos et al., 2007). This entices increase in glycolysis to maintain viability (Dórr et al., 2013). Because inhibition of senescence often precedes transformation (Deschênes-Simard et al.,



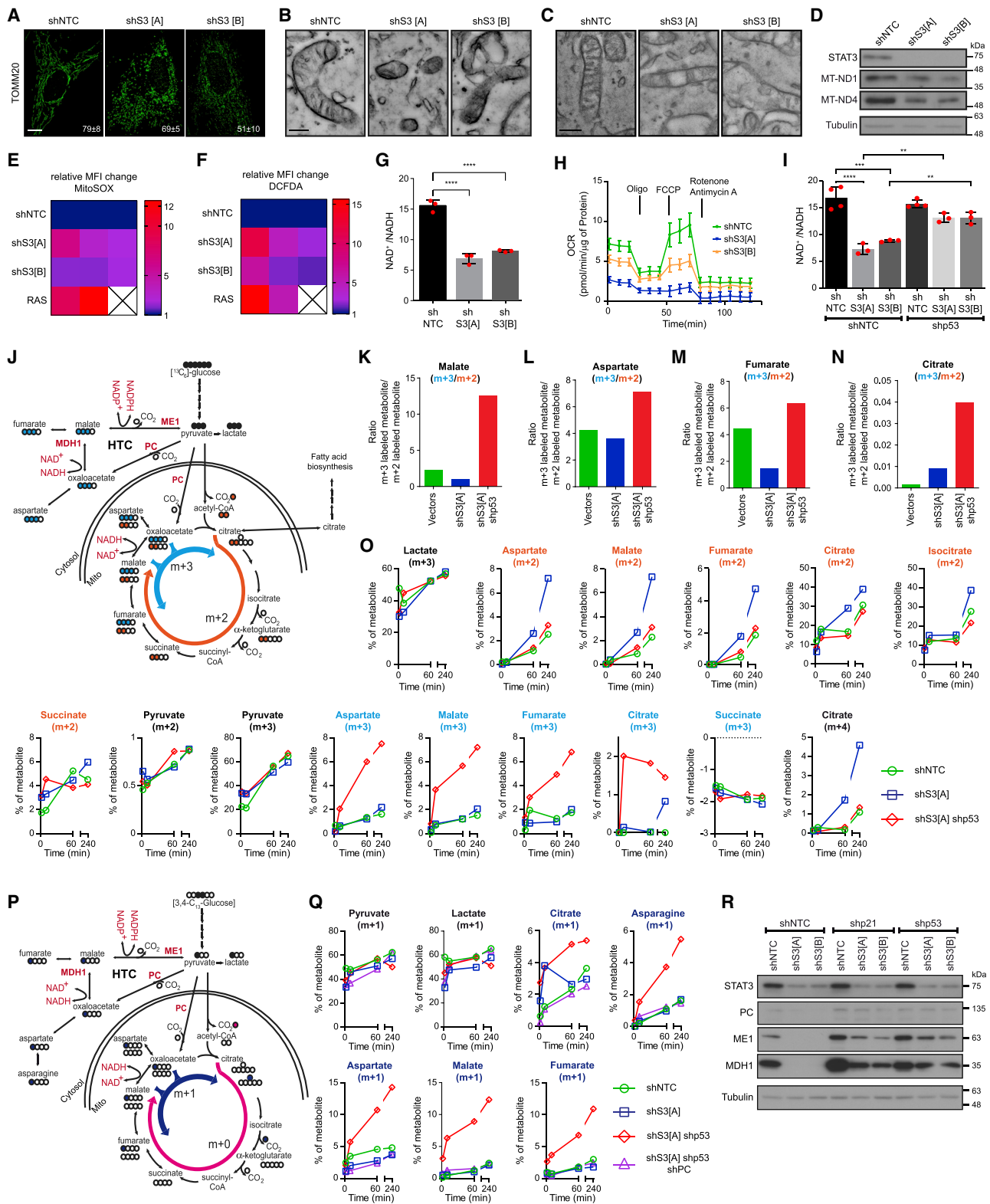


Figure 1. p53 inactivation reprograms the metabolism of senescent cells with mitochondrial dysfunction

(A) Immunofluorescence (IF) using anti-TOMM20 antibody in IMR90 cells expressing shRNAs against STAT3 (shS3[A]) and shS3[B] or a control non-targeting shRNA (shNTC). Mean % of staining pattern (tubular or puncta) of cells and standard deviation (SD) is shown in the lower right corner; scale, 10 μ m.

(legend continued on next page)

2019; Moiseeva et al., 2020; Yu et al., 2018), it is important to understand how cancer cells overcome the barriers to cell proliferation that characterize senescence, including mitochondrial dysfunction.

The origin of mitochondrial dysfunction in senescent cells is not well understood. During oncogene-induced senescence (OIS), several proteins are targeted for degradation affecting a variety of processes required for cell proliferation (Deschênes-Simard et al., 2013; Deschênes-Simard et al., 2014). One of these proteins is signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (Vallania et al., 2009), which regulates transcription in the nucleus (Kidder et al., 2008) and electron transport and oxidative phosphorylation in mitochondria (Wegrzyn et al., 2009). The mitochondrial functions of STAT3 are required for cellular transformation by oncogenic RAS protein (Gough et al., 2009). Deletion of *STAT3* in hematopoietic stem cells leads to mitochondrial dysfunction, overproduction of ROS, and premature aging of blood cells (Mantel et al., 2012). Collectively, these studies suggest that the mitochondrial functions of STAT3 may be required to prevent senescence.

To discover cellular pathways that compensate for mitochondrial dysfunction and allow tumor cells to circumvent senescence, we used several models of cellular senescence. We found that senescence induced by STAT3 depletion required a decrease in the NAD^+/NADH ratio that was maintained by the actions of the p53 and retinoblastoma protein (RB) tumor suppressors. p53 and RB repress an enzyme complex that catalyzes a metabolic cycle that transfers the hydride anion (H^-) from NADH to NADP^+ , thus regenerating NAD^+ and supplying NADPH. This hydride transfer complex (HTC) is formed by malic enzyme 1 (ME1), malate dehydrogenase 1 (MDH1), and pyruvate carboxylase (PC) and can be assembled *in vitro* with purified proteins. We also biophysically characterized HTC as well as its ability to

compensate for mitochondrial dysfunction and promote tumorigenesis. Strikingly, inhibiting HTC leads to tumor cell senescence even in the absence of p53, revealing the therapeutic potential of targeting this previously unrecognized metabolon.

RESULTS

Depletion of STAT3 induces senescence, mitochondrial dysfunction, and a low NAD^+/NADH ratio

Senescence induced by either oncogenes or short telomeres is accompanied by downregulation of STAT3 (Deschênes-Simard et al., 2013). Since STAT3 is required for mitochondrial functions (Gough et al., 2009; Wegrzyn et al., 2009), we sought to investigate whether disabling STAT3 leads to senescence via mitochondrial dysfunction. We depleted STAT3 from normal human fibroblasts using small hairpin RNAs (shRNAs) and observed a strong decline in proliferation accompanied by increased senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -Gal) activity and several senescence biomarkers (Figures S1A–S1H) in line with previous work showing induction of senescence after STAT3 inactivation in some cancer cells (Tkach et al., 2012).

Given the links between STAT3 and mitochondria, (Gough et al., 2009; Wegrzyn et al., 2009) we performed staining for the mitochondria membrane marker TOMM20 (McBride et al., 1996). This revealed that mitochondria in STAT3-depleted cells appear as multiple punctiform structures in contrast to the tubular network of normal human fibroblasts (Figure 1A). Transmission electron microscopy revealed that mitochondria from STAT3-depleted cells are spherical with disrupted cristae (Figures 1B and 1C). It was reported that mitochondrial STAT3 regulates mitochondrial gene expression (Macias et al., 2014), and we found that protein levels of mitochondrial-encoded mt-ND1 and mt-ND4 were reduced in cells with low STAT3 levels

(B and C) Scanning transmission electron microscopy (STEM) micrographs (B) and transmission electron microscopy (TEM) (C) of cells as in (A); scale, 250 nm; $n = 2$.

(D) Western Blot (WB) of indicated proteins in cells as in (A).

(E and F) Heatmap of relative change over control cells in median fluorescent intensity (MFI) for MitoSOX (E) or DCFDA (F) in cells as in (A) and cells expressing oncogenic RAS. Each column represents a biological replicate with a minimum of 10,000 cells, $n = 2$ –3.

(G) NAD^+/NADH ratio in cells as in (A).

(H) Oxygen consumption rate (OCR) of cells as in (A); $n = 4$ –6, error bars show SEM (standard error of the mean).

(I) Mean NAD^+/NADH ratio in cells expressing a control shRNA (shNTC) or a shRNA against STAT3 (shS3[A], shS3[B]) in combination with an shRNA against p53 (shp53) or non-target control shRNA (shNTC).

(J) Model of regeneration of NAD^+ by MDH1, ME1 and PC plus schematic of metabolite ^{13}C labeling patterns after labeling with $^{13}\text{C}_6$ -glucose. ^{13}C are noted by filled circles. Orange cycle is the forward direction of TCA cycle giving (m+2) intermediates (orange-filled circles). Light-blue cycle starts with pyruvate carboxylase (PC) and is characterized by (m+3) intermediates (light-blue-filled circles). HTC, hydride transfer complex; mito, mitochondria.

(K–N) Ratio of (m+3)/(m+2) isotopomers for the indicated metabolites in IMR90 cells expressing a control shRNA (shNTC), a shRNA against STAT3 (shS3[A]) alone or in combination with an shRNA against p53 (shp53). Ratios were calculated 10 min post-labeling.

(O) Amount of indicated labeled intermediates over time measured by GC-MS relative to the total amount of each related metabolite for IMR90 cells as in (K). Data show representative experiment.

(P) Model of PC activity labeling pattern with ^{13}C -[3,4]-glucose. ^{13}C -[3,4]-glucose is converted into ^{13}C -[1]-pyruvate. Each intermediate generated via PDH is not labeled (magenta cycle), while in the PC reaction-labeled carbon is maintained (m+1, dark-blue cycle), filled circles show heavy carbon. HTC, hydride transfer complex; mito, mitochondria.

(Q) Amount of indicated labeled intermediates over time measured by GC-MS relative to the total amount of each related metabolite for IMR90 cells expressing a control shRNA (shNTC), a shRNA against STAT3 (shS3[A]) alone or in combination with an shRNA against p53 (shp53), and/or a shRNA against PC (shPC). Data show representative experiment of $n = 2$.

(R) WB for the indicated proteins in IMR90 cells expressing a control shRNA (shNTC) or shRNAs against STAT3 (shS3[A] and shS3[B]) together with control shRNA (shNTC) or shRNAs against p53 (shp53) or p21 (shp21).

Experiments other than indicated are from $n = 3$ biological replicates. (A–D, O, Q–R) show representative images. ANOVA with multiple comparison test (G and I). Mean \pm SD for (G and I) with red dots as biological values and mean for (K–N). For (K–O), conditions shNTC and shS3[A] are the same as in Figures 4J and 4K. Related to Figures S1–S3.

(Figure 1D). Cells depleted for STAT3 also produced higher levels of ROS (Figures 1E and 1F) and had a dramatically decreased NAD⁺/NADH ratio (Figure 1G), which are signs of mitochondrial dysfunction. The decrease in NAD⁺/NADH ratio was mainly the result of an increase in NADH because STAT3 depletion did not significantly alter total NAD or NAD⁺ (Figure S11). In support of mitochondrial dysfunction, we found that both basal and maximal respiration were decreased upon STAT3 depletion (Figure 1H).

To confirm that the lack of STAT3 functions in mitochondria leads to mitochondrial dysfunction, we expressed an shRNA-insensitive (i) STAT3 allele with a mitochondrial localization signal in STAT3-depleted cells. This mito-iSTAT3 localized into mitochondria, attenuated senescence, and restored the NAD⁺/NADH ratio to the level observed in STAT3-non-depleted control cells (Figures S1J–S1N). We also observed that endogenous STAT3 was reduced in purified mitochondria from cells that undergo OIS (Figure S1O). Furthermore, proximity ligation assay (PLA) revealed that STAT3 interacts with the mitochondrial protein ATAD3A in proliferating cells (Carbognin et al., 2016), whereas in replicative senescent cells or OIS cells, interaction of ATAD3A with STAT3 was lost (Figure S1P–S1U), highlighting the changes of mitochondrial STAT3 levels in response to senescence and aging. By taking advantage of the yeast single subunit complex I NADH dehydrogenase (NDI1) (Birsoy et al., 2014), we next investigated whether mitochondrial complex I inhibition caused by STAT3 depletion is the main cause of the observed decrease in the NAD⁺/NADH ratio. We found that NDI1 localized to mitochondria, bypassed senescence, and partially restored the NAD⁺/NADH ratio in STAT3-depleted cells (Figures S2A–S2F). Together, these data show that mitochondrial STAT3 plays an important role in preventing senescence.

The NAD⁺/NADH ratio can be restored by pyruvate, which, through the action of lactate dehydrogenase (LDH), is converted to lactate while NAD⁺ is regenerated from NADH. Alternatively, pyruvate can be metabolized to oxaloacetate, which in turn is reduced to malate, thus converting NADH into NAD⁺ (Hanse et al., 2017). Supplementing STAT3-depleted normal human fibroblasts with 2 mM pyruvate rescued cells from growth arrest and senescence while reducing the number of DNA-damage foci and increasing the NAD⁺/NADH ratio (Figures S2G–S2L). We also treated STAT3-depleted cells with duroquinone, a compound that is reduced to durohydroquinone by the cytosolic enzyme NQO1 (NAD(P)H dehydrogenase [quinone]), which uses NADH as an electron donor and therefore regenerates NAD⁺ and decreases the sensitivity to complex I inhibition by biguanides (Gui et al., 2016). We found that this compound increased the NAD⁺/NADH ratio without altering the total NAD levels in STAT3-depleted cells, which was paralleled by bypass of senescence (Figures S2M–S2S). Next, we used the NADH-oxidase from *Lactobacillus brevis* (LbNOX) to force an increase in the NAD⁺/NADH ratio (Titov et al., 2016). LbNOX expression in the cytosol rescued cells from senescence induced by depletion of STAT3 while increasing the NAD⁺/NADH ratio (Figures S2T–S2W). It has been shown that cells with dysfunctional mitochondria and low NAD⁺/NADH ratio fail to synthesize sufficient asparagine (Krall et al., 2021) and aspartate (Birsoy et al., 2015; Sullivan et al., 2015), but supplementing STAT3-depleted cells with

20 mM aspartate only moderately rescued the proliferation defects and senescence after STAT3-depletion, and it did not normalize the NAD⁺/NADH ratio (Figures S3A–S3G). Together, these data suggest that a failure to reoxidize NADH is implicated in the induction of cellular senescence.

A NAD⁺ regeneration metabolic cycle controlled by the p53-RB tumor suppressors

Depletion of STAT3 leads to the activation of both the p53 and RB tumor suppressor pathways, which are mediators of senescence (Mallette et al., 2007). To investigate whether the p53 pathway is required for senescence after STAT3-depletion, we inactivated p53 and p21 with shRNAs. Inactivation of either p53 or p21 prevented the growth arrest and senescence induced by STAT3-depletion (Figures S3H–S3M). Intriguingly, p53 inactivation also restored the NAD⁺/NADH ratio in STAT3-depleted cells (Figure 1I). Collectively, the results suggest that p53 and/or p21/RB pathway inactivation in STAT3-depleted cells increases the NAD⁺/NADH ratio to sustain the oxidative metabolism of cells that bypass senescence.

To identify NAD⁺-regenerating metabolic pathways repressed by p53 and p21/RB, we combined bioinformatics analysis with stable isotope tracing studies. Using CHIP-Atlas, we found that both p53 and RB-binding partner E2F proteins bind to the promoter region for the NAD⁺ regenerating cytosolic enzyme MDH1 (Figure S4A). Moreover, MDH1 expression is reduced in senescent cells induced by STAT3-depletion or telomere-shortening (Figures S4B and S4C). MDH1 is a cytosolic enzyme that oxidizes NADH and converts oxaloacetate (OAA) into malate (Hanse et al., 2017). To identify the source of OAA for MDH1, we compared glucose metabolism in senescent cells with cells that bypassed senescence via p53 knockdown, using ¹³C₆-glucose tracing. Conversion of pyruvate to OAA via PC can be estimated from the levels of (m+3) malate, fumarate, and citrate relative to the levels of corresponding (m+2) isotopomers generated in the tricarboxylic acid (TCA) cycle from acetyl-CoA (Figure 1J). Because OAA is hard to measure due to its instability, aspartate (m+3) was used as a surrogate marker (Buescher et al., 2015). We found that the pool of pyruvate converted to (m+3) malate, aspartate, fumarate, and citrate is increased in cells that bypass senescence after p53 knockdown (Figures 1K–1O). ¹³C₆-glucose may generate (m+3) malate, fumarate, and aspartate through multiple rounds of pyruvate oxidation in the TCA cycle. This was, however, discarded because we failed to detect (m+3) succinate and were only able to detect traces of (m+4) citrate under these conditions (Figure 1O). Hence, ¹³C₆-glucose tracing was consistent with PC catalyzed conversion of pyruvate into (m+3) OAA. Labeling cells with [3,4-¹³C]-glucose provides a more direct assessment of PC activity. [3,4-¹³C]-glucose is converted to [1-¹³C]-pyruvate, and the latter is converted to m+1 OAA and its derivatives after the PC reaction while the labeled carbon is lost in the PDH reaction (Cheng et al., 2011). Bypass of senescence after p53 knockdown increased the pool of m+1 metabolites, while depletion of PC with an shRNA abrogated these effects (Figures 1P and 1Q). This indicates that p53 loss bolsters PC activity.

Of note, PC is considered a mitochondrial enzyme in mammals, and this implies that pyruvate enters the mitochondria, is

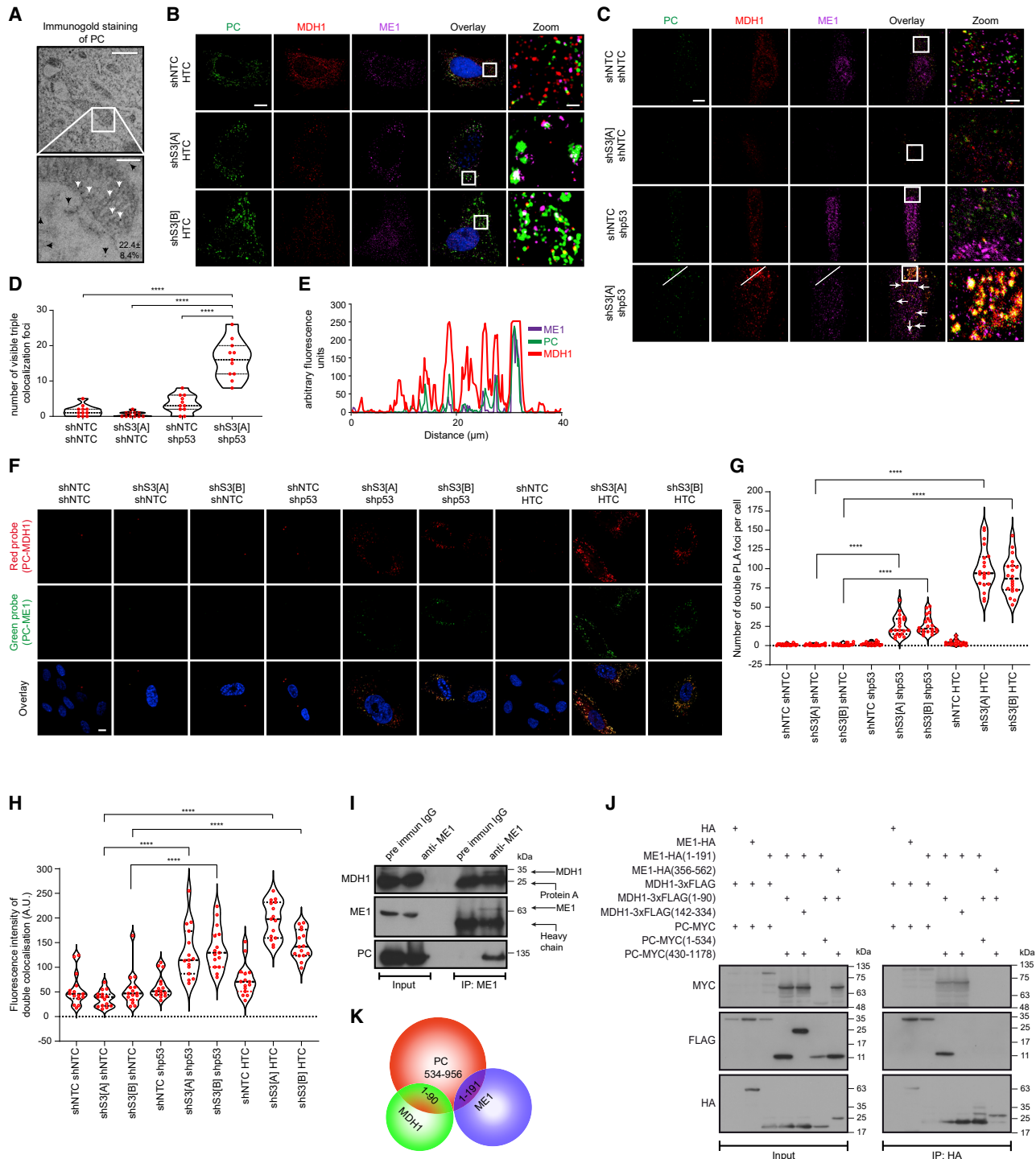


Figure 2. Colocalization and interactions of the enzymes that catalyze the hydride transfer reactions

(A) TEM of PC-3 cells stained with anti-PC antibody followed by immunogold labeling. White arrows: mitochondrial PC. Black arrows: cytosolic PC. Scales: top, 800 nm; bottom, 200 nm. Lower corner shows the percentage of cytosolic PC and SD of a count of 18 representative fields.

(B) IF with super-resolution microscope for the indicated enzymes (MDH1, ME1, and PC) expressed in IMR90 cells depleted for STAT3 (shS3[A], shS3[B]) or STAT3 sufficient cells (shNTC). PC (green), MDH1 (red), and ME1 (magenta), triple colocalization in white. DAPI was used to stain the nucleus. Scale, 10 μ m; zoom scale, 1 μ m.

(C) Colocalization of endogenous MDH1, ME1, and PC in IMR90 cells expressing shRNAs against STAT3 (shS3[A]) and p53 (shp53) and/or control shRNA (shNTC). Scale, 20 μ m; zoom scale, 2 μ m. Triple colocalization in white.

(legend continued on next page)

converted to OAA by PC, and then OAA is either exported to the cytosol as aspartate after transamination or as citrate after conjugation to acetyl-CoA. However, adding aspartate did not rescue the NAD^+/NADH ratio, suggesting that the aspartate pathway is not involved (Figure S3C). In yeast and some *Aspergillus* strains, PC is a cytosolic enzyme (Huet et al., 2000), and mammalian PC can re-localize to the cytosol upon viral infection (Cao et al., 2016) or to the nucleus in 2-cell embryos (Nagaraj et al., 2017). We thus anticipated that a change in cellular localization of PC could supply cytosolic OAA for NAD^+ regeneration via MDH1. The concerted action of cytosolic PC and MDH1 is positioned to regenerate NAD^+ in the cytosol to produce (m+3) malate, which is consistent with the m+3 isotopomers that were increased in cells bypassing senescence (Figures 1J–1N). In addition, the cytosolic malic enzyme 1 (ME1) is expected to convert malate back into pyruvate closing a metabolic cycle that would transfer the hydride ion from NADH to NADP^+ regenerating NAD^+ and supplying NADPH (Figure 1J). Notably, like MDH1, the PC and ME1 promoters contain p53 and RB/E2F binding sites (Figure S4A) and levels of the corresponding proteins decreased in models of cellular senescence (Figure S4B and S4C). These observations are consistent with reports showing that p53 and/or E2F bind to the promoters of ME1 (Jiang et al., 2013), PC (Li et al., 2016), and MDH1 (Yuan et al., 2019) regulating their expression.

