

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : Cancérologie

Par

**Charles RICORDEL**

## **Les protéines ING2 et ING3 : identification de nouvelles fonctions et implication en cancérologie**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 10/01/2022

Unité de recherche : Unité INSERM UMR1242 Chemistry Oncogenesis Stress Signaling (COSS)

### **Rapporteurs avant soutenance :**

**Béatrice EYMIN**

Directrice de recherche | Université de Grenoble Alpes

**David BERNARD**

Directeur de recherche | Université de Lyon

### **Composition du Jury :**

**Marie-Dominique GALIBERT-ANNE**

Directrice de recherche | Université de Rennes 1

Présidente

**David BERNARD**

Directeur de recherche | Université de Lyon

Rapporteur

**Virginie WESTEEL**

Professeur en médecine | Université de Besançon

Examineur

**Béatrice EYMIN**

Directrice de recherche | Université de Grenoble Alpes

Rapporteur

**Luc FRIBOULET**

Chargé de recherche | Institut Gustave Roussy

Examineur

**Rémy PEDEUX**

Chargé de recherche | Université de Rennes 1

Directeur de thèse

**Benoit DESRUES**

Professeur en médecine | Université de Rennes 1

Co-directeur



## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier en premier lieu ma compagne **Mathilde**, pour son soutien formidable et sans faille au quotidien. Elle est pour beaucoup dans la concrétisation de ce manuscrit de thèse. Merci pour ton amour. Merci d'être là.

Je tiens à remercier mon fils **Léandre** pour le bonheur qu'il m'apporte tous les jours. Son arrivée dans ma vie, au cours de cette thèse, est la plus belle chose qui me soit arrivée. Ce travail l'aura rendu franco-canadien.

Merci à mes parents, mon frère et mes deux sœurs, qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans tous mes projets.

J'adresse ma gratitude à mon directeur de thèse, le Dr **Rémy Pedeux**. Merci pour ta disponibilité et tes conseils prodigués lors la conduite de mon projet de thèse, toujours avec bienveillance. Je remercie le Pr **Benoît Desrués** pour avoir co-dirigé ma thèse. Sa confiance et l'aide qu'il m'accorde dans le cadre de mon projet professionnel m'honore.

Un grand merci au Dr **Béatrice Eymin** et au Dr **David Bernard** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Merci au Pr **Marie-Dominique Galibert**, Dr **Luc Friboulet** et Pr **Virginie Westeel** pour avoir accepté de juger mon travail et assister à ma soutenance de thèse.

J'aimerais aussi adresser mes remerciements à l'équipe de recherche canadienne qui m'a accueilli pendant un an. Merci au Pr **Karl Riabowol** pour sa gentillesse, son expertise scientifique remarquable et ses échanges toujours constructifs. Merci au Dr **Gwyn Bebb** pour son accueil et pour m'avoir fait confiance pour la valorisation de la cohorte Glans-Look.

Je tiens à remercier chaleureusement tous mes collaborateurs, qui ont chacun apporté, à leur échelle, une pierre à cet édifice. Des pierres fondatrices, sans lesquelles ce travail n'aurait pu être possible. C'est à ce titre que je remercie toutes les personnes qui vont suivre.

Je remercie **Audrey** pour son esprit pétillant et son incroyable courage. Merci pour toute l'aide que tu m'as apporté au cours de cette thèse. À très bientôt future consoeur.

Merci à la « RP team », **Jérôme, Alice, Marine, Charlie** et **Laura** pour m'avoir aidé et souvent dépanné sur mes dernières années de thèse. Merci à **Marie**, à l'origine du « projet mitochondrie ». Merci à **Florence** pour son soutien logistique et technique. Avoir travaillé à tes côtés a été une chance. Merci à **Agnès**, que je salue pour sa patience et son savoir-faire en microscopie.

Merci à toute l'équipe du laboratoire COSS pour savoir encadrer les thésards dans une ambiance bienveillante. Bravo à **Eric** et **Rémy** pour maintenir ce « petit monde » en cohésion.

Merci à l'équipe polyglotte du « KR Lab ». Un grand merci à **Subash**, une grande âme. J'espère que nos chemins se croiseront dans le futur. Merci à **Arthur** pour sa bonhomie et le partage de ses passions (Go Flames Go !). Merci à **Jessica** et ses bons tuyaux. Merci à **Yang Yang** pour avoir partagé un peu de paillasse et m'avoir introduit à la culture chinoise. Merci à **Angela** et **Michelle** pour leur

professionnalisme et leur collaboration technique de haut vol. Cette année au Canada n'aurait pas été aussi belle sans vous tous.

Merci à **Arash Nabbi** et au Dr **Olivier Binda** pour m'avoir fait confiance et partagé leur projet de recherche avec moi.

Enfin, je remercie mes collègues cliniciens du service de Pneumologie pour leur soutien sans qui le temps m'aurait manqué pour réaliser cette thèse. Je mesure la chance d'avoir intégré une telle équipe de professionnels engagés, passionnés et fraternels.

Un immense merci à **Hervé** pour son aide, sa confiance et ses qualités humaines. C'est une chance de travailler à tes côtés. Que tu le veuilles ou non, tu es un exemple pour moi.

Merci à **Stéphane**, pour me guider et m'aider à éviter les embuches du parcours HU. Je salue ton courage et ton engagement pour le service qui est admirable.

Merci à mes co-CCAs, **Alexis** et **Alexandre**. Votre humour communicatif et indéfectible va définitivement me manquer sans oublier votre tendance à la « gamelle » à la pause déjeuner.

Merci à **Graziella, Romain, Chantal, Mallorie, Cécile, Yannick, Camille, Clémence** et **Lisa** pour votre soutien et compréhension.

J'aimerais enfin remercier les financeurs de ce projet de thèse : le **FHU CAMin** pour avoir financé les deux premières années de ma thèse, la **Fondation Nuovo-Soldati** et le **CHU de Rennes** pour avoir contribué au financement de ma mobilité internationale.



# TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	5
PRÉAMBULE .....	8
INTRODUCTION .....	10
<b>1 Généralités sur la biologie du cancer .....</b>	<b>11</b>
1.1 Point de vue historique.....	11
1.1.1 Définition et découverte des oncogènes .....	11
1.1.2 Définition et découverte des gènes suppresseurs de tumeur.....	12
1.2 Les bases moléculaires de la tumorigénèse .....	13
1.2.1 Echelle génomique.....	14
1.2.2 Echelle épigénétique .....	15
1.2.2.1 Méthylation de l'ADN .....	15
1.2.2.2 Modification des histones.....	16
1.2.2.3 Rôle des longs ARN non codants .....	18
1.2.3 Echelle post-transcriptionnelle .....	19
<b>2 Les gènes <i>ING</i>.....</b>	<b>20</b>
2.1 Présentation de la famille de gènes <i>ING</i> .....	20
2.1.1 Historique de la découverte des gènes <i>ING</i> .....	20
2.1.2 Phylogénétique de la famille de gènes <i>ING</i> .....	21
2.2 Famille de gènes <i>ING</i> : structure et régulation de l'expression .....	22
2.2.1 Structure des gènes <i>ING</i> .....	22
2.2.2 Régulation par mi-ARN .....	25
2.3 Protéines <i>ING</i> : structure et modifications post-traductionnelles .....	27
2.3.1 Structure .....	27
2.3.1.1 Région C