We next investigated whether bypassing senescence by inhibiting either the p53 or RB pathway can restore expression of MDH1, PC, and ME1. We found that both shp53 and shp21 rescued MDH1, PC, and ME1 expression in STAT3-depleted IMR90 cells to levels comparable to control cells (Figure 1R). Collectively, these data suggest that a metabolic cycle catalyzed by MDH1, ME1, and cytosolic PC regenerates NAD^+ to bypass cellular senescence. Our model predicts that (1) PC localizes to the cytosol in cells that bypass senescence, (2) expression of the enzymes that catalyze the hydride transfer from NADH to NADP^+ bypasses senescence, and (3) inactivation of these enzymes should lead to a decreased NAD^+/NADH ratio, REDOX stress, and growth inhibition.

Cytosolic localization of PC and formation of HTC

Although PC is more abundant in the mitochondria, we detected full-length PC as well as lower molecular weight forms in the cytosolic fraction of PC-3 prostate cancer cells, which are devoid of STAT3 due to biallelic deletion of the *STAT3* locus (Fig-

ures S4D and S4E). Moreover, we used immunogold staining followed by transmission electron microscopy, which confirmed that a significant proportion of PC localizes to the cytosol in PC-3 cells (Figure 2A). This was further confirmed in IMR90 cells overexpressing PC, where a significant fraction of PC does not colocalize with mitochondria (Figure S4F). Interestingly, overexpression of PC, MDH1, and ME1 in STAT3-depleted IMR90 cells also colocalized in distinctive bodies (Figure 2B) outside mitochondria (Figure S4G). Importantly, we revealed this colocalization pattern with endogenous proteins after inactivation of both STAT3 and p53 in IMR90 cells (Figures 2C–2E). Intriguingly, these foci were dissolved by 1,6-hexanediol, suggesting that they form via liquid-liquid phase separation (Figures S4H and S4I). Additional evidence for the colocalization of HTC enzymes in cytosolic foci was obtained using PLA with antibodies against PC and MDH1 or PC and ME1 (Figures 2F–2H).

The colocalization of PC, MDH1, and ME1 suggested that they interact to form a HTC, and both PC and ME1 co-immunoprecipitated with FLAG-tagged MDH1 in 293T cells. Also, MDH1 and ME1 co-immunoprecipitated with FLAG-tagged PC, and PC and MDH1 co-immunoprecipitated with HA-tagged ME1 (Figures S5A–S5C). Importantly, HTC enzymes co-immunoprecipitated in HuH-7 hepatoma cells that endogenously express high levels of the three enzymes (according to the Cancer Cell Line Encyclopedia, <https://sites.broadinstitute.org/ccle/>) (Figure 2I) and in PC-3 cells (Figure S5D). PC is a biotinylated enzyme (Xiang and Tong, 2008), and its pull-down with streptavidin from PC-3 cells recovered both MDH1 and ME1, but this was not possible in cells where PC was depleted by a shRNA (Figure S5E). Similar results were obtained in HuH-7 cells (Figure S5F).

Biochemical and biophysical characterization of HTC

To identify the regions required for co-immunoprecipitation of the HTC enzymes, we used a series of deletions mutants. In addition to the full-length PC, it was determined that the fragments from positions 430–1,178 and 1–956 formed a complex with both MDH1 and ME1. However, amino acids 1–534 of PC failed to do so, indicating that the interacting region comprises residues 534–956 in the pyruvate carboxyltransferase domain (Figures S5G and S5J). Second, we mapped the regions of MDH1 required to co-immunoprecipitate with PC and ME1. The residues 1–90, 1–141, and 1–192 of MDH1 co-immunoprecipitated with both PC and ME1, but residues 141–334 and 105–334 failed,

(D) Quantification of triple colocalization foci (white foci) per cells as in (C), $N=11$.

(E) Fluorescence intensity of ME1 (magenta), MDH1 (red), and PC (green) in shS3[A]/shp53-expressing cells. Colocalization was measured across the indicated line in (C) and represented as arbitrary fluorescence units for each enzyme.

(F) Proximity ligation assay with two PLA probes to specifically reveal PC interaction with ME1 or with MDH1. PLA probes used are PLA green (ME1 PC) and PLA red (MDH1 PC) on IMR90 infected with either control shRNA (shNTC) or shRNA against STAT3 (shS3[A], shS3[B]) and shRNA against p53 or control shRNA or HTC enzymes (MDH1, ME1, PC). Scale, 10 μm . DAPI was used to stain the nucleus. Colocalization of PLA probe green and red is shown in yellow in overlay, $n=2-3$.

(G) Count of PLA foci from cells in (F), $N=20$.

(H) Fluorescence signal intensity of foci in cells in (F), $N=15$.

(I) IP of endogenous ME1 from HuH-7 cells followed by WB for all HTC enzymes.

(J) IP with HA beads in 293T cells expressing the indicated variants of PC-MYC, MDH1-3x-FLAG and ME1-HA, or control HA vector. IP was followed by WB against indicated proteins.

(K) Schematic of interaction between regions 1–90 of MDH1 and 1–191 ME1 with 534–956 of PC.

A minimum of 3 biological replicates unless indicated. ANOVA with Tukey (G and H) or Dunnett (D) for multiple comparisons, asterisks represent p values for most important comparisons. Related to Figures S4 and S5.

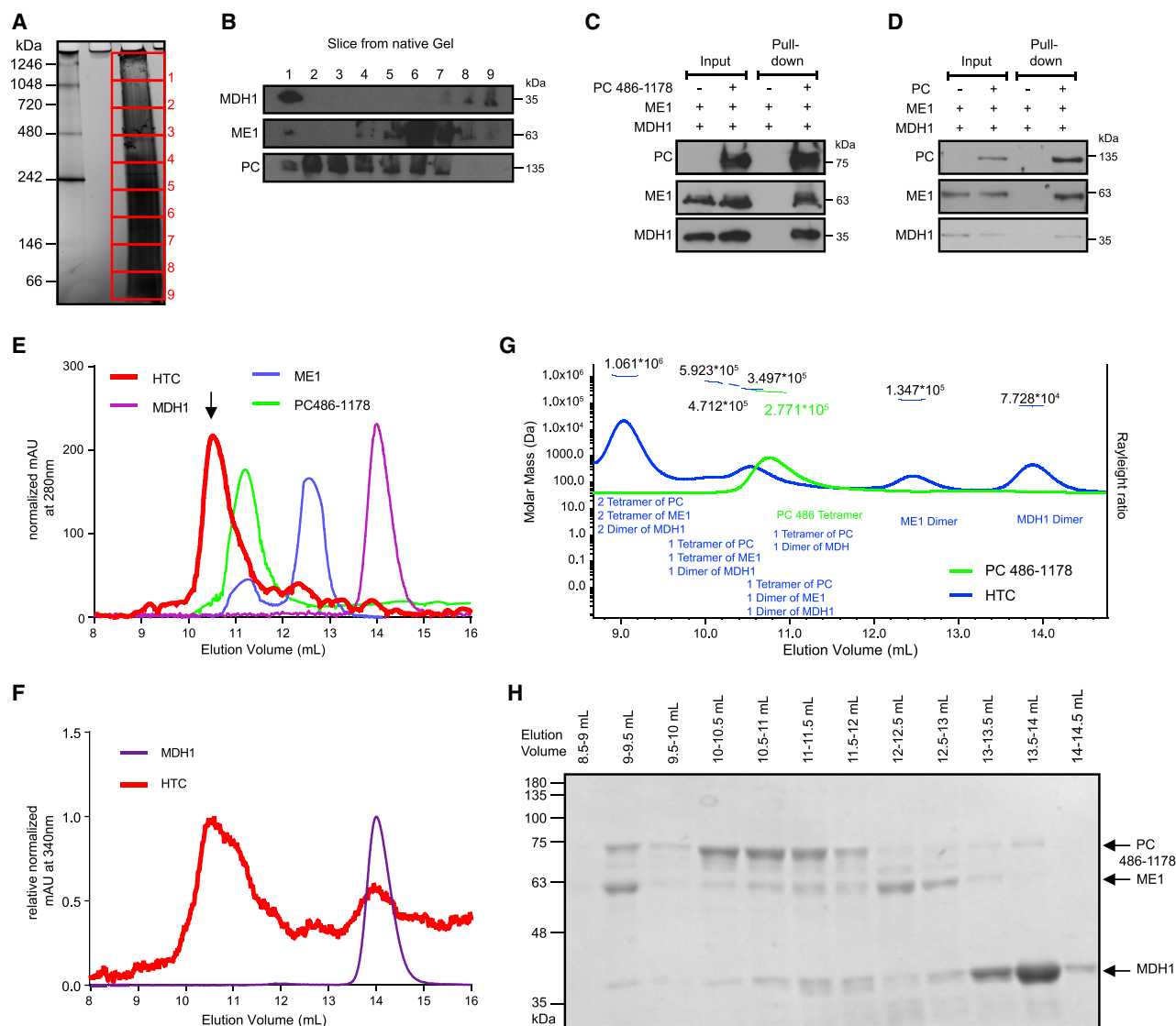


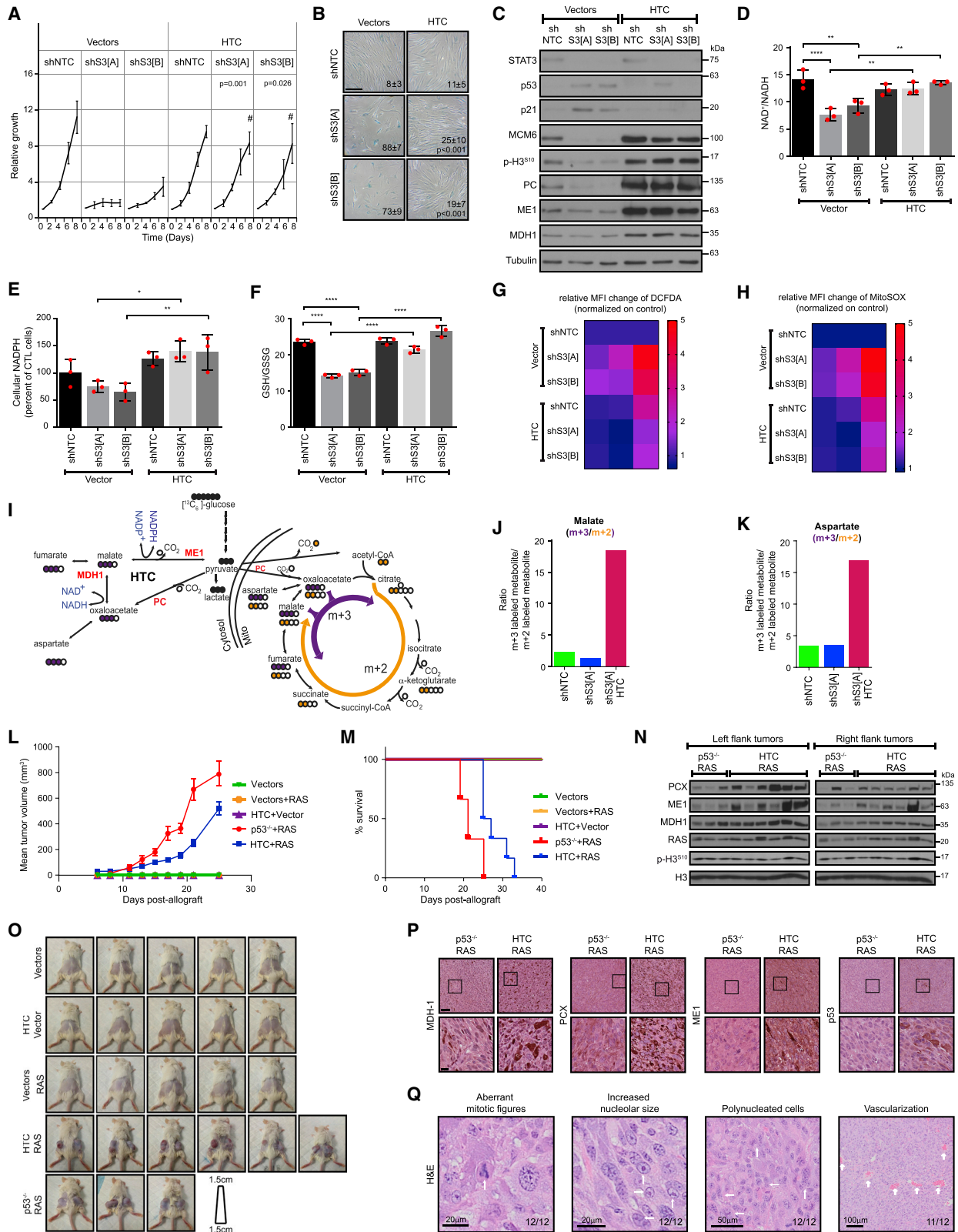
Figure 3. Biophysical characterization of the hydride transfer complex

(A and B) Two-dimensional blue native/SDS gel electrophoresis (2D-BN/SDS-PAGE). Coomassie G-250 staining of BN-PAGE (A) with indicated protein sizes corresponding to collected gel slices (red squares) and immunoblots (B) for the indicated proteins performed on gel slices from (A) migrated on SDS-PAGE. (C and D) *In vitro* assembly of the hydride transfer complex (HTC) with purified PC(486-1178) (C) or full-length PC (D). Mono-Avidin pull-down of biotinylated PC after *in vitro* assembly followed by immunoblotting against the indicated proteins. (E) Size-exclusion chromatography (SEC) with either the individual purified proteins or the pre-assembled HTC (fractions 8–12 mL of the assembly run) on a Superdex 200 Increase column. Data show absorbance at 280 nm. Arrow indicates elution peak of assembled complex. (F) Same SEC experiment as in (E) but with the absorbance at 340 nm (NADH absorbance) normalized relative to either MDH1 or the pre-assembled HTC. (G) SEC-MALS (multi-angle light scattering) of purified PC (486-1178) (green) or all fraction of previously assembled HTC (blue). The calculated molecular weight is shown above each peak and possible complexes are indicated below. (H) SDS-PAGE of collected fractions following the SEC-MALS experiment (G) stained with Coomassie Blue to show the purity and assembly of the complexes. For (A–H) representative images of a minimum of 3 replicates. Related to Figure S5.

concluding that the interacting region is within residues 1–90 (Figures S5H and S5J). Finally, we determined the regions of ME1 required to co-immunoprecipitate PC and MDH1. Full-length ME1 or residues 1–191 immunoprecipitated with both PC and MDH1, but residues 356–562 did not, which suggests that the interacting region is between residues 1–191 (Figures S5I and S5J). The minimal interacting regions (PC^{430–1,178}, MDH1^{1–90}, and

ME1^{1–191}) were then confirmed to co-immunoprecipitate (Figure 2J), revealing that the interaction between MDH1 and ME1 requires PC (Figure 2J–K). Together, the data suggest that specific regions of each enzyme mediate HTC formation.

To confirm that HTC occurs endogenously in cells, we used two-dimensional blue native polyacrylamide gel electrophoresis (2D-BN/PAGE) on HuH-7 cell extracts. Proteins were resolved in



(legend on next page)

a blue native gel in the first dimension followed by SDS-PAGE in the second dimension. This revealed the presence of MDH1 dimers (molecular mass 36.4 kDa); monomers, dimers, and tetramers of ME1 (molecular mass 64.1 kDa); and of PC (molecular mass 129.6 kDa). Importantly, we identified a high molecular weight complex with a mass of ~ 1 MDa, which contained all three enzymes (Figures 3A and 3B). To determine whether the HTC enzymes interact directly *in vitro*, we expressed and purified each enzyme from bacteria as well as a fragment of PC from residues 486–1,178 because full-length PC form aggregates that affect the identification (Xiang and Tong, 2008).

Size exclusion chromatography with multi-angle light scattering (SEC-MALS) analysis revealed that purified PC forms a tetramer, whereas purified ME1 forms dimers and tetramers while purified MDH1 forms a dimer (Figures S5K–S5M). Then, mono-avidin was used to perform pull-downs of either PC(486–1,178) or full-length PC, which are biotinylated, recovering both MDH1 and ME1 (Figures 3C and 3D). Next, we characterized the biophysical properties of the HTC. We loaded purified PC(486–1,178), MDH1, ME1 alone, or a pre-assembled 1:1:1 mixture of the proteins on a Superdex 200 Increase gel filtration column. Whereas the three individual enzymes eluted as described above, the preassembled complex eluted in higher molecular weight fractions, suggesting the formation of a ternary complex (Figure 3E; see arrow). The presence of MDH1 in the complex was identified by measuring NADH absorbance at 340 nm (Figure 3F). Further proof of the formation of HTC was obtained using SEC-MALS analysis of the PC, ME1, and MDH1 mixture. We resolved several complexes of calculated molecular mass of 1MDa, 590 kDa, and 471 kDa, which correspond to the molecular mass of either: two tetramers of PC, two tetramers of ME1, and two dimers of MDH1 (1 MDa); or

one tetramer of PC, one tetramer of ME1, and one dimer of MDH1 (590 kDa); or one tetramer of PC, one dimer of ME1, and one dimer of MDH1 (471 kDa), respectively (Figures 3G and 3H).

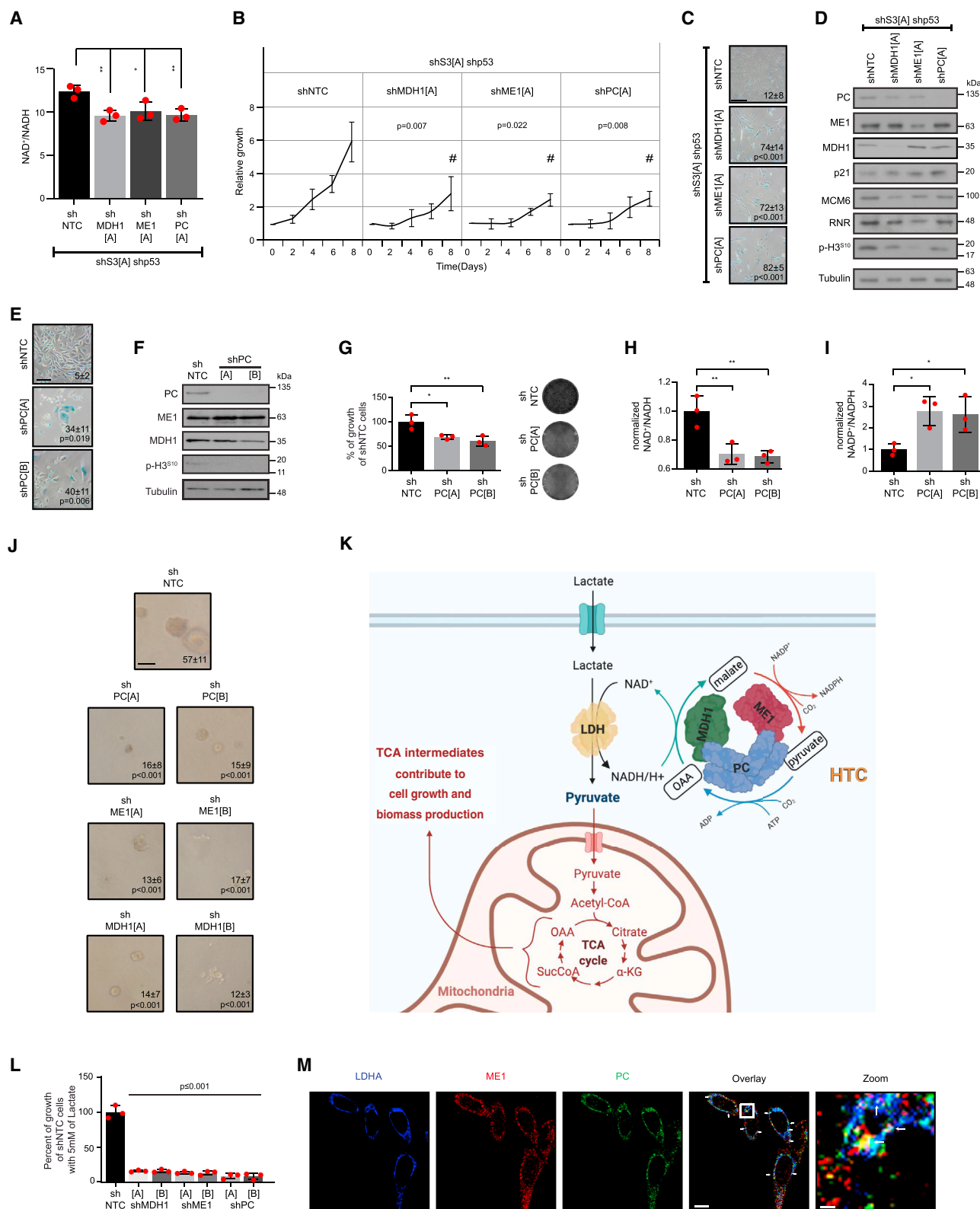
HTC enzymes suppress senescence

To investigate whether HTC enzymes bypass the senescence response to STAT3 inactivation, we co-expressed PC, MDH1, and ME1 in IMR90 cells where STAT3 was depleted by shRNA. Strikingly, forced expression of HTC enzymes restored proliferation in cells depleted of STAT3 to the level observed in cells expressing a control non-targeting shRNA, while significantly reducing the percentage of SA- β -Gal positive cells (Figures 4A and 4B). Expression of HTC enzymes in STAT3-depleted cells reduced the expression of p53, p21, DNA damage response markers, and PML bodies while increasing the mitosis marker phospho-H3^{Ser10} and MCM6 (Figures 4C, S6A, and S6B). This was paralleled by restoration of the NAD⁺/NADH ratio, increased cellular NADPH levels, elevated GSH/GSSG ratio, and decreased ROS relative to the control (Figures 4D–4H and S6C–S6H). Consistent with these results, the generation of NADPH by ME1 and ME2 was previously linked to ROS detoxification (Jiang et al., 2013). Together, these data suggest that HTC enzymes lead to metabolic reprogramming in STAT3-depleted cells to restore NAD⁺ levels and increase NADPH, which is paralleled by the suppression of senescent phenotype.

To monitor the effects of HTC enzymes overexpression on senescent cells metabolism, we performed ¹³C₆-glucose tracing. ¹³C₆-glucose flux into (m+3) pyruvate or (m+3) lactate was comparable between the cell lines, but HTC enzymes overexpression significantly increased the conversion of pyruvate into OAA via PC as estimated from the (m+3)/(m+2) ratio of malate and

Figure 4. Expression of the hydride transfer complex enzymes bypasses senescence and promotes transformation

- (A) Relative proliferation of IMR90 expressing shSTAT3 (shS3[A] and shS3[B]) or control shRNA (shNTC) with co-expression of control vectors or the HTC enzymes MDH1, ME1, and PC. # indicates time point used for statistical test.
- (B–H) Analysis of cells as in (A).
- (B) SA- β -Gal staining: percent positive cells \pm SD is shown in lower corner; scale bar, 250 μ m.
- (C) WB for the indicated proteins.
- (D) NAD⁺/NADH ratio.
- (E) Total NADPH.
- (F) Ratio of GSH/GSSG. Individual levels of NAD, NADH, NADP, GSSG, and GSH can be found in Figure S6.
- (G and H) Heat maps of flow cytometry data measuring DCFDA (G) or MitoSOX (H). Data show relative change of median fluorescence intensity (MFI) over control cells. Each column represents a biological replicate with a minimum of 10,000 cells.
- (I) Scheme of metabolite ¹³C labeling patterns after incubation with ¹³C₆-glucose. Orange cycle is normal direction of tricarboxylic acid (TCA) giving (m+2) intermediates (orange-filled circles). Violet cycle represents the PC pathway giving (m+3) intermediates (violet-filled circles). HTC, hydride transfer complex; mito, mitochondria.
- (J and K) Ratio of (m+3)/(m+2) isotopomers for the indicated metabolites from IMR90 cells expressing a control shRNA with control vectors (shNTC), or expressing a shRNA against STAT3 with either control vectors (shS3[A]) or with vectors expressing HTC enzymes (shS3[A]/HTC). Conditions shNTC and shS3[A] are the same as in Figures 1K–1O.
- (L) Mean tumor volume from NRG mice after allograft injection of 1×10^6 MEFs into both flanks expressing either controls (Vectors), HTC enzymes (HTC), or RAS alone or with HTC overexpression (RAS + HTC). MEFs *p53*^{-/-} overexpressing RAS were used as a positive control (RAS + *p53*^{-/-}), n = 3–6. Data are shown until mice bearing tumors from RAS + *p53*^{-/-} MEFs were all sacrificed.
- (M) Survival of NRG mice as in (L), n = 3–6.
- (N) WB against indicated proteins from tumors shown in (L).
- (O) Images of all mice the day of sacrifice after injection of MEFs as in (L).
- (P) Immunohistochemistry with indicated antibodies on tumors from (L); scale, 100 μ m and zoom scale, 20 μ m.
- (Q) Representative H&E images of indicated aberrations in tumors from MEFs expressing RAS and HTC. The numbers represent the frequency of observations. All experiments other than indicated have been repeated a minimum of 3 times. Mean \pm SD for (A, B, and D–F). Mean \pm SEM for (L), red dots represent biological value of each replicate (D–F). Two-tailed Student's t test (A) or ANOVA (B and D–F) with Sidák's multiple comparisons test was performed and p value is indicated. Related to Figures S6–S8.



(legend on next page)

aspartate (Figures 4I–4K, S6I, and S6J). This interpretation was further validated by the absence of an increase in succinate (m+3) (Figure S6J), ruling out that (m+3) isotopomers are generated by multiple rounds of the TCA cycle from (m+2) acetyl-CoA. In turn, the levels of citrate (m+2) were reduced in cells expressing the HTC enzymes, which is consistent with a decrease in the contribution of pyruvate to acetyl-CoA, as compared with its utilization by PC (Figure S6J). Tracing using 3-¹³C-glucose confirmed an increase in m+1 metabolites in cells expressing HTC consistent with conversion of pyruvate into m+1 OAA and its derivatives (Figures S6K and S6L). Collectively, these findings suggest that pyruvate in HTC-overexpressing cells is preferentially converted to OAA via PC, which is subsequently used to replenish the TCA cycle and NAD⁺ regeneration via MDH1. Together, these results show that the metabolic program of HTC-overexpressing cells is comparable with that observed in p53-disabled cells.

To determine the contribution of NADPH production by HTC to reduce ROS and bypass senescence, we expressed ME1 in STAT3-depleted cells supplemented with malate. ME1/malate did not rescue these cells from senescence but was sufficient to decrease ROS levels (Figures S7A–S7D). In contrast, duroquinone prevented senescence after STAT3 depletion (Figure S7E), whereby ROS levels remain reduced upon combination of malate and duroquinone (Figures S7F and S7G). Finally, to determine whether the ability of HTC to form was important for the bypass of senescence, we took advantage of the PC residues 1–534 that do not interact with MDH1 or ME1 (Figures 2J and 2K). This PC fragment failed to bypass senescence in STAT3-depleted cells when combined with ME1 and MDH1 (Figures S7H–S7J). Together, these results show that HTC enzymes act in a complex that catalyzes NAD⁺ regeneration and NADPH production to reduce oxidative stress and bypass senescence.

HTC enzymes are essential to prevent senescence in transformed cells

OIS protects normal cells from oncogenic stress (Serrano et al., 1997). In murine embryonic fibroblasts (MEFs), expression of HTC enzymes in combination with oncogenic RAS prevented senescence allowing colony formation despite maintaining an intact p53 pathway (Figures S8A–S8D). Also, HTC cooperated with RAS to induce tumor formation in

mice (Figures 4L–4O and S8E–S8G). Hematoxylin and eosin staining of tumor sections in conjunction with immunohistochemistry using specific antibodies revealed that HTC- and RAS-induced tumors are similar to RAS-induced tumors in p53 null MEFs. This included abundant mitotic figures, increased nucleoli, more polynucleated cells and vascularisation (Figures 4P, 4Q, and S8H).

It was reported that MDH1 inactivation decreased the NAD⁺/NADH ratio leading to senescence (Lee et al., 2012). To determine whether other HTC enzymes also prevent senescence, we knocked down each HTC enzymes in IMR90 STAT3/p53-depleted cells. We found that reducing the expression of any HTC enzyme decreases the NAD⁺/NADH ratio inducing proliferation arrest and senescence (Figures 5A–5D). Knockdown of HTC enzymes also induced senescence (Figures 5E–5I and S8I–S8R) and significantly reduced proliferation in a clonogenic assay (Figure 5J) in PC-3 cells. Interestingly, cells using glucose as a carbon and energy source can use the LDH reaction to supply part of the NAD⁺ required for glycolysis. However, many tumor cells use lactate as a carbon source (Faubert et al., 2017; Pérttega-Gomes et al., 2014) and cannot use the LDH reaction to regenerate NAD⁺ (Figure 5K). Consistent with this idea, inactivation of HTC enzymes greatly suppressed proliferation of PC-3 cells grown on lactate (Figure 5L). Interestingly, LDH colocalizes with HTC in PC-3 cells grown on lactate (Figure 5M), a situation that facilitates NAD⁺ transfer from HTC to LDH. Together, these results indicate that HTC enzymes prevent senescence and contribute to malignant transformation.

HTC enzymes are highly expressed in prostate cancer

Inactivation of *Stat3* and *Pten* in the prostate leads to tumorigenesis in mice (Pencik et al., 2015). This suggested that elevated expression of HTC enzymes may allow prostate epithelial cells to override senescence caused by STAT3 ablation. Therefore, we measured HTC enzymes in prostate samples from 19-week-old wild-type (WT), *Stat3*^{-/-}, Phosphatase and tensin homolog (*Pten*^{-/-}), or *Stat3*^{-/-}*Pten*^{-/-} mice. Each of the three HTC enzymes was significantly upregulated in the *Stat3*^{-/-}*Pten*^{-/-} prostate tumors (Figures 6A–6G). Interestingly, in *Pten*^{-/-} tumors, the expression of the enzymes was also higher, but this was mostly confined to Ki67 positive cells, which likely already bypassed the senescence response to *Pten* abrogation (Figures

Figure 5. Inhibition of the HTC triggers senescence

(A) Mean NAD⁺/NADH ratio in IMR90 cells expressing shRNAs against STAT3 and p53 (shS3[A] shp53) and either a control shRNA (shNTC) or shRNAs against MDH1 (shMDH1[A]), ME1 (shME1[A]), or PC (shPC[A]).

(B–D) Analysis of cells as in (A).

(B) Relative proliferation, # indicates timepoint used for statistical test.

(C) SA-β-Gal staining; scale, 250 μm, and mean percentage ± SD of SA-β-gal positive cells.

(D) WB of indicated proteins.

(E–I), Inactivation of HTC by shRNAs against PC in PC3 cells. SA-β-Gal staining, scale, 100 μm (E); WB (F); normalized proliferation on shNTC cells with an image of a representative well (G); normalized NAD⁺/NADH ratio (H); and normalized NADP⁺/NADPH ratio (I) of PC-3 cells expressing either a control shRNA (shNTC) or shRNAs against PC: shPC[A] and shPC[B]. The shNTC control is the same as in Figures S8L–S8R.

(J) Images of clonogenic collagen assays on cells as in (E–I); scale, 200 μm.

(K) Schematic representation of NAD requirements for cells growing on lactate.

(L) PC-3 cells with indicated shRNA were grown on 5 mM Lactate and proliferation was normalized on proliferation of control shNTC cells.

(M) IF of PC-3 cells grown in 5 mM lactate showing triple colocalization indicated in white by white arrows of LDHA (blue), PC (green), and ME1 (red). Scale, 10 μm and zoom scale, 1 μm; representative image from 20 cells analyzed from same biological replicate.

All experiments are of 3 biological replicates. Significance was assessed with ANOVA with Dunnett's test. Related to Figure S8.

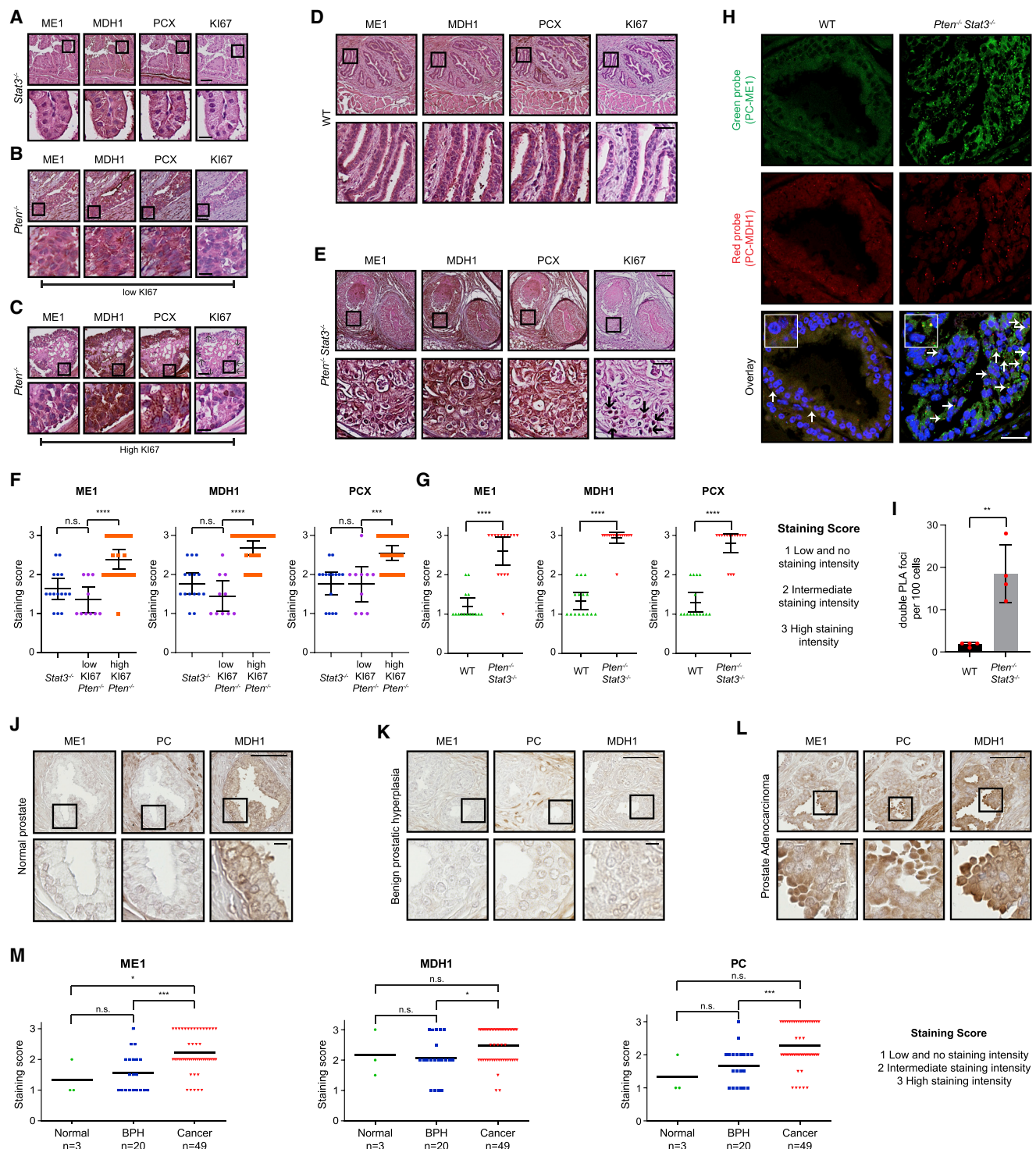


Figure 6. HTC enzymes are overexpressed in prostate cancer

(A–E) Immunohistochemistry (IHC) images detecting HTC enzymes (ME1, MDH1 and PCX) from mouse prostate samples. Samples are from animals with *Stat3*^{-/-} (A), *Pten*^{-/-} displaying areas of prostate tissue with low Ki67 staining (B), *Pten*^{-/-} displaying areas of prostate tissue with high Ki67 staining (C), wild type (WT) (D), or *Pten*^{-/-} *Stat3*^{-/-} (E). All images scale, 100 μ m; zoom scale, 20 μ m; n = 5–7 mice.

(F and G) Quantification of (A–C) (F) and quantification of (D and E) (G) according to the scoring key of levels of ME1, MDH1, and PCX from three regions per animal. Colored symbols represent different quantifications and mean, and 95% confidence interval is shown in black bars.

(legend continued on next page)

6B and 6C). PLA with PC and ME1 or PC and MDH1 antibodies confirmed colocalization of HTC enzymes in *Stat3*^{-/-} *Pten*^{-/-} tumors (Figures 6H and 6I). We also found high intensity staining for each of the HTC enzymes in more than 60% of human prostate adenocarcinomas, but low staining in normal prostates or prostates with benign prostatic hyperplasia (BPH) (Figure 6J–6M). Together, these results suggest that HTC enzymes play a pivotal role in prostate cancer.

HTC suppresses both OIS and replicative senescence in fibroblasts and rescues cells treated with complex I inhibitors

We previously reported mitochondrial dysfunction (Moiseeva et al., 2009) and STAT3 reduction (Deschênes-Simard et al., 2013) upon OIS. Overexpression of HTC enzymes counteracted RAS-induced senescence in IMR90 cells (Figures S9A and S9B). Of note, these effects required simultaneous overexpression of all three HTC enzymes (Figures S9A and S9B). Moreover, deleting the mitochondrial localization signal from PC did not alter its ability to bypass OIS in combination with MDH1 and ME1 (Figures S9C–S9F), nor the capacity to restore NAD⁺/NADH ratio (Figure S9G), which is consistent with an anti-senescence role for cytosolic PC. HTC also bypassed OIS in BJ fibroblasts more efficiently than in IMR90 (Figures S9H–S9J).

To investigate whether HTC can rescue cells that are already senescent, we induced OIS in MEFs using oncogenic RAS (Figures S10A–S10D). As expected, RAS-senescent cells are highly sensitive to the senolytic agent ABT-263 (Figure S10E). We infected the senescent cell population and control cells with lentiviral vectors expressing HTC. HTC was able to induce cell proliferation in RAS-senescent cells (Figure S10F). To investigate whether cells that proliferate were senescent and not a minor fraction of non-senescent cells in the population, we treated the cells with ABT-263 after infection. HTC-expressing RAS cells were more sensitive to ABT-263 than controls as evaluated 24 h after treatment, indicating that HTC is not immediately rescuing cells from senescence (Figure S10G). However, after seven days of recovery, RAS cells with HTC escaped from senescence (Figure S10H) while RAS cells with empty vectors remained senescent. Importantly, this escape from senescence was prevented when RAS-senescent cells were treated with ABT-263 (Figure S10H), indicating that HTC acts on senescent cells and not on a subpopulation of non-senescent cells. The expression of RAS and HTC enzymes was confirmed in cell extracts from individual clones that escaped senescence (Figure S10I). We did not succeed at promoting proliferation in cultures of RAS-senescent IMR90 after infection with lentiviral vectors expressing HTC, but we did induce proliferation in RAS-senescent BJ human fibroblasts after infection with the same vectors (Figures S10J–

S10N). This result is consistent with findings showing that inactivation of p53 and RB can reverse senescence in BJ but not in other strains of normal fibroblasts (Beauséjour et al., 2003).

Although in the context of oncogene expression HTC may favor malignant transformation this complex may play an adaptive role. For example, in normal human fibroblasts, expression of HTC enzymes increased the NAD⁺/NADH ratio and delayed replicative senescence (Figures 7A–7F). Also, HTC enzymes rescued proliferation inhibition by complex I inhibitor Piericidin A (Figure 7G), suggesting that HTC may contribute to homeostatic adaptation to mitochondrial dysfunction. This may occur during oxygen deprivation. Hypoxia decreases mitochondrial respiration and rewires metabolism to limit excessive ROS production, inhibiting pyruvate entry into mitochondria and increasing glycolysis (Kim et al., 2006). In such contexts, HTC may contribute to metabolic reprogramming by supplying NAD⁺ for glycolysis and NADPH to avoid excessive ROS-mediated toxicity. Consistent with this idea, treatment of normal human fibroblasts with the hypoxia mimetic CoCl₂ increased the fraction of PC localized to the cytosol where it can cooperate with MDH1 and ME1 in HTC (Figures 7H and 7I). Furthermore, incubation of IMR90 cells expressing oncogenic RAS in 1% oxygen led to an increase in HTC foci formation together with the induction of several hypoxia-regulated mRNAs compared with IMR90 RAS cells in normoxia (Figures 7J–7L). Hypoxia bypasses RAS-induced senescence (Kilic Eren and Tabor, 2014), but depletion of HTC enzymes blocked this effect (Figures 7M–7O). These results suggest that HTC may contribute to the senescence bypass observed in cells growing in hypoxic conditions (Parrinello et al., 2003).

DISCUSSION

We demonstrate that NAD metabolism alterations secondary to mitochondrial dysfunction can be compensated by a previously unrecognized metabolic cycle that transfers the hydride ion (H⁻) from NADH to NADP, regenerating NAD⁺, and supplying NADPH for anabolism and redox defenses. This metabolic cycle is catalyzed by an enzyme complex assembled by MDH1, ME1, and PC dubbed HTC. The net stoichiometry of the HTC cycle is: ATP + NADH + NADP⁺ → ADP + Pi + H⁺ + NAD⁺ + NADPH. Hence, HTC represents a carbon-saving strategy to regenerate NAD⁺ and produce NADPH at the expense of ATP. Interestingly, the reactions catalyzed by HTC seem to be confined in localized phase-separated cytosolic structures. Notwithstanding that MDH1, ME1, and PC co-immunoprecipitate from cells, it is likely that other proteins are also present in these structures. These foci may allow for a localized metabolic recycling of pyruvate, OAA, and malate without affecting the cellular pool of these

(H) Proximity ligation assay with green (ME1-PC) and red (MDH1-PC) PLA probes on mouse prostate samples with either WT genotype or double knockout of *Stat3* and *Pten*. In the overlay, the white arrows indicate double colocalization of PLA probes green and PLA probes red; scale, 25 μm.

(I) Quantification of PLA colocalization. 100 cells were counted and amount of double colocalization is shown; two-tailed t test to assess significance is indicated, n = 4 mice.

(J–L) IHC images of prostate tissue microarray with indicated antibodies. Images are serial images (prostate adenocarcinoma n = 49, normal n = 3, BPH n = 20); scale, 100 μm and zoom scale, 10 μm.

(M) Quantification of (J–L) according to scoring key of levels of ME1, MDH1, and PC from random prostate epithelial regions per sample. (A–E, H, and J–L) show representative images. Mann-Whitney statistical U test was performed to assess significance for (F–G and M).

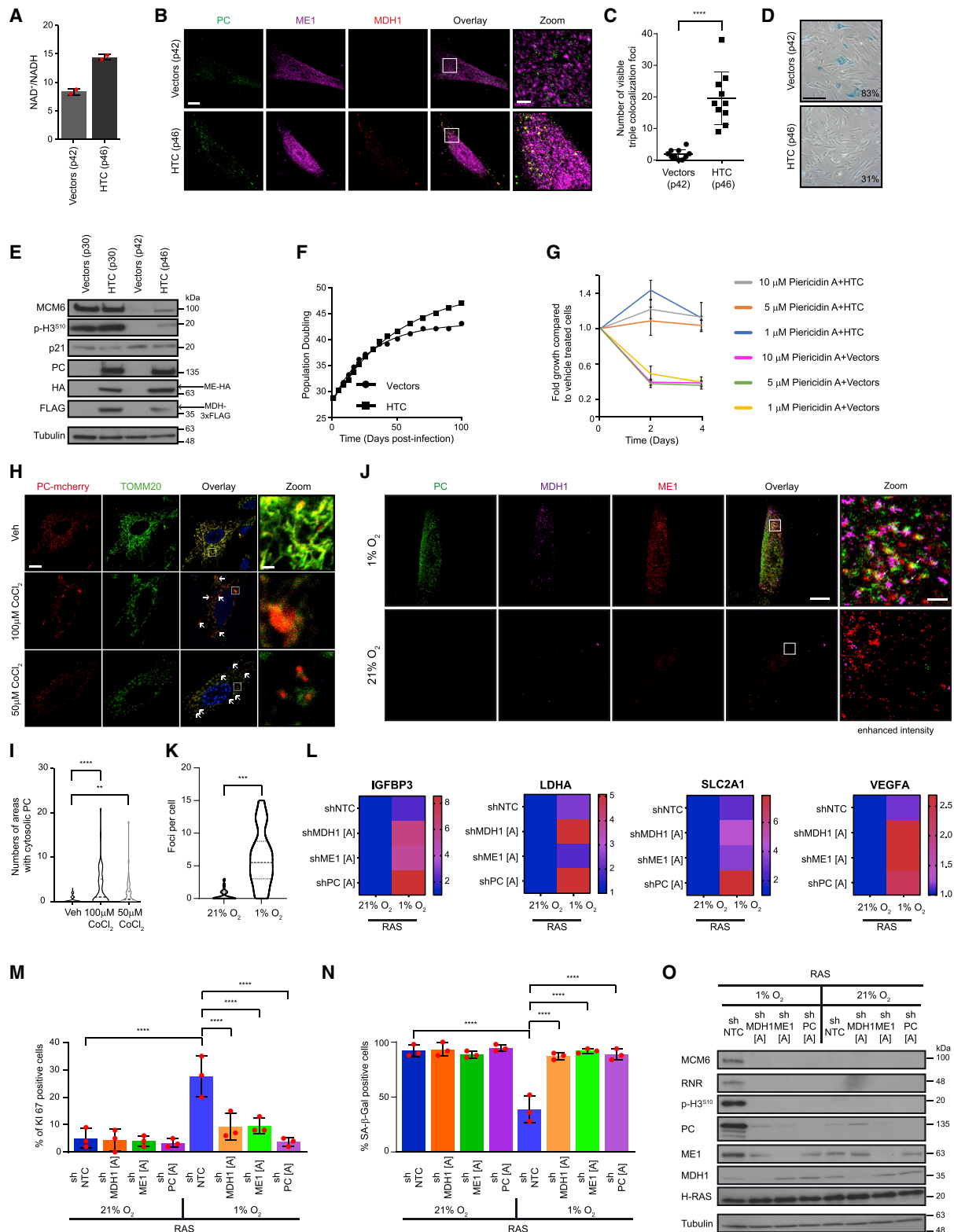


Figure 7. HTC enzymes extend lifespan of normal cells and prevent the action of mitochondrial poisons

(A) Mean NAD⁺/NADH ratio in IMR90 cells expressing HTC enzymes (MDH1-3xFLAG, ME1-HA, and PC) or control vectors and grown until replicative senescence for Vector cells (p42). Biological replicate measures are shown in red dots, error bars represent SD.

(legend continued on next page)

metabolites. In addition, the proximity of the active centers for each enzyme in the complex may accelerate metabolic flux by diffusion or the channeling of each substrate (Wheeldon et al., 2016).

Our data demonstrate that HTC plays a role in tumor formation by bypassing or promoting the escape from cellular senescence. Expression of HTC enzymes is sufficient to transform primary mouse fibroblasts in cooperation with oncogenic RAS and is therefore functionally equivalent to a loss of p53. Because HTC enzymes are repressed by p53, our work adds to evidence showing that controlling metabolism is a major tumor suppressor function of p53 (Moon et al., 2019; Morris et al., 2019). Of note, previous work showed that increasing antioxidant capacity by expressing G6PD can transform immortalized but non-tumorigenic fibroblasts (Zhang et al., 2021). HTC provides then two functions for transformation, immortalization dependent on NAD⁺ regeneration, and antioxidant activity dependent on NADPH generation. These functions are also important for the survival of cells in hypoxia or for cells growing in lactate that cannot use the LDH reaction to regenerate NAD⁺.

We show that the expression of HTC enzymes and their interaction is increased in samples from prostate cancer patients. PC is also highly expressed in metastatic breast cancer (Shinde et al., 2018), non-small cell lung cancer, glioblastoma, renal carcinoma, and gallbladder cancer (Lao-On et al., 2018). MDH1 is amplified in multiple human cancers (Hanse et al., 2017) and MDH1 but not MDH2 is required for cell proliferation of tumor cell lines (Zhang et al., 2017). Moreover, ME1 expression is associated with poor prognosis in gastric cancer (Lu et al., 2018). Finally, analysis of co-expression of HTC enzymes in Oncomine revealed positive correlations between HTC enzyme expression in several cancers including small squamous lung cancer and prostate cancer. Our results therefore suggest that targeting HTC may be exploited to develop anti-cancer treatments.

Limitations of the study

We identified a cytosolic pool of the mitochondrial enzyme PC, but the mechanisms responsible for PC localization to the cytosol upon p53 inactivation remain unknown. Even though, we were able to show evidence of HTC formation *in vitro*, the efficiency

of complex assembly is relatively low. This suggests that the recombinant proteins may lack post-translational modifications that help stabilize the HTC complex. We provide evidence that PC, MDH1, and ME1 are the core of the HTC complex, but we could not estimate their precise stoichiometry. Importantly, our data suggest that at least some HTC is contained in complexes larger than 1 MDa, suggesting the presence of additional components. While future work is warranted to answer above questions, our present findings enrich the notion that tumor cells hijack specific metabolic pathways that support proliferation and anabolic reactions while conferring protection to oxidative stress.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Mouse Model
 - Cell culture model
- METHODS DETAILS
 - Reagents
 - Plasmids
 - Proliferation analysis and Senescence associated β -galactosidase staining (SA- β -Gal).
 - Retroviral and Lentiviral infections
 - Pyruvate/Aspartate/Duroquinone/ Dimethylmalate/ and CoCl₂ supplementation
 - Cell culture with hypoxia
 - MitoTracker staining
 - Hexanediol treatment
 - Immunoblots and Immunoprecipitation
 - Protein purification
 - Native separation of multi-protein complexes
 - Avidin pull down
 - Assembly of ternary complex

(B) IF of cells as in (A) using antibodies for each HTC enzyme as indicated. Scale, 20 μ m; zoom scale, 2 μ m.

(C) Quantification of foci observed in (B). Number of foci was counted in 10 different cells, and statistics were done using a two-tailed t test.

(D) SA- β -Gal staining on cells as in (A); percent of positive cells is indicated at the bottom right; scale, 250 μ m.

(E) WB for the indicated proteins in early or late passage cells expressing HTC or an empty vector, n = 2 for (A, B, D, and E).

(F) Population doubling of cells as in (A). A trendline was added with the linear regression function of Graph Pad, image represents one biological replicate.

(G) Relative fold proliferation of cells expressing HTC enzymes (MDH1, ME1, and PC) or control vectors, treated with indicated concentrations of Piericidin A. Data are normalized to the growth of vehicle-treated cells and show a representative image of n = 3.

(H) IF of IMR90 cells expressing PC-cherry treated with indicated amounts of CoCl₂. An anti-TOMM20 (green) antibody was used to reveal mitochondria, n = 2; scale, 10 μ m, zoom, 1 μ m.

(I) Quantification of PC-cherry signal outside of mitochondria from cells as in (H). A minimum of 25 cells were counted per slide. The violin plot represents the amount of PC-cherry signal outside of mitochondria of two independent immunofluorescent slides. A two-tailed t test was performed.

(J) IF of IMR90 cells expressing RAS cultured in 21% oxygen or 1% oxygen using antibodies for each HTC enzyme as indicated. Scale, 20 μ m; zoom scale, 2 μ m.

(K) Quantification of HTC foci in cells as in (J). Dashed lines represent median and quartiles. A two-tailed t test was performed.

(L) Heat maps of relative mRNA levels for indicated genes of IMR90 infected with RAS and shRNAs against MDH1, ME1, or PC or control vector (shNTC) followed by either incubation of cells in 21% oxygen or 1% oxygen, n = 2–3.

(M and N) Percent of KI67 positive cells (M) and SA- β -Gal positive cells (N) in cells as (L). Red dots represent biological value of each replicate. Statistical analysis was done with ANOVA with Dunnett's test.

(O) WB for the indicated proteins in cells as in (L).

- SEC-MALS
- Immunofluorescence
- Immunohistochemistry
- STAT3-ATAD3A Proximity ligation assay (PLA)
- PC-MDH1 and PC-ME1 Proximity ligation assay (PLA)
- Electron microscopy and colloidal gold immunocytochemistry
- NAD⁺/NADH, NADP⁺/NADPH and glutathione measurements
- qPCR
- MitoSox and DCFDA measurements
- Mitochondrial purification
- Animals
- Stable Isotope Tracer Analysis
- Bioenergetic Analyses
- Nucleotide and nucleoside analysis
- Bioinformatic analysis
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**
- **ADDITIONAL RESOURCES**

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.028>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Ali, D. Avizonis, M. Birlea, N. Chandel, P. Chartrand, L. Choinière, N. Cyr, L. G. Dadwhal, P. Dagenais, DesGroseillers, D. Gagné, A. Gosselin, J. Hingsinger, P. Legault, S.W. Lowe, S. Meloche, H. Neubauer, J. Pascal, S. Roy, A. Salvail-Lacoste, N. Stifani, L. Tong, S. Truche, D. Trudel, and M. Vasseur for reagents, comments, and/or technical help. Metabolic analysis was performed at The Rosalind and Morris Goodman Cancer Research Centre's Metabolomics Core Facility. Immunohistochemistry was performed at the IRIC's Histology Core Facility or the Molecular Pathology platform of CR-CHUM. We thank the Platform of microscopy of the Biochemistry and Molecular Medicine Department and the electron microscopy platform of the University of Montreal. A detailed list can be found on Mendeley as well as detailed author contributions. Work was supported by grants from CIHR (MOP11151 and PJT-153217) and CCSRI Innovation 706773 to G.F., CIHR MOP130414 to J.G.O., and TFF Oncometabolism Team Grant 239585 to I.T. and M.P. G.F. is supported by the CIBC chair for breast cancer research. S.I. was supported by NSERC CREATE Trainee program and ICM (Institut du cancer de Montréal) Canderel fellowship. F.L. was supported by FRQS (Fonds de Recherche du Québec-Santé). D.P. is supported by a CIHR Postdoctoral Fellowship (MFE-171312). O.U. was supported from FRQS. J.P. was supported by Max Kade fellowship from the Austrian Academy of Sciences. I.T. is supported by FRQS Senior award. L.H. is supported by FRQS Junior 1 award. A.N. is supported by the Canadian Institutes of Health Research grant (CIHR MOP-110972) and is recipient of a Canada Research Chair in Calcified tissues, Biomaterials and Structural Imaging. E.T. acknowledges funding from CIHR (MOP-133726). L.K. was supported by the COMET Competence Center CBmed-Center for Biomarker Research in Medicine (FA791A0906.FFG). The COMET Competence Center CBmed is funded by the Austrian Federal Ministry for Transport, Innovation and Technology (BMVIT); the Austrian Federal Ministry for Digital and Economic Affairs (BMDW); Land Steiermark (Department 12, Business and Innovation); the Styrian Business Promotion Agency (SFG); and the Vienna Business Agency. The COMET program is executed by the FFG. L.K. was in addition funded by the FWF grant P26011 and the Christian Doppler Laboratory for Applied Metabolomics. The financial support by the Austrian Federal Ministry for Transport, Innovation and Technology and the National Foundation for Research, Technology and Development is gratefully acknowledged. R.M. was supported by grants SFB-F4707, SFB-F06107 and EU Transcan-2 consortium ERANET-PLL, all funded via the Austrian Science Funds.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, S.I. and G.F.; validation, F.L., J.B., A.F., G.H., H.M.W., and V.B.; methodology, J.Q., J.G., L.H., A.F., H.M.W., and J.P.; formal analysis, S.I.; investigation, S.I., F.L., O.U., A.F.-R., J.B., M.-C.R., S.L.-P., J.Q., D.P., A.F., K.J.P., G.H., L.M., M.B., V.B., and L.H.; resources, E.G., L.K., R.M., A.N., J.G.O., I.T., and G.F.; data curation, S.I., O.U., and G.F.; writing – original draft, S.I. and G.F.; writing – review & editing, all authors; visualization, S.I., M.L., P.K., and V.B.; supervision, V.B., A.N., M.N.P., J.G.O., I.T., and G.F.; project administration, V.B. and G.F.; funding acquisition, E.G., R.M., A.N., M.N.P., J.G.O., I.T., and G.F.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

INCLUSION AND DIVERSITY

One or more of the authors of this paper self-identifies as an underrepresented ethnic minority in science.

Received: December 14, 2020

Revised: June 25, 2021

Accepted: August 20, 2021

Published: September 16, 2021

SUPPORTING CITATIONS

The following references appear in the supplemental information: Asher et al. (2005); Birts et al. (2020); Chabes et al. (2004).

REFERENCES

- Asher, G., Tsvetkov, P., Kahana, C., and Shaul, Y. (2005). A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev.* *19*, 316–321.
- Audet-Walsh, É., Papadopoli, D.J., Gravel, S.P., Yee, T., Bridon, G., Caron, M., Bourque, G., Giguère, V., and St-Pierre, J. (2016). The PGC-1 α /ERR α Axis Represses One-Carbon Metabolism and Promotes Sensitivity to Anti-folate Therapy in Breast Cancer. *Cell Rep.* *14*, 920–931.
- Beauséjour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* *22*, 4212–4222.
- Birsoy, K., Possemato, R., Lorbeer, F.K., Bayraktar, E.C., Thiru, P., Yucel, B., Wang, T., Chen, W.W., Clish, C.B., and Sabatini, D.M. (2014). Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature* *508*, 108–112.
- Birsoy, K., Wang, T., Chen, W.W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., and Sabatini, D.M. (2015). An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell* *162*, 540–551.
- Birts, C.N., Banerjee, A., Darley, M., Dunlop, C.R., Nelson, S., Nijjar, S.K., Parker, R., West, J., Tavassoli, A., Rose-Zerilli, M.J.J., and Blaydes, J.P. (2020). p53 is regulated by aerobic glycolysis in cancer cells by the CtBP family of NADH-dependent transcriptional regulators. *Sci. Signal.* *13*, eaau9529.
- Buescher, J.M., Antoniewicz, M.R., Boros, L.G., Burgess, S.C., Brunengraber, H., Clish, C.B., DeBerardinis, R.J., Feron, O., Frezza, C., Ghesquiere, B., et al. (2015). A roadmap for interpreting (13)C metabolite labeling patterns from cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* *34*, 189–201.
- Camacho-Carvajal, M.M., Wollscheid, B., Aebersold, R., Steimle, V., and Schamel, W.W. (2004). Two-dimensional Blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates: a proteomics approach. *Mol. Cell. Proteomics* *3*, 176–182.
- Cao, Z., Zhou, Y., Zhu, S., Feng, J., Chen, X., Liu, S., Peng, N., Yang, X., Xu, G., and Zhu, Y. (2016). Pyruvate Carboxylase Activates the RIG-I-like Receptor-

- Mediated Antiviral Immune Response by Targeting the MAVS signalosome. *Sci. Rep.* 6, 22002.
- Carbognin, E., Betto, R.M., Soriano, M.E., Smith, A.G., and Martello, G. (2016). Stat3 promotes mitochondrial transcription and oxidative respiration during maintenance and induction of naive pluripotency. *EMBO J.* 35, 618–634.
- Chabes, A.L., Björklund, S., and Thelander, L. (2004). S Phase-specific transcription of the mouse ribonucleotide reductase R2 gene requires both a proximal repressive E2F-binding site and an upstream promoter activating region. *J. Biol. Chem.* 279, 10796–10807.
- Chen, W.W., Freinkman, E., and Sabatini, D.M. (2017). Rapid immunopurification of mitochondria for metabolite profiling and absolute quantification of matrix metabolites. *Nat. Protoc.* 12, 2215–2231.
- Cheng, T., Sudderth, J., Yang, C., Mullen, A.R., Jin, E.S., Matés, J.M., and DeBerardinis, R.J. (2011). Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 8674–8679.
- Consortium, E.P.; ENCODE Project Consortium (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57–74.
- Davis, C.A., Hitz, B.C., Sloan, C.A., Chan, E.T., Davidson, J.M., Gabdank, I., Hilton, J.A., Jain, K., Baymuradov, U.K., Narayanan, A.K., et al. (2018). The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update. *Nucleic Acids Res.* 46 (D1), D794–D801.
- Deschênes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M.F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., Igelmann, S., Mallette, F.A., Saba-El-Leil, M.K., Meloche, S., et al. (2013). Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev.* 27, 900–915.
- Deschênes-Simard, X., Lessard, F., Gaumont-Leclerc, M.F., Bardeesy, N., and Ferbeyre, G. (2014). Cellular senescence and protein degradation: Breaking down cancer. *Cell cycle* 13, 1840–1858.
- Deschênes-Simard, X., Parisotto, M., Rowell, M.C., Le Calvé, B., Igelmann, S., Moineau-Vallée, K., Saint-Germain, E., Kalegari, P., Bourdeau, V., Kottakis, F., et al. (2019). Circumventing senescence is associated with stem cell properties and metformin sensitivity. *Aging Cell* 18, e12889.
- Dörr, J.R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J.H., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., et al. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* 501, 421–425.
- Faubert, B., Li, K.Y., Cai, L., Hensley, C.T., Kim, J., Zacharias, L.G., Yang, C., Do, Q.N., Doucette, S., Burguete, D., et al. (2017). Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell* 171, 358–371.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S.W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.* 14, 2015–2027.
- Fishilevich, S., Nudel, R., Rappaport, N., Hadar, R., Plaschkes, I., Iny Stein, T., Rosen, N., Kohn, A., Twik, M., Safran, M., et al. (2017). GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database (Oxford)* 2017, bax028.
- Fouillen, A., Dos Santos Neves, J., Mary, C., Castonguay, J.D., Moffatt, P., Baron, C., and Nanci, A. (2017). Interactions of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 proteins of a specialized basal lamina that attaches epithelial cells to tooth mineral. *Sci. Rep.* 7, 46683.
- Ghandi, M., Huang, F.W., Jané-Valbuena, J., Kryukov, G.V., Lo, C.C., McDonald, E.R., 3rd, Barretina, J., Gelfand, E.T., Bielski, C.M., Li, H., et al. (2019). Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* 569, 503–508.
- Gillies, R.J., Didier, N., and Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal. Biochem.* 159, 109–113.
- Gough, D.J., Corlett, A., Schlessinger, K., Wegrzyn, J., Larner, A.C., and Levy, D.E. (2009). Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* 324, 1713–1716.
- Gravel, S.P., Avizonis, D., and St-Pierre, J. (2016). Metabolomics Analyses of Cancer Cells in Controlled Microenvironments. *Methods Mol. Biol.* 1458, 273–290.
- Gui, D.Y., Sullivan, L.B., Luengo, A., Hosios, A.M., Bush, L.N., Gitego, N., Davidson, S.M., Freinkman, E., Thomas, C.J., and Vander Heiden, M.G. (2016). Environment Dictates Dependence on Mitochondrial Complex I for NAD⁺ and Aspartate Production and Determines Cancer Cell Sensitivity to Metformin. *Cell Metab.* 24, 716–727.
- Hanse, E.A., Ruan, C., Kachman, M., Wang, D., Lowman, X.H., and Kelekar, A. (2017). Cytosolic malate dehydrogenase activity helps support glycolysis in actively proliferating cells and cancer. *Oncogene* 36, 3915–3924.
- Huet, C., Menendez, J., Gancedo, C., and François, J.M. (2000). Regulation of pyc1 encoding pyruvate carboxylase isozyme I by nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 267, 6817–6823.
- Jiang, P., Du, W., Mancuso, A., Wellen, K.E., and Yang, X. (2013). Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature* 493, 689–693.
- Kidder, B.L., Yang, J., and Palmer, S. (2008). Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells. *PLoS ONE* 3, e3932.
- Kilic Eren, M., and Tabor, V. (2014). The role of hypoxia inducible factor-1 alpha in bypassing oncogene-induced senescence. *PLoS ONE* 9, e101064.
- Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177–185.
- Krall, A.S., Mullen, P.J., Surjono, F., Momcilovic, M., Schmid, E.W., Halbrook, C.J., Thambundit, A., Mittelman, S.D., Lyssiotis, C.A., Shackelford, D.B., et al. (2021). Asparagine couples mitochondrial respiration to ATF4 activity and tumor growth. *Cell Metab.* 33, 1013–1026.
- Lao-On, U., Attwood, P.V., and Jitrapakdee, S. (2018). Roles of pyruvate carboxylase in human diseases: from diabetes to cancers and infection. *J. Mol. Med. (Berl.)* 96, 237–247.
- Lee, S.M., Dho, S.H., Ju, S.K., Maeng, J.S., Kim, J.Y., and Kwon, K.S. (2012). Cytosolic malate dehydrogenase regulates senescence in human fibroblasts. *Biogerontology* 13, 525–536.
- Lessard, F., Igelmann, S., Trahan, C., Huot, G., Saint-Germain, E., Mignacca, L., Del Toro, N., Lopes-Paciencia, S., Le Calvé, B., Montero, M., et al. (2018). Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway. *Nat. Cell Biol.* 20, 789–799.
- Li, X., Cheng, K.K.Y., Liu, Z., Yang, J.K., Wang, B., Jiang, X., Zhou, Y., Hallenborg, P., Hoo, R.L.C., Lam, K.S.L., et al. (2016). The MDM2-p53-pyruvate carboxylase signalling axis couples mitochondrial metabolism to glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells. *Nat. Commun.* 7, 11740.
- Lu, Y.X., Ju, H.Q., Liu, Z.X., Chen, D.L., Wang, Y., Zhao, Q., Wu, Q.N., Zeng, Z.L., Qiu, H.B., Hu, P.S., et al. (2018). ME1 Regulates NADPH Homeostasis to Promote Gastric Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Res.* 78, 1972–1985.
- Macias, E., Rao, D., Carbajal, S., Kiguchi, K., and DiGiovanni, J. (2014). Stat3 binds to mtDNA and regulates mitochondrial gene expression in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 134, 1971–1980.
- Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F., and Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* 21, 43–48.
- Mantel, C., Messina-Graham, S., Moh, A., Cooper, S., Hangoc, G., Fu, X.Y., and Broxmeyer, H.E. (2012). Mouse hematopoietic cell-targeted STAT3 deletion: stem/progenitor cell defects, mitochondrial dysfunction, ROS overproduction, and a rapid aging-like phenotype. *Blood* 120, 2589–2599.
- Masclé, X.H., Gagnon, C., Wahba, H.M., Lussier-Price, M., Cappadocia, L., Sakaguchi, K., and Omichinski, J.G. (2020). Acetylation of SUMO1 Alters Interactions with the SIMs of PML and Daxx in a Protein-Specific Manner. *Structure* 28, 157–168.
- McBride, H.M., Goping, I.S., and Shore, G.C. (1996). The human mitochondrial import receptor, hTom20p, prevents a cryptic matrix targeting sequence from gaining access to the protein translocation machinery. *J. Cell Biol.* 134, 307–313.
- McGuirk, S., Gravel, S.P., Deblois, G., Papadopoli, D.J., Faubert, B., Wegner, A., Hiller, K., Avizonis, D., Akavia, U.D., Jones, R.G., et al. (2013). PGC-1 α

supports glutamine metabolism in breast cancer. *Cancer Metab.* **7**. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-1-22>.

Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschênes-Simard, X., and Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4495–4507.

Moiseeva, O., Bourdeau, V., Vernier, M., Dabauvalle, M.C., and Ferbeyre, G. (2011). Retinoblastoma-independent regulation of cell proliferation and senescence by the p53-p21 axis in lamin A /C-depleted cells. *Aging Cell* **10**, 789–797.

Moiseeva, O., Guillon, J., and Ferbeyre, G. (2020). Senescence: A program in the road to cell elimination and cancer. In *Seminars in cancer biology* (Academic Press).

Moon, S.H., Huang, C.H., Houlihan, S.L., Regunath, K., Freed-Pastor, W.A., Morris, J.P.t., Tschaharganeh, D.F., Kastenhuber, E.R., Barsotti, A.M., Culp-Hill, R., et al. (2019). p53 Represses the Mevalonate Pathway to Mediate Tumor Suppression. *Cell* **176**, 564–580.

Morris, J.P., 4th, Yashinski, J.J., Koche, R., Chandwani, R., Tian, S., Chen, C.C., Baslan, T., Marinkovic, Z.S., Sánchez-Rivera, F.J., Leach, S.D., et al. (2019). α -Ketoglutarate links p53 to cell fate during tumour suppression. *Nature* **573**, 595–599.

Nagaraj, R., Sharpley, M.S., Chi, F., Braas, D., Zhou, Y., Kim, R., Clark, A.T., and Banerjee, U. (2017). Nuclear Localization of Mitochondrial TCA Cycle Enzymes as a Critical Step in Mammalian Zygotic Genome Activation. *Cell* **168**, 210–223.

Nguyen, T.T., Grimm, S.A., Bushel, P.R., Li, J., Li, Y., Bennett, B.D., Lavender, C.A., Ward, J.M., Fargo, D.C., Anderson, C.W., et al. (2018). Revealing a human p53 universe. *Nucleic Acids Res.* **46**, 8153–8167.

Oki, S., Ohta, T., Shioi, G., Hatanaka, H., Ogasawara, O., Okuda, Y., Kawaji, H., Nakaki, R., Sese, J., and Meno, C. (2018). ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public ChIP-seq data. *EMBO Rep.* **19**, e46255.

Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **5**, 741–747.

Passos, J.F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M.J., Harold, G., Schaeuble, K., et al. (2007). Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol.* **5**, e110.

Pencik, J., Schleder, M., Gruber, W., Unger, C., Walker, S.M., Chalaris, A., Marié, I.J., Hassler, M.R., Javaheri, T., Aksoy, O., et al. (2015). STAT3 regulated ARF expression suppresses prostate cancer metastasis. *Nat. Commun.* **6**, 7736.

Pértega-Gomes, N., Vizcaino, J.R., Attig, J., Jurmeister, S., Lopes, C., and Baltazar, F. (2014). A lactate shuttle system between tumour and stromal cells is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer* **14**, 352.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602.

Shinde, A., Wilmanski, T., Chen, H., Teegarden, D., and Wendt, M.K. (2018). Pyruvate carboxylase supports the pulmonary tropism of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* **20**, 76.

Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T.I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., et al. (2016). The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics* **54**, 1.30.1–1.30.33.

Stewart, S.A., Dykxhoorn, D.M., Palliser, D., Mizuno, H., Yu, E.Y., An, D.S., Sabatini, D.M., Chen, I.S.Y., Hahn, W.C., Sharp, P.A., et al. (2003). Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* **9**, 493–501.

Sullivan, L.B., Gui, D.Y., Hosios, A.M., Bush, L.N., Freinkman, E., and Vander Heiden, M.G. (2015). Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell* **162**, 552–563.

Tao, X., Yang, Z., and Tong, L. (2003). Crystal structures of substrate complexes of malic enzyme and insights into the catalytic mechanism. *Structure* **11**, 1141–1150.

Titov, D.V., Cracan, V., Goodman, R.P., Peng, J., Grabarek, Z., and Mootha, V.K. (2016). Complementation of mitochondrial electron transport chain by manipulation of the NAD⁺/NADH ratio. *Science* **352**, 231–235.

Tkach, M., Coria, L., Rosembli, C., Rivas, M.A., Proietti, C.J., Díaz Flaqué, M.C., Beguelin, W., Frahm, I., Charreau, E.H., Cassataro, J., et al. (2012). Targeting Stat3 induces senescence in tumor cells and elicits prophylactic and therapeutic immune responses against breast cancer growth mediated by NK cells and CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* **189**, 1162–1172.

Vallania, F., Schiavone, D., Dewilde, S., Pupo, E., Garbay, S., Calogero, R., Pontoglio, M., Provero, P., and Poli, V. (2009). Genome-wide discovery of functional transcription factor binding sites by comparative genomics: the case of Stat3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 5117–5122.

Voorhoeve, P.M., and Agami, R. (2003). The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* **4**, 311–319.

Wegrzyn, J., Potla, R., Chwae, Y.J., Sepuri, N.B., Zhang, Q., Koeck, T., Derecka, M., Szczepanek, K., Szelag, M., Gornicka, A., et al. (2009). Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* **323**, 793–797.

Wheeldon, I., Minter, S.D., Banta, S., Barton, S.C., Atanassov, P., and Sigman, M. (2016). Substrate channelling as an approach to cascade reactions. *Nat. Chem.* **8**, 299–309.

Wiley, C.D., and Campisi, J. (2016). From Ancient Pathways to Aging Cells—Connecting Metabolism and Cellular Senescence. *Cell Metab.* **23**, 1013–1021.

Wiley, C.D., Velarde, M.C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E.A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H.W., Davis, S.S., Ramanathan, A., et al. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab.* **23**, 303–314.

Xiang, S., and Tong, L. (2008). Crystal structures of human and *Staphylococcus aureus* pyruvate carboxylase and molecular insights into the carboxyltransfer reaction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 295–302.

Yu, Y., Schleich, K., Yue, B., Ji, S., Lohneis, P., Kemper, K., Silvius, M.R., Qutob, N., van Rooijen, E., Werner-Klein, M., et al. (2018). Targeting the Senescence-Overriding Cooperative Activity of Structurally Unrelated H3K9 Demethylases in Melanoma. *Cancer Cell* **33**, 322–336.

Yuan, R., Liu, Q., Segeren, H.A., Yuniati, L., Guardavaccaro, D., Lebbink, R.J., Westendorp, B., and de Bruin, A. (2019). Cyclin F-dependent degradation of E2F7 is critical for DNA repair and G2-phase progression. *EMBO J.* **38**, e101430.

Zhang, B., Tornmalm, J., Widengren, J., Vakifahmetoglu-Norberg, H., and Norberg, E. (2017). Characterization of the Role of the Malate Dehydrogenases to Lung Tumor Cell Survival. *J. Cancer* **8**, 2088–2096.

Zhang, Y., Xu, Y., Lu, W., Ghergurovich, J.M., Guo, L., Blair, I.A., Rabinowitz, J.D., and Yang, X. (2021). Upregulation of Antioxidant Capacity and Nucleotide Precursor Availability Suffices for Oncogenic Transformation. *Cell Metab.* **33**, 94–109.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
anti-PC mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc 365673; RRID:AB_10842023
anti-ME1 rabbit polyclonal	GeneTex	Cat# GTX104122; RRID:AB_1950905
anti p53 mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc98; RRID:AB_628085
anti-KI67 rabbit monoclonal	Thermo Fisher Scientific	Cat# RM9106; RRID:AB_2335745
anti-53BP1 rabbit polyclonal	Calbiochem	Cat# PC712; RRID:AB_564982
anti-phospho- γ -H2A.X ^{S139} mouse monoclonal	Millipore	Cat# 05-636-I; RRID:AB_2755003
anti-PML rabbit polyclonal	Bethyl Laboratories	Cat# A301-167A; RRID:AB_873108
anti-TOMM20 rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	Cat# FL-145; RRID:AB_2207533
anti-FLAG rabbit monoclonal	Cell Signaling	Cat# 14793; RRID:AB_2572291
anti-MYC tag mouse monoclonal	Sigma-Aldrich	Cat# M4439; RRID:AB_439694
donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 405	Abcam	Cat# ab175658; RRID:AB_2687445
donkey anti-rabbit IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 488	Life Technologies/ Molecular Probes/ Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat# A21206; RRID:AB_2535792
donkey anti mouse IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 488	Life Technologies/ Molecular Probes/ Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat# A21202; RRID:AB_141607
goat anti-mouse IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 488	Life Technologies/ Molecular Probes/ Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat# A11029; RRID:AB_138404
donkey anti-goat IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 488	Life Technologies/ Molecular Probes/ Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat# A11055; RRID:AB_2534102
goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 488	Life Technologies/ Molecular Probes/ Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat# A11008; RRID:AB_143165
goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 568	Life Technologies/ Molecular Probes/ Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat# A11036; RRID:AB_10563566
goat anti-mouse IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 568	Life Technologies/ Molecular Probes/ Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat# A11031; RRID:AB_144696
donkey anti-rabbit IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 568	Life Technologies/ Molecular Probes/ Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat# A10042; RRID:AB_2534017
donkey anti-goat IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 647	Life Technologies/ Molecular Probes/ Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat# A21447; RRID:AB_141844
donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 647	Life Technologies/ Molecular Probes/ Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat# A31571; RRID:AB_162542
donkey anti-rabbit IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 647	Life Technologies/ Molecular Probes/ Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat# A31573; RRID:AB_2536183
normal rabbit IgG	Cell Signaling	Cat# 2729S; RRID:AB_1031062
anti-HA mouse monoclonal magnetic beads	Pierce /ThermoFisher	Cat# 88836; RRID:AB_2749815
anti-FLAG mouse monoclonal Affinity Gel	Sigma-Aldrich	Cat# A2220-5ML; RRID:AB_10063035
Dynabeads® Protein G	Invitrogen/ThermoFisher Scientific	Cat# 100.04D; RRID:SCR_008452
Dynabeads® Protein A	Invitrogen/ThermoFisher Scientific	Cat# 10002D; RRID:SCR_008452
anti-H-RAS mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	Cat# Sc-29; RRID:AB_627750
anti-p21 mouse monoclonal	BD PharMingen	Cat# 556431; RRID:AB_396415
anti-phospho-H3S10 rabbit polyclonal	Millipore	Cat# 06-570; RRID:AB_310177
anti-PC goat polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc46228; RRID:AB_653879
anti-mt-nd1 rabbit polyclonal	Elabscience	Cat# E-AB-32173

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
anti-mt-nd4 rabbit polyclonal	Novus Biologicals	Cat# NBP2-47365
anti-MCM6 rabbit polyclonal	Bethyl Laboratories	Cat# A300-194A; RRID:AB_162727
anti-p53 mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	Cat# Sc-126; RRID:AB_628082
anti-phospho-p53 ^{S15} rabbit polyclonal	Cell Signaling	Cat# 9284; RRID:AB_331464
anti-FLAG mouse monoclonal	Sigma-Aldrich	Cat# F1804; RRID:AB_262044
anti-MYC tag rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-789; RRID:AB_631274
anti-H3 rabbit polyclonal	Abcam	Cat# ab1791; RRID:AB_302613
anti-RNR mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-398294
anti- α -Tubulin mouse monoclonal	Sigma-Aldrich	Cat# T6074; RRID:AB_477582
anti-phospho-RBS ⁷⁹⁵ rabbit polyclonal	Cell Signaling	Cat# 9301; RRID:AB_330013
anti-RB mouse monoclonal	BD PharMingen	Cat# 554136 ; RRID:AB_395259
anti-HA tag goat polyclonal	Abcam	Cat# ab9134; RRID:AB_307035
anti-HA tag rabbit polyclonal	Cell Signaling	Cat# 3724 RRID:AB_1549585
anti-HA tag 12CA5 mouse monoclonal	University of Montreal Department of Biochemistry	n/a
anti-MDH1 mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc 166880; RRID:AB_10609512
Protein A- Gold 10 nm	Cell Microscopy Core, Department of Cell Biology University Medical Center Utrecht	Cat# PAG 10 nm
goat anti-rabbit IgG (H-L) conjugated to HRP	Bio-Rad	Cat# 170-6515 RRID:AB_11125142
goat anti-mouse IgG (H-L) conjugated to HRP	Bio-Rad	Cat# 170-6516 RRID:AB_11125547
mouse anti-goat IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-2354; RRID:AB_628490
donkey anti-goat IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc 2020; RRID:AB_631728
mouse anti-rabbit IgG conformation specific HRP L27A9	Cell Signaling	Cat# #3678; RRID:AB_1549606
Rat mAB to Ms IgG HRP confirmation specific	Abcam	Cat# ab131368
anti-KI67 mouse monoclonal	DAKO	RRID:AB_2631211
anti-LDH mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-133123; RRID:AB_2134964
anti-ATAD3A rabbit polyclonal	Novus Biologicals	Cat# NBP1-76586; RRID:AB_11025339
anti-PC rabbit polyclonal	Novus Biologicals	Cat# NBP1-49536; RRID:AB_10011589
anti-MDH1 rabbit polyclonal	Novus Biologicals	Cat# NBP1-89515; RRID:AB_11036600

Biological samples

Tissue Micro Array (TMA) of prostate cancer samples	US Biomax Rockville, MD	Cat# PR807c
---	-------------------------	-------------

Chemicals, peptides, and recombinant proteins

MDH1 recombinant protein	This study	N/A
PC 486-1178 recombinant protein	This study	N/A
PC 21 – 1178 recombinant protein	This study	N/A
ME1 recombinant protein	This study	N/A
Crystal Violet	Bioshop	Cat # CRY 422.100
X-Gal	Wisent Bioproducts	Cat # 800-145-UG
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich	Cat # P8574
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific	Cat # D1306
Duroquinone	Sigma-Aldrich	Cat # D223204
L-Aspartic acid	Sigma-Aldrich	Cat # A6683
Methanol for LC-MS	Sigma-Aldrich	Cat # 34885-1L

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
1,6-Hexanediol	Sigma-Aldrich	Cat # 240117
NAD free acid	Roche	Cat # 10127965001
NADH disodium salt	Roche	Cat # 10128023001
NADP disodium salt	Roche	Cat # 10128058001
NADPH	Roche	Cat # 10107824001
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate(ATP)	Sigma-Aldrich	Cat # 3377
MG132 (Z-Leu-Leu-al)	Sigma-Aldrich	Cat # C2211
Piericidin A	Santa Cruz Biotechnology	Cat # sc-202287
Potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate	Sigma-Aldrich	Cat # P3289
Potassium ferricyanide(III)	Sigma-Aldrich	Cat # 702587
Poly(ethylene glycol)	Sigma-Aldrich	Cat # 81310
PhosStop	Roche	Cat # 04906837001
cOmplete protease inhibitor	Roche	Cat # 37378900
Sodium L-lactate	Sigma-Aldrich	Cat # 71718
Unstained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific	Cat # LC0725
Dimethylmalate	Sigma-Aldrich	Cat # 374318
DMEM without pyruvate	Wisent Bioproducts	Cat # 319-015
RPMI	Wisent Bioproducts	Cat# 350-000
RPMI without glucose	Wisent Bioproducts	Cat# 350-060
JumpStart™ Tag DNA Polymerase	Sigma-Aldrich	Cat # D9307
TRIZOL™ Reagent	Thermo Fisher Scientific	Cat #15596026
Hygromycin B	Wisent Bioproducts	Cat # 450-141-XL
G418 sulfate	Wisent Bioproducts	Cat# 400-130-UG
Puromycin	Wisent Bioproducts	Cat # 400-160-EM
Blatidicin S. Hydrochloride	Wisent Bioproducts	Cat # 400-190-EM
Paraformaldehyde	BioShop	Cat # PAR070
Osmium tetroxide solution	Sigma-Aldrich	Cat # 75632
Sodium (meta)periodate	Sigma-Aldrich	Cat # S1878
LR White Resin	London Resin Company	Cat # AGR1281
L-Lysine monohydrochloride	Sigma-Aldrich	Cat # L5626
Nutragen® Bovine Type I Collagen mix	Advanced BioMatrix	Cat # 5010
X-treme Gene 9	Roche	Cat # 6365787001
<i>E. coli</i> tRNA	Sigma-Aldrich	Cat #10109541001
Deoxyribonucleicacid, low molecularweight from salmonperm	Sigma-Aldrich	Cat # 31149
hexamethrine bromide (Polybrene)	Sigma-Aldrich	Cat # 107689
Slide-A-Lyzer	Thermo Fisher Scientific	Cat # 66203
Pierce™ Monomeric Avidin Agarose	Thermo Fisher Scientific	Cat # 20228
Glucose Solution	Wisent Bioproducts	Cat # 609-036-EL
D- Glucose (3,4- ¹³ C ₂)	Cambridge Isotope Laboratories	CLM-6750-PK
D-Glucose(3- ¹³ C)	Cambridge Isotope Laboratories	CLM-1393
D-Glucose(¹³ C ₆)	Sigma-Aldrich	Cat # 389374
Sodium butyrate	Sigma-Aldrich	Cat # 303410
DMEM with L- glutamine & phenol red,without D-glucose	Wisent Bioproducts	Cat # 319-061-CL
Biotin	Oakwood Chemicals	Cat # M02926
BioVision 10 kDa Spin Column	BioVision	Cat # 1997

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Ammonium formate	Sigma-Aldrich	Cat # 78314
Dithiothreitol (DTT)	Inalco	Cat #1758-9030
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)	Inalco	Cat#1758-1400
Tobacco Etch Virus (TEV) protease	<u>Cappadocia et al., 2015a</u> , <u>Cappadocia et al., 2015b</u>	N/A
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare	Cat # 17-0756-05
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare	Cat # 17-0575-01
Imidazole	Sigma-Aldrich	Cat # I202
N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide	Sigma Aldrich	Cat # 394882
Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)	Cayman chemicals	Cat # 14329
4-20% native Polyacrylamide Gel	Bio-Rad	Cat # 4568094
Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units with 10KDa cutoff	Millipore	Cat # UFC901024
Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units with 10KDacutoff	Millipore	Cat # UFC801024
Amicon Ultra-0.5 mL	Millipore	Cat # UFC500396
Bovine Serum Albumin	BioShop	Cat # ALB001
ABT-263 (Navitoclax)	APEXBIO	Cat # AA3007
Acrylamide/Bisacrylamide, 30% Solution, 37.5:1	Bioshop	Cat # ACR010.502
Critical commercial assays		
NAD ⁺ /NADH Kit	BioVision	Cat # K337
NADP ⁺ /NADPH Kit	BioVision	Cat # K347
GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit	Abcam	Cat # ab138881
Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells	Abcam	Cat # ab110170
MitoTracker™ Deep Red FM	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat # M22426
H ₂ DCFDA	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat # D399
MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator, for live-cell imaging	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific	Cat # M36008
Seahorse MitoStress Kit	Aligent	Cat # 103015-100
RNAlater®	Sigma-Aldrich	Cat # R0901
5x All in One RT Master Mix	ABM	Cat # G490
Duolink® PLA Multicolor Probemarker Kit Red	Sigma-Aldrich	Cat # DUO96910
Duolink® PLA Multicolor Probemarker Kit Green	Sigma-Aldrich	Cat # DUO96920
Duolink® PLA Multicolor Reagent Pack	Sigma-Aldrich	Cat # DUO96000
Duolink® <i>In Situ</i> Green Starter Kit Mouse/Rabbit	Sigma-Aldrich	Cat # DUO92014
Duolink® <i>In Situ</i> Wash Buffers, Fluorescence	Sigma-Aldrich	Cat # DUO82049
MicroBCA Pprotein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat # 23235
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat # 23237
Bio-Rad protein assay	Bio Rad	Cat # 5000006
LSAB2 System-HRP	DAKO	Cat # K0675
Di-amine-benzidine (DAB) substrate kit	Vector Labs	Cat # SK-4100
Deposited Data		
Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)	(Ghandi et al., 2019)	RRID:SCR_013836

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
For p53 ChIP seq depth and SISR peaks dataset	(Nguyen et al., 2018)	N/A
Additional p53 and E2F binding sequences were obtained in ChIP Atlas and positions extracted from UCSC genome Browser using Transcription factor ChIP-Seq Clusters (161 factors) from ENCODE	(Consortium, 2012 ; Davis et al., 2018) Atlas (Oki et al., 2018)	RRID:SCR_006793
Experimental models: Cell lines		
IMR90 (normal human diploid fibroblasts)	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)	ATCC Cat # CCL-186; RRID:CVCL_0347
IMR90 (normal human diploid fibroblasts)	Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ)	Coriell Cat # I90-83; RRID:CVCL_0347
PC-3 (prostate cancer)	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)	ATCC Cat # CRL-7934; RRID:CVCL_0035
HEK293T (embryonic kidney)	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)	ATCC Cat # CRL-3216, RRID:CVCL_0063
HuH-7 (liver cancer)		RRID:CVCL_0336
Primary MEFs	S. Meloche (IRIC, Université de Montréal)	N/A
Phoenix Ampho packaging cells	S. W Lowe (MSKCC, New York)	RRID:CVCL_H716
MEF p53 ^{-/-}	S. W Lowe (MSKCC, New York)	N/A
BJ, Human normal foreskin fibroblasts	ATCC	CCRL-2522
Experimental models: Organisms/strains		
Transgenic male mice with prostate-specific deletions of <i>Stat3</i> , <i>Pten</i> and double <i>Stat3</i> and <i>Pten</i> deletion	(Pencik et al., 2015)	N/A
mouse for allograftmale NOD.Cg- <i>Rag1</i> ^{tm1Mom} <i>Il2rg</i> ^{tm1Wjl} /SzJ (also called NRG)	CRCHUM mouse colony. F.Rodier	RRID:IMSR_JAX:007799
BL21 Star (DE3): F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) gal dcm rne131 (DE3)	Department of Biochemistry, University of Montreal	N/A
Oligonucleotides		
Table S1 for qPCR primer		N/A
Table S1 for shRNA target sequences		N/A
Table S1 for cloning primer		N/A
Recombinant DNA		
<i>pLPC-puromycin</i> –3xFLAG	Ferbeyre Laboratory or are also available on addgene	Acevedo et al. Cancer Res. 2016 Addgene
<i>pBABE</i> with selection marker puromycin, hygromycin or neomycin	Ferbeyre Laboratory or are also available on addgene	described in (Lessard et al., 2018) also available from Addgene
<i>pBABE-puromycin-H-RASV12</i>	Ferbeyre Laboratory or are also available on addgene	described in (Lessard et al., 2018) also available from Addgene
<i>pWZL-hygromycin</i>	Ferbeyre Laboratory or are also available on addgene	described in (Lessard et al., 2018) also available from Addgene
<i>pWZL-hygromycin-H-RASV12</i>	Ferbeyre Laboratory or are also available on addgene	described in (Lessard et al., 2018) also available from Addgene
<i>pCMV-VSV-G</i>	Addgene 8454	(Stewart et al., 2003); Addgene 8454
<i>pCMV-dR.8.2dvpr</i>	Addgene 8455	(Stewart et al., 2003); Addgene 8455
<i>pLPC-puromycin-binary</i>	S. W Lowe (MSKCC, New York)	N/A
<i>pMLP-shp21 puromycin</i>	S. W Lowe (MSKCC, New York)	N/A
<i>pMLP-shp53 puromycin</i>	Ferbeyre laboratory	Moiseeva et al., 2011
<i>pMLP-shp53-neomycin</i>	Ferbeyre laboratory	Moiseeva et al., 2011

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<i>pMLPX-shNTC-puromycin</i>	Addgene 65232	Described in (Lessard et al., 2018); Addgene 65232
<i>pMLPX-shNTC-neomycin</i>	Addgene 65233	Described in (Lessard et al., 2018); Addgene 65233
Vector expressing <i>NDI 1</i>	N. Chandel (Northwestern University, Chicago, IL).	N/A
<i>pBABE-puromycin-NDI-1-FLAG</i>	this study	N/A
<i>pMSCV-puromycin-mCherry</i>	this study	N/A
<i>pMSCV-puromycin-mCherry-NDI-1</i>	this study	N/A
<i>pRetroSuper-shp53-hygromycin</i>	R Agami Division of Tumor Biology, the Netherlands Cancer Institute,	Voorhoeve and Agami, 2003
<i>pRetroSuper-shGFP-hygromycin</i>	R Agami Division of Tumor Biology, the Netherlands Cancer Institute,	Voorhoeve and Agami, 2003
<i>pBABE-puromycin-MDH1</i>	this study	N/A
<i>pLPC-puromycin-binary-MDH1</i>	this study	N/A
<i>pLPC-puromycinbinary-MDH1-3xFLAG</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-MDH1-3xFLAG</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3</i>	(Life Technologies, Burlington, ON)	N/A
<i>pBABE-puromycin-ME1</i>	Addgene # 49163	(Jiang et al., 2013) Addgene # 49163
<i>pcDNA3-ME1-HA</i>	this study	N/A
<i>pLPC-puromycin-binary-MDH-1-3xFLAG-ME1-HA</i>	this study	N/A
<i>pBABE-puromycin-ME1-HA</i>	this study	N/A
<i>pBABE-neomycin-PC-MYC</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-PC-MYC</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-3xFLAG</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-MYC-tag</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-HA-tag</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-ME1(1-191)-HA</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-ME1(356-572)-HA</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-MDH1(1-90)-3x-FLAG</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-MDH1(1-141)-3x-FLAG</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-MDH1(105-334)-3x-FLAG</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-MDH1(1-90)-3x-FLAG</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-MDH1(142-334)-3x-FLAG</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-PC(1-956)-MYC</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-PC(1-534)-MYC</i>	this study	N/A
<i>pcDNA3-PC(430-1178)-MYC</i>	this study	N/A
<i>pLPC-puromycin-mito-iSTAT3-3xFLAG</i>	this study	N/A
<i>pLKO-shSTAT3 -A- puromycin</i>	Sigma-Aldrich	TRCN0000020840
<i>pLKO-shSTAT3 -B- puromycin</i>	Sigma-Aldrich	TRCN0000329887
<i>pLKO-shMDH1 -A- puromycin</i>	Sigma-Aldrich	TRCN0000028484
<i>pLKO-shMDH1 -B- puromycin</i>	Sigma-Aldrich	TRCN0000275198
<i>pLKO-shME1 -A- puromycin</i>	Sigma-Aldrich	TRCN0000064728
<i>pLKO-shME1 -B- puromycin</i>	Sigma-Aldrich	TRCN0000064731
<i>pLKO shPC-A-puromycin</i>	Sigma-Aldrich	TRCN0000078453
<i>pLKO-shPC-B-puromycin</i>	Sigma-Aldrich	TRCN0000413496
<i>pMXs-3XHA-EGFP-OMP25</i>	Addgene plasmid # 83356	Addgene plasmid # 83356
<i>pET-28-ME1</i>	Addgene plasmid # 38857	Addgene plasmid # 38857

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
BirA (<i>E. coli</i> Biotin Protein Ligase),	L. Tong (Columbia Univ., NY).	N/A
SCBPL (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Biotin Protein Ligase)	L. Tong (Columbia Univ., NY).	N/A
PC-full	L. Tong (Columbia Univ., NY).	N/A
pHIS-MDH1-HIS	this study	N/A
pHIS-PC-HIS	this study	N/A
pHIS-PC 486-1178-HIS	this study	N/A
pHIS		Mascle et al., 2020
pTEV-ME1-GST	this study	N/A
pTEV-GST		Mascle et al., 2020
pBABE-puromycin-mcherry-PC	this study	N/A
pBABE-hygromycin-PC Δ term-MYC(PC 21-1178)	this study	N/A
pMSCV with selection marker puromycin, hygromycin or neomycin	Ferbeyre Laboratory or are also available on addgene	Lessard et al., 2018
pLPC-puromycin	Ferbeyre Laboratory or is also available on addgene	Lessard et al., 2018
pLKO-shNTC-puromycin	Sigma-Aldrich	Lessard et al., 2018
pLKO-shNTC-hygromycin	this study	N/A
pLKO-shNTC-neomycin	this study	N/A
pLKO-shNTC-blasticidin	this study	N/A
pLKO-shSTAT3-A -hygromycin	this study	N/A
pLKO-shSTAT3 -A- neomycin	this study	N/A
pLKO-shSTAT3 -B- hygromycin	this study	N/A
pLKO-shSTAT3 -B- neomycin	this study	N/A
pLKO-shSTAT3 -A- blasticidin	this study	N/A
pLKO-shSTAT3 -B- blasticidin	this study	N/A
pBabe-hygromycin-MDH1-3-X-FLAG	this study	N/A
pLV-EV1-RFP	N. Chandel (Northwestern University)	Vectorbuilder VB 160708-1059xrd
pLV-EV1-RFP-cyto-LBNOX -3-x-FLAG	N. Chandel (Northwestern University)	Vectorbuilder VB 160708-1059xrd ; Original research paper generating LBNOX PMID 27124460 Addgene # 75285
pUltra	Addgene 24129	RRID: Addgene_24129
pUltra-MDH1-ME1	this study	N/A
pUltra-hot	Addgene 24130	RRID: Addgene_24130
pUltra-hot-PC	this study	N/A

Software and algorithms

Prism 6-9	https://www.graphpad.com/	RRID: SCR_002798
Imaris	https://imaris.oxinst.com/packages	RRID: SCR_007370
Adobe Illustrator	https://www.adobe.com/products/illustrator.html	RRID: SCR_010279
Agilent Masshunter Quantitative Analysis software	http://www.agilent.com/en-us/products/software-informatics/masshunter-suite/masshunter/masshunter-software	RRID: SCR_015040
Seahorse Wave	http://www.agilent.com/en-us/products/cell-analysis-(seahorse)/software-download-for-wave-desktop	RRID:SCR_014526
Astra	https://www.wyatt.com/products/software/astra.html	RRID:SCR_01625

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
ZEN Digital Imaging for Light Microscopy	http://www.zeiss.com/microscopy/en_us/products/microscope-software/zen.html#introduction	RRID:SCR_013672
Olympus Fluoview FV10-ASW	http://www.photonics.com/Product.aspx?PRID=47380	RRID:SCR_014215
Fiji	https://fiji.sc/	RRID: SCR_002285
Image Lab	https://www.bio-rad.com/en-us/sku/1709690-image-lab-software	RRID: SCR_014210
FlowJo	https://www.flowjo.com/solutions/flowjo	(RRID:SCR_008520)
BD FACSDiva Software	http://www.bdbiosciences.com/instruments/software/facsdiva/index.jsp	(RRID:SCR_001456)
LightCycler Software	http://www.roche-applied-science.com/shop/products/absolute-quantification-with-the-lightcycler-carousel-based-system	(RRID:SCR_012155)
NDP.view 2.6.8 (NanoZoomer Digital Pathology.view 2.6.8)	Hamamatsu	N/A
OlyVIA 2.9 Virtual Slide Scanner	Olympus	N/A
Additional information		
Mendeley data		http://doi.org/10.17632/xsxwjfhz8f.1
Immunogold staining protocol	www.me-udem.com	www.me-udem.com
IHC staining protocol	https://www.chumontreal.qc.ca/en/crchum/facilities-and-services	https://www.chumontreal.qc.ca/en/crchum/facilities-and-services
Metabolic tracing analysis	https://www.mcgill.ca/gci/facilities/metabolomics-innovation-resource-mir	https://www.mcgill.ca/gci/facilities/metabolomics-innovation-resource-mir

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

All reasonable requests for material generated for this study should be addressed to G. Ferbeyre (g.ferbeyre@umontreal.ca).

Materials availability

Materials generated in this study are available from the lead contact.

There are restrictions to the availability of TMA of prostate tissue since its discontinued but similar TMA are available from US Bio-max. There are restrictions to the availability of HA antibody but its available from commercial distributor.

There are restrictions to the availability of tissue samples from allograft as only a limited number of tumor were generated. Request for *Stat3*^{-/-} *Pten*^{-/-} knockout tissue should be addressed to Richard Moriggl or Lukas Kenner

There are restrictions to the availability of tissue samples from *Stat3*^{-/-} *Pten*^{-/-} as only a limited number of paraffin embedded slides were generated

There are restrictions to the availability of frozen proteins MDH1, ME1, and PC as limited amount of purified proteins were generated.

Data and code availability

- Quantification data of Immunofluorescence, quantification of SA-β-Gal, ROS analysis, NAD analysis, oxygen consumption, analyzed metabolomics data, unprocessed mitochondrial ultrastructure images, unprocessed allograft images, PLA images and unprocessed SA-β-Gal images were deposited to Mendeley Data and DOI is listed in the key resources table. Link to Mendeley <http://doi.org/10.17632/xsxwjfhz8f.1>. This paper analyses existing, publicly available data. These accession numbers for the datasets are listed in the key resources table. All source data not on Mendeley Data and all supporting information are either included in the figures or will be made available upon request to the lead author or the first author.
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyse the data reported in this paper is available from the lead contact upon reasonable request.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Mouse Model

All animal experiments were reviewed and approved by the Austrian ministry authorities (BMWF-66.009/0281-I/3b/2012) and the CIPA (Comité Institutionnel d'expérimentation animale du CHUM), protocol C18046GFs. Transgenic male mice with prostate-specific deletions of *Stat3*, *Pten* and double *Stat3* and *Pten* deletion (Pencik et al., 2015) were used to show levels of HTC enzymes in genetic model of prostate cancer development.

Allotransplants were performed using 7 weeks old male NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (also called NRG) mice.

Cell culture model

IMR90 and BJ normal human diploid fibroblasts, PC-3 (prostate cancer), HEK293T (embryonic kidney) and HuH-7 (liver cancer) cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ). Primary MEFs were supplied by S. Meloche (IRIC, Université de Montréal). Phoenix Ampho packaging cells were a gift from S. W. Lowe (MSK, New York). MEF p53^{-/-} were provided by S. Lowe. IMR90, MEF and BJ were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Wisent Montreal, QC) without pyruvate, supplemented with 10% high grade fetal bovine serum (FBS, Wisent) and 1% penicillin/streptomycin (Wisent). HEK293T, Huh-7 and Phoenix Ampho packaging cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Wisent Montreal, QC) without pyruvate, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Wisent), 2 mM L-glutamine (Wisent) and 1% penicillin/streptomycin (Wisent). PC-3 cells were cultured in RPMI medium (Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum 1% penicillin/streptomycin (Wisent) and 2 mM L-glutamine.

METHODS DETAILS

Reagents

Pyruvate, aspartate, lactate, MG132, NADH, NADPH, ATP, NAD⁺, NADP⁺, duroquinone and dimethylmalate were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON) and piericidin A from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). ABT-263 was purchased from APEXBio (Boston, MA).

Plasmids

Retroviruses, *pBABE*, *pBABE-H-RASV12*, *pWZL* and *pWZL-H-RASV12* are available today on Addgene, but we obtained them from S. W. Lowe (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY). *pBABE* (Addgene number #1764), *pBABE-H-RASV12* (Addgene number #1768), *H-RASV12* was cloned with *Bam*HI and *Sall* restriction enzymes into *pBABE* vector. *pBABE-puromycin* selection marker can be removed by digestion with *Hind*III and *Cla*I and new selection marker can be inserted using compatible restriction enzymes. For this study we used *pBABE-puromycin*, *pBABE-hygromycin* and *pBABE neomycin*. *pWZL hygromycin* (Addgene number 18750) and *pWZL-hygro-mycinH-RASV12* (Addgene number 18749). *pWZL-hygromycin-H-RASV12* was generated by cloning *H-RASV12* into *Bam*HI / *Sall* restriction sites of *pWZL-hygromycin* vector. *pLPC* and *pMSCV* were originally generated by Clontech. *pLPC3XFLAG* has Addgene number 73560 and was generated by cloning *3xFLAG* sequence into *Bam*HI/*Xho*I restriction site. *pMSCV* was modified by the Ferbeyre lab to generate *pMSCV* with multiple cloning site by inserting in *Bgl*II / *Hpa*I of *MSCV* the following linker gatctggatcccagtggtggtgtacgtagatcatccactggcggccgactcgagcaatgcatggtt (Lessard et al., 2018). From modified *pMSCV-puromycin*, the selection marker can be removed by *Hind*III/*Cla*I digestion and replaced by neomycin or hygromycin with compatible restriction enzymes (Lessard et al., 2018).

pCMV-VSV-G (Addgene no. 8454) and *pCMV-dR8.2 dvpr* (Addgene no. 8455) were from R. Weinberg's laboratory (Whitehead Institute, Cambridge, MA) (Stewart et al., 2003). *pLPC binary* and *pMLP-shp21* were a gift from S. W. Lowe (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY). *pRetroSuper-shp53* and *pRetroSuper-shGFP* were described in (Voorhoeve and Agami, 2003). The sequence of *shp53* from *pRetroSuper* was also subcloned into *miR30* context of *MLP-puromycin* and *neomycin* (Moiseeva et al., 2011). *ShNTC* with *mir30* context was subcloned in *Bgl*II/*Age*I restriction sites to create retroviral vectors *pMSCV-shNTC* and *pMLPX-shNTC* (*pMLPX* is *pMLP* without GFP reporter). *NDI1* and *LBNOX-3xFLAG* vectors were a gift from N. Chandel (Northwestern University, Chicago, IL). The *LBNOX* construct was from Addgene 75285 (Titov et al., 2016). *pBABE-NDI-1-FLAG* was generated by PCR amplification with primers containing *3xFLAG* sequence and digested with *Eco*RI/*Sall*. *NDI1-Cherry* was generated by PCR amplification with *Eco*RI/*Eco*RV overhangs and cloned into *pMSCV-Cherry* with *Eco*RI/*Hpa*I sites. *MDH1* was PCR amplified and subcloned in *Bam*HI/*Eco*RI restriction sites to create *pBABE-MDH1* (WT) and *pLPCbinary MDH1*. To create *pLPC binary MDH1-3xFLAG* and *pcDNA3-MDH1-3xFLAG*, *MDH1* was PCR amplified with one primer containing the *3xFLAG* tag and subcloned in *Bam*HI/*Eco*RI restriction sites to create *pcDNA3-3xFLAG-MDH1* and *pLPC-binary MDH1-3xFLAG*. *pcDNA3* was from (Life Technologies, Burlington, ON). *ME1* was purchased from Addgene (Addgene # 49163) (Jiang et al., 2013). To generate *pcDNA3 ME1-HA* and *pLPC binary MDH1-3xFLAG-ME1-HA*, *ME1* was PCR amplified with one primer containing the HA tag and subcloned into *Bam*HI/*Xho*I sites of *pcDNA 3* or *pLPC binary* using compatible overlapping ends generated by digestion of *Bgl*II/*Sall*. *PC* was purchased from OriGene (Rockville, MD 20850, USA). *pBABE-PC-MYC* and *pcDNA3-PC-MYC* were generated by PCR amplification of *PC*, one of the primers containing the *MYC* tag and subcloned into *Bam*HI/*Eco*RI sites. To generate *pcDNA3-MDH1-MYC* *MDH1* was PCR amplified with one primer containing the *MYC* tag and subcloned in *Bam*HI/*Eco*RI restriction

sites to create *pcDNA3-MYC-MDH1*. To generate *pcDNA3-PC-3xFLAG* PC was PCR amplified with one primer containing the 3xFLAG tag and subcloned in BamHI/EcoRI restriction sites to create *pcDNA3-PC-3xFLAG*. *pcDNA3-3xFLAG*, *pcDNA3-MYC-tag* and *pcDNA3-HA-tag* were generated by cloning double-stranded oligonucleotides coding for the mentioned tags. All variants of *ME1* used for mapping were PCR amplified and then cloned into BamHI/XhoI sites of *pcDNA3*. For *MDH1* and *PC* variants all fragments were PCR amplified with 3xFLAG tag or MYC tag and cloned BamHI/EcoRI into *pcDNA3*. To construct *mito-iSTAT3* resistant to shSTAT3A we first introduced seven mismatches in the sequence targeted by the shRNA keeping the same protein sequence. The new sequence is: “atG **TTA ACT AAT AAC CCT AAA Aat**”; while the WT sequence is: “atG CTG ACC AAC AAT CCC AAG Aat,” (modified nucleotides are shown in bold and the capital letters indicate the target sequence of the shRNA). We then added the mitochondrial pre-sequence of Cytochrome c oxidase subunit IV from yeast to the N terminus of the mutated STAT3 and a FLAG tag to the C terminus using PCR. The PCR product was subcloned into the HindIII and XhoI sites of *pLPC*. Lentiviral vectors expressing HTC enzymes were generated from *pULTRA* and *pULTRA-hot* from Malcolm Moore (Addgene plasmids # 24129 and # 24130). *PC* was cloned in *pULTRA-hot* as a PCR XbaI/BamHI fragment. *MDH1* and *ME1* were cloned into *pULTRA* as a fusion protein separated by an intein cleavage site as follows. First, we generated *pUltra-ME1* from a PCR fragment obtained from *pBabe-ME1* and digested with NheI/SalI. Then the *MDH1* ORF without stop codon was PCR amplified adding restriction sites XbaI/BamHI for cloning into *pUltra-ME1*.

All PCR primers used for cloning in this study are in Table S1. Lentiviruses *pLKO* expressing *shSTAT3* (*sh3-A*, *sh3-B*), *shMDH1* (*shMDH1-A*, *shMDH1-B*), *shPC* (*shPC-A*, *shPC-B*), *shME1* (*shME1-A*, *shME1-B*), and *shNTC* were from Sigma-Aldrich. To generate *shSTAT3* expression vectors with *hygromycin*, *neomycin* and *blastidicin* resistance, each resistance gene was PCR amplified with primers containing BamHI and KpnI restriction sites and subcloned into *pLKO-puroMYCIN* to replace the puro resistance gene. *shRNA* target sequences are described in Table S1.

For protein expression in bacteria, *H. sapiens* *ME1* expression vector was a gift from N. Burgess-Brown (Addgene plasmid # 38857). BirA (*E. coli* Biotin Protein Ligase), SCBPL (*Saccharomyces cerevisiae* Biotin Protein Ligase), and *PC* full length were a gift from L. Tong (Columbia Univ., NY). *MDH1-His* and *PC*-full length and *PC 486-1176* were amplified by PCR and cloned via BamHI/EcoRI sites into *pHIS* that enables the expression of N-terminal 6xHIS fusion proteins or into *pTEV* that enables the expression of N-terminal glutathione-S-transferase (GST) that can be cleaved by the TEV protease (Mascle et al., 2020). *pMXs-3XHA-EGFP-OMP25* for mitochondrial purification was purchased from Addgene (Addgene plasmid # 83356).

Proliferation analysis and Senescence associated β -galactosidase staining (SA- β -Gal).

Growth curves for IMR90 and PC-3 cells were measured using 0.1% crystal violet in PBS (Gillies et al., 1986). Briefly, IMR90 were counted using a hemocytometer and 10,000 cells were plated in a 12-well plate in technical triplicates and a minimum of 4 different plates. Cells were incubated for indicated times and fixed for 10 min using 1% glutaraldehyde solution in PBS. Media was replaced with fresh media every 3 days. Fixed cells were washed twice with PBS and then conserved in PBS with 0.1% NaN_3 until all time points were recovered. Then they were washed twice with PBS followed by staining with 0.1% crystal violet in PBS for 30 min at RT. After staining, cells were washed in tap water until no crystal violet dissolved any longer in water. Colored cells were dried for a minimum of 24 h at RT. To measure growth, crystal violet was extracted with 10% acetic acid in water for 15 min with moderate shaking and OD at 590 nm was measured using photometer. The amount of crystal violet correlates well with cell numbers as we verified experimentally.

For all experiments, the number of biological replicates (n) is indicated and within each biological replicate the mean of three technical replicates was taken. For the experiment done in IMR90 expressing RAS and two of the three HTC enzymes each biological replicate only included technical duplicates. For colony assays with MEFs, 10,000 cells were plated in triplicate into 6 cm plates and incubated for 12 days. Cells were fixed with 1% glutaraldehyde in PBS and then colored with 0.1% crystal violet in PBS. Pictures were taken with a Bio-Rad bio imager.

SA- β -Gal staining was performed as described (Deschênes-Simard et al., 2013). Briefly, cells were plated and fixed 24 h after in 0.5% glutaraldehyde in PBS for 10 min at RT. Then they were washed once with PBS for 5 min and twice for 10 min with PBS pH 6.0 containing 1 mM MgCl_2 . Staining solution was added to cells and incubated for 1-6 h away from light at 37°C. SA- β -Gal staining solution consisted of PBS pH 6.0, 1 mM MgCl_2 , 2.5 μM X-Gal, 5 μM potassium ferricyanide and 5 μM potassium ferrocyanide. Solution was filtered using 0.45 μm filter and heated to 37°C. For MEFs, PBS 1 mM MgCl_2 was at pH 5.5 and for PC-3 cells pH = 5.75 and cells were incubated overnight. For quantification, a minimum of 50 cells per biological replicate were scored under the light microscope.

Clonogenic assay with PC-3 cells was performed in 48-wells plates (Corning, NY) pre-coated with Nutragen® Bovine Type I Collagen mix, (Advanced BioMatrix, San Diego, CA) diluted at 2 mg/mL in ice-cold growth medium, then warmed at 37°C for 30 min to form the gel. PC-3 cells were trypsinized to generate a single-cell suspension and 2,500 cells were prepared in Nutragen®/media mix and deposited in each well to form the second layer. Plates were incubated at 37°C for 45 min to allow the second layer to jelly. Finally, fresh media was added on top of each well and changed every 3 days. Colony formation was scored 1 week after.

Retroviral and Lentiviral infections

For lentiviral infections, 5×10^6 HEK293T cells were seeded in 10 cm plates and grown for 16 h. Then, cells were transiently transfected using 3 μg of a lentiviral expression vector, 2 μg of the *pCMV-dR8.2 dvpr* plasmid and 1 μg of the *pCMV-VSV-G* envelope

protein expression plasmid in 900 μL of 1 \times Opti-MEM (GIBCO Life Technologies, Burlington, ON). Mixture of DNA with 1 \times Opti-MEM was vortexed for 10 s followed by adding 16 μL of X-tremeGENE 9 DNA Transfection reagent (Roche, Laval, QC) at the bottom of the Eppendorf tube. Tubes were inverted 6 times and incubated for 15 min at room temperature and then the mix was added to the cells. After 16 h, 10 mM sodium butyrate (Sigma-Aldrich) was added for a minimum of 6 h, and then the medium was changed. Supernatants from the transfected plates were collected 36 to 60 h after transfection. The viral soups were filtered through a 0.45 μm filter, supplemented with 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene (Sigma) as well as 10% high grade serum and added on target cells. In preliminary test the viral titer produced by one 10 cm dish was sufficient to infect two 10 cm of target cells (Lessard et al., 2018). For shSTAT3 and shNTC in IMR90 2.5 mL of a 10 mL the lentiviral soup was used to infect cells (depletion of STAT3 with high viral titer induces apoptosis in IMR90 cells). For all other IMR90 and PC-3 cells lentiviral infections, 5 mL of a 10 mL lentiviral soup was used. For IMR90 lentiviral soup was incubated for a minimum of 8 h. For all other cell lines 24 h.

For retroviral infections 5×10^6 Phoenix-Ampho packaging cells were plated into a 10 cm plates and transfected with 20 μg of retroviral plasmid and 10 μg of 4070A amphotropic envelope protein expression plasmid *pAMPHO* by using calcium phosphate method as described (Ferbeyre et al., 2000). Following transfection, the viral soup from one 10 cm plate was used to infect one 10 cm dish of target cells and incubated for a minimum of 8 h. Fresh media was added to the packaging cells and the targets cells were reinfected 8 h after. To prepare target cells for infection cells were seeded so that on day of infection target cells were 70-80 percent confluent. After a minimum of 12 h post last infection, target cell population was selected using 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin (Wisent) and/or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hygromycin (Wisent) and/or 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 and/or 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin S (Wisent). In case two or more selection agents were used at the same time doses were 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin (Wisent) and/or 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hygromycin (Wisent) and/or 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 and/or 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin S. If three or more selection were required selection was done sequentially starting by puromycin and G418 followed by hygromycin and G418. For PC-3 cells selection was maintained for the length of the experiments (Ferbeyre et al., 2000).

For spinfection of senescent BJ cells with HTC expression vectors, BJ cells were plated into 6-well plates so that on day of infection they were 90% confluent. Production of pseudo viral particles was done as described above with the modification that 1/10 of a 10 cm produced viral soup was used per well. For infection, viral soup was added with 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene and 10% high grade serum to BJ cells and cells were spun at 3200 RPM for 3 h at 32°C.

For LBNOX expression, IMR90 cells were infected with either control empty vector with RFP selection or its derivative expressing *LBNOX-3-xFLAG*. After infection, cells were incubated for 7 days then selected by RFP positive cells using BD FACSAria cell sorter at IRIC flow cytometry core platform.

Pyruvate/Aspartate/Duroquinone/ Dimethylmalate/ and CoCl_2 supplementation

Pyruvate and aspartate were dissolved in DMEM growth media and replaced every 48 h. For vehicle normal DMEM growth media was used. As pyruvate and aspartate were dissolved in the same vehicle only one vehicle condition for both supplementations was run, resulting in same value for three replicates for control conditions (shNTC+ Veh, shS3[A]+ Veh, shS3[B]+ Veh) for growth curve, SA- β -Gal, NAD⁺/NADH ratio and immunofluorescence. As growth curve of aspartate showed big variation two more independent n were performed. Supplementation started on the day the cells were infected. For duroquinone and dimethylmalate both were dissolved in high-grade DMSO (Sigma) and replaced every 48 h. For CoCl_2 treatment, IMR90 cells expressing PC-cherry were plated on coverslips and treated for 48 h with the CoCl_2 (Bioshop). Cells were washed and fixed by 4% PFA and standard immunofluorescent protocol. Images were acquired with LSM 800 confocal microscope and Elyra hyper resolution microscope. For quantification, the filter set 77 of Zeiss was used as such the colocalization appears as yellow color where no colocalization is seen as red or green in the oculars. Areas with no colocalization (Red signal from PC cherry) were counted per cell.

Cell culture with hypoxia

Experiments with 1% oxygen were done as described in (Kilic Eren and Tabor, 2014) IMR90 fibroblast were infected with RAS oncogene and control shRNA (shNTC) or RAS oncogene and shRNA targeting a component of the HTC complex and on day 3 post-infection cells were split into two different plates, one was maintained in 21% oxygen and the other one was transferred into a Xvivo System glove box (BioSperix, Parish NY) hypoxia chamber connected to N_2 , CO_2 and O_2 gas. The chamber was set to 37°C, 5% CO_2 , and relative humidity of 60%. Oxygen level was adjusted to 5% and monitored using the system's own pre-calibrated oxygen sensors. After 24 h at 5% oxygen the chamber oxygen levels were decreased to 1% for the rest of the experiment. Media of the cells was changed every 48 h and replaced with fresh DMEM media. To avoid residual oxygen in the media trypsin or PBS, the solutions were preincubated for a minimum of 24 h in 1% oxygen prior to use. For immunofluorescence to visualize HTC foci, 150,000 cells were plated on coverslips and incubated for another 24 h, Slides were then processed as described in immunofluorescence.

MitoTracker staining

In order to visualize mitochondria, MitoTracker Deep Red (M22426 Thermofisher) was used according to manufactures instructions. To stain cells 250 nM of freshly dissolved MitoTracker Deep Red was added for 20 min to cells. Cells were washed twice with PBS and processed for immunofluorescence as described below. All steps after staining were carried out avoiding exposure to light.

Hexanediol treatment

For 1,6-hexanediol treatment cells were plated for immunofluorescence on coverslips. Media was replaced with media containing 1% hexanediol (Sigma) and then placed for 10 min in the incubator at 37°C. Media was removed and cells were washed twice with PBS and processed for immunofluorescence as described below.

Immunoblots and Immunoprecipitation

Immunoblots and immunoprecipitation were performed as described previously (Lessard et al., 2018). Cells were washed twice with ice cold PBS followed by aspiration of residual PBS. Cells were lysed in 500 μ L to 2 mL of modified Laemmli Buffer (4% SDS, 20% glycerol, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8) and recovered using a clean cell scraper. Samples were transferred into tubes and sonicated at lowest intensity for 20 s followed by heating for 5 min at 97.5°C. Samples were cooled to RT and protein were quantified using Nano-drop absorbance at A280. Samples were diluted to 2 mg/mL using modified Laemmli Buffer and 10% 2-mercapthoethanol, 0.1% bromophenol blue was added. Samples were kept at -20° C until use.

Multilayered SDS-Gels were poured as follows. For all gels, we used 0.1% SDS, APS and TEMED. For resolving gels, 375 mM Tris HCl, pH = 8.8 was used. A first layer of higher concentration of Acrylamide-BisAcrylamide(37.5:1) (15% or 12%) was poured, then isopropanol was added on top. Isopropanol was removed after the gel was solidified and a second layer of Acrylamide-BisAcrylamide(37.5:1) (12% or 10%) was dispensed and again layered with isopropanol. Isopropanol was again removed and a third layer of Acrylamide-BisAcrylamide(37.5:1) (10% or 8% or 7%) was poured and covered by isopropanol. Finally, after removing the isopropanol, the gel was topped with Acrylamide-BisAcrylamide(37.5:1) (4%, with 0.125 M Tris HCl-pH = 6.8) and wells were made using a comb. Once all gels were solidified, samples were heated to 95°C for 2 min and spun down for 30 s at 16,000 g. 20 to 40 μ g of protein was loaded per sample. Gels were run in SDS-PAGE Mini (BioRad) machines with Tris-Glycine SDS buffer according to manufacturer's instruction. SDS-PAGE was transferred onto nitrocellulose (BioRad) or PVDF (Millipore) membrane with Tris-Glycine MeOH buffer according to manufacturer's instructions. Membranes were blocked for 1 h in 5% skim milk diluted in TBS (Tris-buffered saline) and incubated overnight at 4°C or 30 min at RT with primary antibodies (see supplementary table S2 for antibody dilutions). After primary antibody incubation, membranes were washed with 3 times 5 min with TBST (Tris-buffered saline with 0.05% Tween-20). Secondary antibody coupled to HRP were diluted 1:3000 in milk TBS and incubated for 1 h at RT. Membranes were rinsed 3 times followed by 3 washes of 10 min each with TBST. To reveal signal, ECL substrate was added (Perkin Elmer (Western Lightning Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence) or Amersham(Amersham ECL Detection Reagents)) and images were acquired using autoradiography.

For estimation of protein molecular weight FroggaBio BLUelf Prestained Protein ladder was run on each SDS-PAGE. In immunoblots, a minimum of one size mark is shown. Of note membranes were cut into pieces to incubate with different antibodies. In case of experiments were performed on several membranes' representative tubulin blot as loading control is shown. Primary antibodies dilutions are listed in Table S2.

Immunoprecipitation protocol was performed as in the great protocol described here (Lessard et al., 2018). Briefly, to reveal endogenous interactions of the HTC enzymes we grew HuH-7 cells in a 15 cm cell culture dish, washed them twice with ice-cold PBS and scrapped them with 1 mL of IP buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 12.5 mM MgCl₂, 400 mM NaCl, 20% glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS and 1x cOmplete-EDTA free protease inhibitor cocktail from Roche Applied Science). Cell lysates were sonicated at lowest intensity for 30 s and then cleared at 16,300 g for 30 s. Immunoprecipitation was done using either 5 μ g of anti-ME1 rabbit polyclonal or rabbit pre-immune serum overnight at 4°C. Recovery of immunoprecipitated proteins was performed using a 1:1 mix of Protein-A and -G dynabeads (Invitrogen). Prior to use, Protein A/ Protein G mix was blocked for 30 min in IP Buffer containing 2.5% BSA, 0.16 μ g/ μ L *E. coli* tRNA (Sigma-Aldrich) and 0.16 μ g/ μ L salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich). Dynabeads were added to cleared lysates and incubated for 2 h at 4°C. Finally, the mixture was washed 2x 10 min at 4°C in IP Buffer followed by 3x 1 h wash in IP Buffer at 4°C. Total cell lysates and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and analyzed by western blot.

Immunoprecipitations with FLAG-M2 Sepharose beads (Sigma) or HA magnetic beads (Pierce/ Invitrogen) were done as described above, with the following modifications. For immunoprecipitations with FLAG-M2 Sepharose beads, 20 μ L of beads per immunoprecipitation were used. For HA immunoprecipitations, 10 μ L of magnetic beads were used for each immunoprecipitation. The amount of plasmid transfected for each experiment is detailed in Table S3. HEK293T cells were transfected with calcium phosphate method as described above incubated for a minimum of 16 h and then washed with 1xHEPES and incubated for another 6 h in cell incubator. Finally, cells were washed with ice cold PBS twice and then lysed in IP buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 12.5 mM MgCl₂, 400 mM NaCl, 20% glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS and 1x cOmplete-EDTA free protease inhibitor cocktail from Roche Applied Science). Lysates were sonicated at lowest intensity for 30 s and then cleared at 16,300 g for 30 s. Cleared lysates were incubated for 1 h at 4°C on a rocking platform with corresponding beads. Mixture of beads and immunoprecipitate were washed 2x with IP buffer and then washed 3x for 10 min at 4°C on a rocking platform. For FLAG immunoprecipitations, beads were spun down another time and washed again 2x with IP buffer. Total cell lysates and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and analyzed by western blot.

For Mapping of the interaction sites of ME1, MDH1 and PC, gene fragments for each of the three proteins were generated by PCR as described above. The amount of plasmid transfected for each experiment can be found in Table S3. For ME1 fragments HEK293T cells were treated for 6 h with 20 μ M of MG132 in order to stabilize unstable ME1 fragments.

Protein purification

All proteins were purified in three steps; first by metal affinity chromatography followed by ion-exchange chromatography (IEX) and then size-exclusion chromatography as adapted from (Tao et al., 2003) and references therein. For the purification of ME1, the bacterial expression vector was transformed into the *E. coli* BL21 Star expression strain and bacteria were grown at 37°C to an OD_{600nm} of 0.8. Expression of ME1-HIS was induced for 6 h at 30°C with 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Bacterial pellets were resuspended and lysed in Lysis Buffer (30 mM imidazole, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) supplemented with 1x cOmplete protease inhibitor cocktail (Roche) and passed through a French Press. Bacterial lysates were centrifugated at 35,000 rpm in a Beckman 55Ti rotor for 45 min at 4°C. The cleared lysates were loaded on a column of chelating Sepharose Fast Flow immobilized metal affinity chromatography resin (GE Healthcare) charged with nickel and washed with 15 column volumes (CV) of 30 mM imidazole, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and 1x cOmplete protease inhibitor followed by a second wash with 2 CV of 60 mM imidazole, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, and 1x cOmplete protease inhibitor. Proteins were eluted with 5 CV of 250 mM imidazole, 500 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% Glycerol and dialysed with 125 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM DTT overnight at 4°C, then loaded into a Q Sepharose FF column (GE Healthcare). After loading, the column was washed with 0.5 CV of Buffer A (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 75 mM NaCl, 5 mM DTT) or until UV absorbance returned to baseline. The column was then washed with 2 CV of Mix buffer A and buffer B (30 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 5 mM DTT) at conductivity of 20 mS/cm. Gradient of B was set to 50 percent for 60 min.

We used the same protocol to purify MDH1 with the following modifications. For MDH1, expression was induced with IPTG at 30°C, eluted from the nickel column with 300 mM imidazole, 500 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, and the purified protein was dialysed into 25 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM DTT overnight at 4°C. IEX on the Q-Sepharose column was then performed with Buffer A (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM NaCl, 5 mM DTT) and Buffer B (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM DTT). ME1 and MDH1 were then concentrated using Amicon centrifugal tubes with a MW cut-off of 10 kDa (Millipore). Samples were frozen at –80°C in 10% glycerol, 200 mM NaCl, 5 mM DTT until used.

For PC full-length, BL21 Star bacteria bearing PC- and BPSCL-expressing plasmids were grown until an OD₆₀₀ of 0.9. Then, 25 mg/L of Biotin and 0.1 mM of MnCl₂ were added and incubated for another 45 min. Expression was induced for 16 h with 1 mM IPTG at 18°C. For metal affinity chromatography, cleared lysates were loaded on the nickel column washed with 15 CV of 30 mM imidazole, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and 1x protease inhibitor cocktail, followed by washes with 2 CV of 40 mM imidazole and 1 CV of 60 mM imidazole. Proteins were first eluted with 200 mM imidazole, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and then concentrated using slow dialysis by supplying a saturated solution of 35K PEG (Sigma). Dialysis solution 15% glycerol, 200 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 8.0 with saturated PEG 35K. Proteins were then frozen at –80°C until used.

For the PC (486-1178) fragment, BL21 Star bacteria bearing PC- and BirA-expressing plasmids were grown until an OD₆₀₀ of 0.9. Then, 25 mg/L of Biotin and 0.1 mM of MnCl₂ were added and incubated for another 45 min. Expression was induced for 16 h with 1 mM IPTG at 18°C. For metal affinity chromatography, cleared lysates were loaded on the nickel column washed with 15 CV of 30 mM imidazole, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, protease inhibitor cocktail followed by washes of 2 CV of 40 mM imidazole and 1 CV of 60 mM imidazole. Proteins were eluted with 200 mM imidazole, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and dialysed with 75 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol, 1 mM (tris(2-carboxyethyl)phosphine) (TCEP), 2 mM MnCl₂ overnight at 4°C. IEX on the Q-Sepharose column was then performed with Buffer A (75 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol, 0.2 mM TCEP, 2 mM MnCl₂) and Buffer B (500 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol, 0.2 mM TCEP, 2 mM MnCl₂).

For SEC, all frozen proteins were thawed and dialysed into 10% glycerol, 50 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 2 mM MnCl₂, 30 mM Tris-HCl, pH 7.55. SEC was performed on either a Superdex 200, a Superdex 200 Increase or Superose 6 columns. In all cases, the running buffer was 10% glycerol, 50 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 2 mM MnCl₂, 30 mM Tris-HCl pH 7.55 supplemented with 1 mM ATP, 1 mM NADH, 1 mM NADPH and 0.2 mM TCEP.

Native separation of multi-protein complexes

The procedure was previously described (Camacho-Carvajal et al., 2004). In brief, a 10 cm Petri dish of HuH-7 at ~85% confluence was washed twice with ice-cold PBS. Then, cells were scraped in PBS on ice and centrifuged for 10 min at 1500 rpm (Napco, 2028R) at 4°C. Cells were lysed in 250 μL of cold CSH buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 25 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) supplemented with 1x PhosSTOP and 1x cOmplete EDTA-free protease inhibitors (Roche), and incubated for 30 min on ice. Lysates were spun down for 20 min at 15 000 g at 4°C and the supernatant was loaded on a BioVision 10 kDa Spin column with 375 μL of cold BN buffer (500 mM 6-aminocaproic acid, 20 mM Bis-Tris pH 7.0, 2 mM EDTA, 12 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% Triton X-100, complete EDTA-free protease inhibitor). The column was centrifuged for 45 min at 15 000 g at 4°C. The flow-through was discarded and 350 μL of cold BN buffer was added to the column. This procedure was repeated, then the column was centrifuged for an additional 90 min or until the column content was concentrated to ~150 μL. 50 μL per well of this product was separated on a 4%–20% native gel (4568094, Bio-Rad) overnight at 16 mA in a cold-room with the anode buffer (50 mM Bis-Tris pH 7.0) and cathode buffer (50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris pH 7.0, 0.02% Coomassie G-250) and using 7 μL of the ladder Native Mark (ThermoFisher). The following day, half of the gel containing the sample and the ladder was stained with Coomassie R-250 to assess the migration of the blue native gel, and a replicate lane containing the sample was cut in 9 equivalent pieces from top (piece 1) to bottom (piece 9). Each gel piece was denatured for 1 h in 1 mL of 2x Laemmli Buffer (4% SDS, 20% glycerol, 120 mM Tris-Cl pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol). Then, each piece was inserted in a well of a second 10-well 4%–20% gradient gel with fresh 2x Laemmli Buffer to avoid bubbles, and the gel

was migrated in a SDS-PAGE running buffer (192 mM Glycine, 25 mM Tris base, 0.1% SDS) with the BlueEye Protein ladder (Frog-gabio) at 90V until the ladder was well separated.

Avidin pull down

To perform Avidin pull-down experiments, either PC or PC(468-1178) was mixed with a 5-molar excess of purified MDH1-HIS and ME1. MDH1, PC and PC(468-1178) were purified as described above. For ME1, the protein was obtained by expressing an ME1-GST fusion protein in *E. coli* BL21 cells that were grown at 37°C to an O.D._{600nm} of 0.01. Expression of ME1-GST was induced for 16 h at 20°C with 20 μM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Bacterial pellets were resuspended and lysed in Lysis Buffer (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% DTT) and passed through a French Press. Lysed cells were centrifugated at 35,000 rpm in a Beckman 55Ti rotor for 45 min at 4°C. The supernatant was incubated 1 h, at 4°C with Glutathione Sepharose 4B (GSH; GE Healthcare) resin. After this, the resin was spun down washed three times with lysis buffer to remove non-specifically bound molecules followed by three washes with TEV buffer (20 mM Tris HCl = pH 7.4, 125 mM NaCl, 5 mM DTT) and incubated twice for 18 h at 4°C with 100 units of TEV protease. After the first 18 h, resin was spun down and supernatant was collected and reserved. New TEV was added and incubated again for 18 h. Both fractions were combined filtered and extensively dialyzed into 20 mM Tris HCl = pH 7.4, 250 mM NaCl, 5% Glycerol.

For control of non-specific binding to Avidin beads, PC or PC (486-1178) was not added to mixture. All of the following steps were performed for both PC, MDH1, ME or MDH1, ME1 alone. A mixture of PC, ME1 and MDH1 was dialyzed for 4 h into 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 12.5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 20% glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS at 4°C with rotation. Samples were recovered, and 1% of the mixture was reserved as input. The remaining portion of the mixture was transferred into an Eppendorf tube containing a 30 μL of slurry of Avidin beads (Pierce/ThermoFisher) prepared as described by the manufacturer. The protein mixture was incubated with the avidin beads for 1 h on a rocking platform at 4°C. The beads were washed three times with wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 12.5 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 20% glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS). To elute proteins from the beads, 50 μL of 6x SDS-loading buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 30% glycerol, 10% SDS, 1% bromophenol blue and 15% β-mercaptoethanol) was added to the mixture and boiled 3x for 10 min, then loaded on an SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membrane for western blot analysis.

Assembly of ternary complex

For assembly of the ternary complex, equimolar quantities of purified PC, MDH1 and ME1 were incubated together in assembly buffer (10% glycerol, 50 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 2 mM MnCl₂, 30 mM Tris-HCl, pH 7.55) supplemented with 5 mM ATP, 5 mM NADH, 5 mM NADPH and 0.2 mM TCEP on a rocking platform for 1 h at room temperature. SEC as described above was performed and the proteins eluted between 8 and 12 mL were taken for analysis. The sample was then concentrated using centricon mini tubes with a cut-off of 3 kDa.

SEC-MALS

SEC-MALS was performed using a microAкта (GE Healthcare) in-line with a Dawn HELEOS II (Wyatt Technology) and OptiLab T-rEX (Wyatt Technology). For data acquisition, ASTRA 6.1.6.5 (Wyatt Technology) software was used. Freshly prepared BSA (Sigma) and Aldolase (Sigma) were used as standards to normalize the detectors and align the signals at 280 nm absorbance. A Superdex 200 Increase column was used for the SEC portion of all experiments. The column flow rate was set to 300 μl/min and SEC buffer was as described above for protein purification. The flow from the column was collected in 0.5 mL fractions and protein content verified afterward on an SDS-PAGE gel with Coomassie staining. In addition, experiments containing MDH1 or assembled complexes were monitored for absorbance at both 280 nm and 340 nm. Before each experiment, the column and detector were equilibrated with running buffer overnight. The calibration constant for the Dawn Heleos II was determined for these experiments with $3.8200 \times 10^{-5} 1/(V \text{ cm})$. For the analysis, the data acquired from experiments with proteins of interest were aligned and band broadening and normalization was applied. For Aldolase, the dynamic radius was set to 4.8 nm and for monomeric BSA to 3.3 nm. After normalization, despiking of data was set to heavy and baselines as well as peaks were defined. Peaks were defined as half heights of peaks. For multiple peaks, peaks were manually adjusted. Detectors with low signal, high angle and low angle were disabled until fitting line of $K^*c/R(\theta)$ to $\sin^{1/2}(\theta/2)$ was diagonal. Molecular mass was determined using Zimm modeling. The dynamic radius was obtained by Rh from QLES in Astra with analysis standard parameters. Analysis was verified with the results fitting tool and by moving through the peak and molar mass.

Immunofluorescence

A minimum of 50,000 cells were seeded on 1.5 mm thickness coverslips and incubated for at least 48 h. Cells were washed twice with ice cool PBS and then fixed for 15 min with 4%PFA at RT. Then cells were washed three times for 5 min with 0.1 M glycine in PBS to inactivate PFA and stored in PBS 0.2%NaN₃ at 4°C until use. Cells were washed twice 5 min at RT with PBS to remove azide and then permeabilized with 0.1M glycine and 0.4% Triton X-100 in PBS for 5 min at 4°C. Then, they were incubated 3 times for 15 min with 3% BSA in PBS. Primary antibody was diluted in 3%BSA in PBS and 2% Donkey or 2% Goat serum. For dilutions of primary antibody see supplementary table S2. Primary antibody was added to coverslip and incubated in humidified chamber at 4°C overnight. Next day, the cells were washed 3 times with PBS 3%BSA for 10 min. Secondary antibody was diluted 1:1500 in 3%BSA in PBS and 2% Donkey or 2% Goat serum and incubated for 1 h at RT. Cells were then washed three times with PBS, excess PBS was removed and mounted on glass coverslips in Vectashield with DAPI. Edges were sealed off with nail polish and mounted cells were kept

for a minimum of 24 h at 4°C. On day of confocal imaging coverslips were removed from the fridge at least 1 h prior to imaging and put in microscope box to warm up to RT of the microscope. Images were taken randomly in at least 5 different regions of the coverslip to ensure representation of sample using the Zeiss Axio Imager Z2 upright microscope equipped with a CoolSNAP FX camera (Photometrics) and/or Axiocam camera and ZEN 2 blue and black edition software. Images were analyzed using ImageJ and Fiji. For quantification of DNA damage foci, PML nuclear bodies and mitochondrial fragmentation a minimum of 50 cells was counted and scored on microscope. For co-localization, we used an FV300 Olympus confocal microscope (Richmond Hill, ON) with a PMT first generation and Fluoview V4.2 Software. For super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM), images were taken with Super-Resolution microscope Axio Observer Z1 ZEISS Elyra PS.1, from Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). All raw data were acquired with EMCCD Du885K ISO VP461 camera. Images were taken with 5 rotations. To obtain the final image the structured illumination algorithm of ZEN 2.1 was used. For further confocal microscope imaging the Zeiss LSM 800 with spectral analysis detector was used. All images were acquired sequentially. The data was acquired with a maximal airy unit of 1. For colocalization, secondary antibodies were incubated sequentially to avoid cross-reactivity between the antibodies. To quantify the colocalization between HTC enzymes, foci containing signals for the three enzymes were counted in different cells. The background was subtracted, and brightness adjusted to the same level for all images. Pseudocolor was added and an overly image was generated using the merge color function of ImageJ. For this function double co-localization is shown in yellow and triple co-localization is shown in white. Colocalization was expressed as the number of foci with visible white signal. Colocalization was also measured using the Plot profile function of ImageJ. The fluorescent intensity for each pixel was determined across a line drawn as shown in Figure 2.

Immunohistochemistry

For TMA of prostate tissue sequential TMA slides were heated at 55 °C for 1 h followed by steps of sequential incubation in xylene (2 × 6 min), 100% ethanol (1 × 5 min), 95% ethanol (1 × 3 min), 75% ethanol (1 × 3 min) and 40% ethanol (1 × 3 min). Finally, samples were washed in dH₂O for 3 min.

Heat antigen retrieval was performed by using a steamer with the following settings, 45 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0). The steamer was started at RT and reached 95 °C in 15–20 min. Slides were then incubated for another 25–30 min. Slides were cooled and washed with PBS containing 0.3% Triton X-100 3 times for 3 min with 1 × TBS/0.3% Triton X-100. To inactivate endogenous peroxidases slides were incubated for 5 min at room temperature in a solution of 3% H₂O₂ followed by 3 washes for 3 min in 1 × TBS/0.3% Triton X-100. To delimit tissues a hydrophobic barrier pen (DAKO) was used. Tissues were blocked 1 h at RT with a protein-blocking serum-free ready-to-use reagent (DAKO, cat. no. X0909, Carpinteria, CA). Excess of blocking was tapped of and tissues were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in 5% goat serum in 1 × TBS/0.3% Triton X-100. Antibodies used were: anti-MDH1 (1:2000, Santa Cruz), anti-PC (1:500, Santa Cruz) and anti-ME1(1:500, Genetex). After overnight incubation samples were washed 3 times for 3 min in 1 × TBS/0.3% Triton X-100 followed by primary antibody detection using the LSAB2 System-HRP (DAKO, cat. no. K0675, Carpinteria, CA). Secondary biotinylated antibody (DAKO) was incubated for 30 min followed by washes as above. Finally, samples were incubated for another 30 min with streptavidin-HRP (DAKO) and washed as above. To reveal staining peroxidase with Di-amine-benzidine (DAB) substrate kit (SK-4100, Vector Labs., Burlington, ON) was used. To stop the reaction, slides were washed in tap water when the staining was sufficient; the same incubation time was applied to all samples.

For visualization, counterstaining with hematoxylin (HHS16, Sigma-Aldrich) was used and tissues were rapidly dehydrated by sequential incubation in 40% ethanol (1 × 1 min), 75% ethanol (1 × 1 min), 95% ethanol (1 × 1 min), 100% ethanol (1 × 1 min) and xylene (2 × 5 min). Slides were mounted in Cytoseal (8310-4, Thermo Fisher) mounting media and scanned with NanoZoomer 2.0-HT scanner (Hamamatsu). Images were processed with NDP.view 2.6.8 (NanoZoomer Digital Pathology.view 2.6.8) (Hamamatsu) and ImageJ.

Tissue Micro Arrays were purchased from US Biomax (catalog no. PR807c, Rockville, MD). TMAs from US Biomax were reviewed by two board-certified pathologists. Quantification was done by two independent persons and combined. In case of disagreement, the mean of both intensities was taken. There was no occurrence of disagreement by more than 1 score point. Mouse samples IHC were performed at the Molecular Pathology platform of CR-CHUM following the platform protocol <https://www.chumontreal.qc.ca/en/crchum/facilities-and-services>. For quantification, three sections were selected blindly by one person based on histology for prostate epithelial tissue. For Pten^{-/-}, six sections were selected to better represent diversity of the tissue. It is important to notice that Pten^{-/-} knockout is only present in the prostate epithelial cells and all other cells in the prostate still contain Pten. For one Pten^{-/-} sample, only two sections were selected as there was little prostate epithelial cell regions identified. All selected sections were then scored by two independent persons for Ki67, MDH1, ME1 and PCX staining intensity according to a scoring key and scoring was combined. In case of disagreement, the mean of both intensities was taken. There was no occurrence of disagreement by more than 1 score point.

STAT3-ATAD3A Proximity ligation assay (PLA)

PLA was done using Duolink® *In Situ* Green Starter Kit Mouse/Rabbit according to manufacture instructions. To prepare wash buffer A 1 pouch of wash buffer A powder was solubilized in 1L of MilliQ Water. To prepare wash buffer B 1 pouch of wash buffer B was solubilized in 1L of MilliQ Water. Wash buffers were kept at 4°C for no longer than 1 month. Prior to use, wash buffers were warmed to RT.

To prepare cells for PLA, IMR90 fibroblasts were plated on coverslips and incubated for 48 h at 37°C. Cells were fixed using 4% PFA in PBS for 10 min. This followed by a two 5-min wash with PBS 0.1M Glycine. Cells were permeabilized with PBS 0.1M Glycine and 0.4% Triton X-100 for 5 min at 4°C. Cells were then blocked using Duolink blocking buffer for 1 h at 37°C. Primary antibodies were diluted with Duolink antibody dilution and incubated in humidified chamber overnight at 4°C. The cells were washed 3x5 min in 1x Wash Buffer A at room temperature. PLUS and MINUS PLA probes were diluted to 1x in the Duolink® Antibody Diluent and incubated on cells in a humidified chamber for 1 h at 37°C. The cells were washed 3x 5 min in 1x Wash Buffer A at room temperature. Ligase solution was prepared by diluting Duolink® Ligation buffer to 1x and 1 µL of ligase was added for each 40 µL of 1x ligation buffer. Ligation mixture was added on cells in a pre-heated humidity chamber for 30 min at 37°C followed by 3 washes in 1x Wash Buffer A at room temperature. Amplification solution was prepared by diluting Duolink® Amplification buffer to 1x and 1 µL of Polymerase was added for each 80 µL of 1x Amplification buffer. Polymerase was incubated for 2 h at 37°C in a pre-heated humidity chamber followed by washes of 3x 10 min in 1x Wash Buffer B at room temperature and a final wash of 0.01x Wash Buffer B for 1 min. Cells on the coverslips were mounted using Vectorshild with DAPI and analyzed no later than 48 after the experiment using the confocal microscope LSM800 as described before. To analyze PLA staining in ImageJ, Circle ROI with a diameter of 5 µm was defined. The background was subtracted and the threshold was set. A binary image was created and analyzed using Analyze Particle with the following settings: Max size of particle 2 µm² and circularity of 0.5-1.

PC-MDH1 and PC-ME1 Proximity ligation assay (PLA)

PLA was done using Duolink Multicolor Kit with red and green conjugation kits. Conjugation of primary antibodies to green and red oligos was done according to manufactures instructions and conjugated antibodies were stored at 4°C. PLA on cells was performed according to manufacturer's protocol with the following modifications The conjugated antibodies were further diluted using antibody diluent for PC-MDH1 1/75 and for PC-ME1 1/50 and incubated overnight at 4°C. For ligation the multicolor ligase was diluted 1/20 and incubated for 30 min at 37°C. The amplification step was carried out for 120 min at 37°C and the detection step for 45 min at 37°C.

For PLA on tissue, the following modification to the manufacturer's protocol was done. Preparation of tissue slides was done as described in immunohistochemistry. Briefly, paraffin-embedded tissue samples were heated at 55 °C for 20 min followed by incubation in xylene (3 × 5 min), 100% ethanol (2 × 5 min), 95% ethanol (1 × 5 min), 75% ethanol (1 × 5 min) and 40% ethanol (1 × 3 min). Followed by two wash in ddH₂O. Antigen retrieval was performed by heating in a steamer for 45 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) with 0.3% Tween 20. The steamer was started at RT and reached 95 °C in 15-20 min. Slides were then incubated for another 25-30 min. Slides were cooled and cells were permeabilized with PBS containing 0.4% Triton X-100 and 0.1M Glycine for 10 min. Slides were washed two times in PBS followed by blocking. For blocking the Duolink block buffer was used and washing times were increased to 10 min and performed 4 times with wash buffer A. Image acquisition was done as described above. For quantification of colocalization of PLA signal (Figure 2 G) the filter set 77 of Zeiss was used as such the colocalization appears as yellow color where no colocalization is seen as red or green in the oculars. For intensity scoring of PLA colocalization signal (Figure 2H) signal intensity of green and red for a given foci is the square root of multiplication of green and red fluorescent intensity. For analysis 15 random foci per condition were chosen.

Electron microscopy and colloidal gold immunocytochemistry

Electron microscopy and colloidal gold immunocytochemistry were performed according to (Fouillen et al., 2017). 1x10⁷ cells were recovered using Trypsin, washed twice with 0.1M Phosphate Buffer (PB) pH 7.3 (Sambrook Cold Spring Laboratory protocols) and fixed for 30 min at 4°C on a rocking platform using freshly prepared PLP (Periodate L/Lysine paraformaldehyde) fixative consisting of 4% PFA, 0.01 M NaIO₄ and 0.028125 M L-lysine monochloride (Sigma) in 0.1 M PB, then filtered with 0.45 µm filter to remove residual impurities. After fixation cells were washed 3x with PB pH 7.3. Cells were post-fixed for 1 h with 1% potassium ferrocyanide-reduced osmium tetroxide, dehydrated with graded ethanol and then processed for embedding in LR white resin (London Resin Company; Berkshire, UK) as previously reported (Fouillen et al., 2017). Ultrathin 80–100 nm sections were prepared using a diamond knife and transferred onto Formvar®-coated (polyvinyl formate) 200-mesh nickel grids.

For ultrastructural analysis of mitochondria, some ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined either in a FEI Tecnai 12 (Eindhoven, the Netherlands) transmission electron microscope operating at 120 kV or in a Hitachi Regulus 8220 (Tokyo, Japan) scanning electron microscope operating at 30 kV in Bright STEM mode.

For post-embedding colloidal gold immunocytochemistry, some ultrathin sections were incubated with an aqueous solution of 5% sodium metaperiodate for 45 min and washed with distilled water. The nickel grids were then floated on a drop of blocking solution consisting of 1% Ovalbumin in 0.01 M PB for 15 min to avoid non-specific binding, then transferred onto a drop of primary antibody (anti-PC 1:200) and incubated overnight at 4°C. Grids were then rinsed with PB and placed in blocking solution for 15 min. Antibody-antigen complexes were then revealed by floating the grids on a drop of protein A-10 nm colloidal gold complex for 30 min. Negative controls consisted of incubations with protein A-gold alone. Sections were then stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined in a FEI Tecnai 12 (Eindhoven, the Netherlands) transmission electron microscope operating at 120 kV.

NAD⁺/NADH, NADP⁺/NADPH and glutathione measurements

For NAD⁺/NADH measurements, approx. 50,000 cells were plated for technical triplicates in 6 cm plates and incubated for 48 h and processed by a kit from BioVision. Briefly, cells were sonicated 2x for 15 s and lysates were diluted 5 to 20 times to remain in the linear

range of the kit. For NADP⁺/NADPH measurements, approx. 1,000,000 cells were seeded in triplicate and incubated for at least 48 h. Cells were lysed by sonication twice for 15 s, spun at 13000 rpm in a 10 kDa Spin column to remove endogenous proteins and lysates were assayed using a NADP⁺/NADPH quantification kit (BioVision) according to manufacturer's instructions. For glutathione measurements approx. 5,000,000 cells were plated in technical triplicates, grown for 48 h, harvested in PBS pH 6.0 and 0.1% NP40, lysed by sonication on ice twice for 10 s, spun with a 10k Da Spin column to remove endogenous protein and then analyzed using Abcam Glutathione kit according to manufacturer's instructions. For all three assays, protein content was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad) according to manufacturer's instructions. All assays were carried out in biological triplicates (cells generated from different infections). For NAD and NADP quantification in Figure 4 and Figure S6 same extracts were used to further compare samples.

qPCR

To analyze mRNA expression, cells were collected in Trizol (#15596018, Invitrogen) and RNA extraction was performed according to the manufacturer's instructions. For cDNA preparation, 2 µg of total RNA were reverse transcribed in a 20 µL reaction using the 5X All-In-One RT kit (G590, ABM, Richmond, BC, Canada) as per the manufacturer protocol. Reverse transcription products were diluted 10 times with pure water prior to real-time quantitative PCR. Reactions for qPCR were performed in technical triplicate using 1 µL of diluted cDNA samples per 10 µL reaction volume also containing: 0.25 µM of each primer (synthesized by Biocorp), 0.2 mM dNTP (DD0056, BioBasic), 0.33X Syber Green I (S7563, Invitrogen), 0.25U Jump Start Taq DNA polymerase (D9307, MilliporeSigma) in 1x reaction buffer (provided with the enzyme) enrich with 2.5 mM more of MgCl₂ (M1028, Sigma). The LightCycler 96 Real-Time PCR System (Roche Applied Science) was used to detect the amplification level and was programmed to an initial step of six minutes at 95°C, followed by 50 cycles of 20 s at 95°C, 20 s at 58°C and 20 s at 72°C. A high resolution melting from 60°C to 98°C followed the amplifications. All reactions were run in triplicate and the average values were used for relative quantification of target genes using the $\Delta\Delta CT$ method. Outlier of triplicates were excluded if the value was 1 cq different than average.

Prior to use, primers' efficiency was determined by a minimum of 4 serial dilutions and efficiency of amplification between 1.95 and 2.05 was accepted. Primers were validated to show just one amplification product either by running product on agarose gel after PCR or unique peak in melting curves. Primers were designed to be intron spanning where possible. To test for DNA contamination and other contaminants in qPCR a control with no RT was used and a Cq higher than 35 was considered negative for DNA contamination. For normalization TBP and HMBS were used in IMR90 as both mRNA were previously validated to be good housekeeping genes in this cell line (Lessard et al., 2018). For MEFs TBP, HMBS and β -actin were used as housekeeping genes (Deschênes-Simard et al., 2013). Variation of less than 1 Cq in housekeeping genes between conditions was considered acceptable. qPCR primers are presented in Table S1.

MitoSox and DCFDA measurements

ROS measurements were done as described previously (Moiseeva et al., 2009) at the FACS CORE Facility of IRIC Research Center at the University of Montreal, Canada. Briefly, cells were incubated at 37°C for 30 min with either MitoSox (Molecular Probes, Eugene, OR) or H₂DCFDA (Molecular Probes). Cells were collected using Trypsin and washed twice with PBS. Cells were resuspended in 500 µL of HBSS for sorting in the BD FACSCanto II system ran with DiVa analysis software. Acquired data were further analyzed using FlowJO software.

Mitochondrial purification

For PC localization studies, mitochondria were purified using Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Abcam) according to manufacturer's instructions. For mitochondrial STAT3 levels in senescent cells mitochondria were purified by immunoprecipitation according to (Chen et al., 2017). For each experiment, an anti-HA immunoprecipitation was performed on IMR90 cells expressing 3XHA-EGFP-OMP25 and RASV12 or an empty vector. At day 12 post-infection, five 10 cm plates of cells were washed twice with PBS and then scraped into 1 mL chilled KPBS buffer (136 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, pH 7.25). The following steps for mitochondrial isolation and metabolite extraction were performed as described in (Chen et al., 2017), except for the incubation with magnetic beads, in which the supernatants were incubated with 30 µL of prewashed anti-HA magnetic beads (88837; ThermoFisher Scientific) on a vertical-rotating mixer for 20 min. Proteins were eluted by adding 100 µL 6x SDS loading buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 30% glycerol, 10% SDS, 1% bromophenol blue and 15% β -mercaptoethanol) and then analyzed by SDS-PAGE. Immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane for western blot analysis. The efficiency of mitochondrial purification was assessed with anti-TOMM20 antibodies and the efficiency of immunoprecipitation was assessed using an immunoblot against HA.

Animals

Transgenic male mice with prostate-specific deletions of Stat3, Pten and double Stat3 and Pten deletion (Pencik et al., 2015) were sacrificed at 19-weeks old and their prostate were collected and frozen in OCT for cryosections or in RNAlater (Invitrogen) for RNA and protein extraction. For further information on the mouse model please refer to (Pencik et al., 2015). For immunohistochemistry, a piece of tissue treated with RNAlater was washed with PBS, incubated for 8 h in 15% sucrose in PBS and then 16 h in 30% sucrose in

PBS at 4°C and then fixed in 10% formalin for 24 h at 4°C. After fixation and embedding into paraffin, 4 µm serial sections were cut to perform immunohistochemistry according to CR-CHUM histology core platform. For antibodies see Table S2.

Allografts were performed as described (Deschênes-Simard et al., 2013) using 7 weeks old male NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (also called NRG) mice injected subcutaneously in both flanks with 100 µL of a premixed solution 1:1 of Matrigel (BD Biosciences) and PBS-resuspended cells at 4°C, containing 1×10⁶ MEFs cells expressing the different vectors. Tumor formation was evaluated over a period of 40 days. Tumors volumes were assessed with a caliper every two days as soon as the tumors were palpable, and mice were euthanized before 40 days if tumor volume reached 1.5 cm³. At endpoint, half of each tumor collected was flash-frozen for RNA and protein purification and the other half was fixed in 10% neutral buffered formalin (Sigma) for at least 72 h before paraffin embedding.

Serial sections of 4 µm of each tumor were then cut at the Molecular Pathology platform of CR-CHUM and immunohistochemistry was performed, as described above. For histopathology analysis, H&E staining was done at the CR-CHUM Molecular Pathology facility and evaluated by the histopathology laboratory of Dr. Trudel. For RNA and protein extractions, tumor pieces were transferred into Eppendorf tubes and immediately flash-frozen in liquid nitrogen and then kept at –80°C until further use. For RNA isolation, Trizol was added to frozen tumor samples and then tumors were homogenized using a POLYTRON® PT 1200 E (Kinematica). For protein extraction, frozen tumor samples were also homogenized, but only in Læmmlí 2x buffer (4% SDS, 20% glycerol, 120 mM Tris-HCl pH 6.8) instead. Extracted proteins were quantified using Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce) and equal amount of proteins were run in SDS-PAGE. All mice work was approved by the ethics committee of the CR-CHUM. The following formula was used to determine tumor volume considered as an ellipsoid after measuring the diameter in x, y and z axis.

$$V = \frac{4\pi \frac{h}{2} \frac{w}{2} \frac{l}{2}}{3} = \frac{4\pi \frac{hwl}{8}}{3} = \frac{\pi hwl}{6}$$

where, h: height, w: width, l: length. Each measured dimension is divided by two to get the radius of tumors.

Stable Isotope Tracer Analysis

8×10⁵ cells were seeded in 10-cm dishes to obtain cells at 80% confluency. The media was removed and replaced with fresh DMEM containing 25 mM glucose without pyruvate to equilibrate the cells for 2 h for experiment with fully labeled glucose. For tracer analysis with 3-¹³C-glucose or 3-4 ¹³C₂-glucose equilibration media contained 10 mM of Glucose. The equilibration media was replaced with DMEM containing either 25 mM ¹³C₆-glucose (389374, Sigma Aldrich, Oakville, ON)-labeled media or 10 mM 3-¹³C-glucose (CLM-1393, Cambridge Isotope Laboratories, Cambridge, MA)- or 10 mM 3-4 ¹³C₂-glucose (CLM-6750-PK Cambridge Isotope Laboratories) for 2 min, 10 min, 1 h or 4 h.

The media was discarded and cells were washed 3x with 4°C isotonic saline solution on ice and quenched with 600 µL of 80% methanol at < –20°C on dry ice. Cells were scraped from the plates and transferred to prechilled tubes. Cell suspensions were lysed using a sonicator at 4°C for 10 min in cycles of 30 s on, 30 s off, at high setting with Diagenode Bioruptor. Sonication was repeated to ensure complete recovery of metabolites. Cell debris were removed by centrifugation (14000 rpm, 4°C) and supernatants were transferred to prechilled tubes and dried in a cold trap overnight at 4°C. Dried pellets were dissolved in 30 µL of pyridine containing methoxyamine-HCl (10 mg/mL) using a sonicator and vortex. Samples were spun down at 14000 rpm, incubated for 30 min at 70°C and then transferred to GC-MS injection vials containing 70 µL of N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide (Sigma). The sample mixtures were further incubated at 70°C for 1 h. One µL of each sample was injected for GC-MS analysis. GC-MS instrumentation and software were all from Agilent. GC-MS methods and mass isotopomer distribution analyses are as previously described (Gravel et al., 2016). Briefly, GC/MS analysis was conducted on an Agilent 5975C series GC-MSD with triple-axis HED/EM detector, equipped with DB-5MS + DG capillary column (30 m length, 10 m Duraguard deactivated fused silica tubing, 0.25 mm internal diameter, 0.25 µm film thickness) (Agilent, USA) and a 7890A gas chromatograph, with a 7693 autosampler.

1 µL sample was injected in the GC in splitless mode with inlet temperature at 280°C with helium gas as the carrier at a flow rate at 1.552 mL/min. The quadrupole was set at 150°C and the GC/MS interface at 285°C. The oven program for all metabolite analyses started at 60°C held at 1 min and increased at a rate of 10°C/min up to 320°C. Bake-out was at 320°C for 9 min. All data was collected by electron impact set at 70eV. Sample data were acquired both in scan (1-600 m/z) and selected ion monitoring (SIM) modes.

Metabolites were identified by matching mass spectra and retention times using authentic standards from Sigma. Measurements of metabolite concentrations are taken from the metabolite quantifier integration divided by the internal standard quantifier integration (myristic acid-D₂₇) and normalized to cell count. For stable isotope tracer analysis, the integration values for quantifier (m+0) and all possible isotopomers (m+1, m+2, etc...) are summed up to obtain the total amount of metabolite. The mass isotopomer distribution (MID) vector is obtained by dividing the m+0 and all isotopomer by the total amount of metabolite. The corrected MID is obtained by removing the contribution of naturally occurring stable isotopes (McGuirk et al., 2013). The resulting isotopomers are expressed as fractions of the total metabolite pool. To determine the relative ion abundance, the corrected MID is multiplied by the relative metabolite amount at steady state.

Data analysis was performed using the Agilent Chemstation and MassHunter software (Agilent, Santa Clara, USA). For labeling experiment leading to Figure 1, Figure 4 and Figure S6 experiments control cells (shNTC) and senescent cells (shS3[A]) are the same as all 4 conditions (shNTC, shS3[A], shS3[A]+ shp53, and shS3A+HTC) were done together. Biological replicates were performed on independent infections.

Bioenergetic Analyses

Cellular respiration in the Seahorse Analyzer was measured as described previously (Audet-Walsh et al., 2016). Briefly, IMR90 cells (7,500 growing or 5000 senescent) were seeded in 250 μ L of culture media in a XFe24 cell culture plate and incubated for 24 h at 37°C. Cells were washed twice and incubated in 525 μ L of XF media for 1 h at 37°C in a CO₂-free incubator. Measurements were normalized to μ g protein.

Nucleotide and nucleoside analysis

5x10⁶ cells were washed twice with 150 mM ammonium formate and collected in 80% methanol (LC-MS grade, Sigma) chilled to –80°C. Every step was performed on dry ice. The methanol:cell mixture was transferred into pre-chilled 2 mL Eppendorf tubes containing 1.4 mm ceramic beads, then beaten on bead beater for 2 min at 30 Hz. After this, we added an equal volume of ice-cold dichloromethane and half the volume of ice-cold H₂O. The mixture was vortexed for 1 min at maximum speed and left for 10 min on ice. Samples were spun at 4000 rpm at 1°C and the aqueous phase was transferred into a new pre-chilled Eppendorf tube. Samples were dried overnight in a cold trap (Labconco). Samples were suspended and prepared for LC-MS/MS as described above. Data acquisition was performed on Agilent 6430 Triple Quadrupole LC/MS system.

Bioinformatic analysis

Expression of HTC enzymes to find cell lines with high expression was analyzed from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (Ghandi et al., 2019).

To generate representation of genes shown in Figure S4 we used UCSC genome Browser with different tools. For p53 ChIP seq depth and SISR peaks dataset (data are shown in green) the tool p53 ChIP seq depth and SISR peaks dataset was used. This dataset comes from 41 ChIP-seq data analyzed with a common pipeline. In order to get representation the sequence must be found in at least two independent studies. For further information on the pipeline and analysis parameters see Nguyen et al. (Nguyen et al., 2018). Additional p53 and E2F binding sequences were obtained in ChIP Atlas and positions extracted from UCSC genome Browser using Transcription factor ChIP-Seq Clusters (161 factors) from ENCODE. For further information see ENCODE integrative analysis (Consortium, 2012; Davis et al., 2018) and for CHIP Atlas (Oki et al., 2018). Information on H3K27Ac marks on 7 cell lines (Often Found Near Regulatory Elements shown in red) was extracted from ENCODE (Consortium, 2012; Davis et al., 2018). Promoter regions (shown in pink) were extracted from EPDnewNC human version 001 and GeneCards genes TSS v4.14 (Fishilevich et al., 2017; Stelzer et al., 2016). Data for known or predicted gene enhancer regions were extracted using Interactions between GeneHancer regulatory elements and genes tool (double elite) v4.14 (Fishilevich et al., 2017; Stelzer et al., 2016).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

For Statistical analysis unpaired two-tailed Student's t test or ANOVA with compensation of multiple comparison with Dunnett, Tukey or Šidák based on Prism 9 recommendations for experimental design was performed unless stated otherwise in the figure legend using Graph Pad Prism 6-9 and Excel. A value of $p < 0.05$ was considered significant. For statistical analysis technical replicates were averaged prior to statistical analysis. In figures, data is shown unless stated otherwise as mean \pm SD of data from independent experiments and the p value was indicated with three digits after decimal or $p \leq 0.05$ equal to *, $p \leq 0.01$ equal to **, $p \leq 0.001$ equal to *** and $p \leq 0.0001$ equal to ****. For analysis of immunohistochemistry we used Mann-Whitney non-parametric test, two tailed using Graph Pad Prism 6-9. Details of statistical test were deposited with data on Mendeley: <http://doi.org/10.17632/xsxwjfhz8f.1>

ADDITIONAL RESOURCES

Further details senescence bypass experiments can be found in additional resources on Mendeley Data

For additional information on immunogold staining www.me-udem.com

For additional information on immunohistochemistry performed by the CR-CHUM core facility

<https://www.chumontreal.qc.ca/en/crchum/facilities-and-services>

For additional information of metabolic tracing analysis <https://www.mcgill.ca/gci/facilities/metabolomics-innovation-resource-mir>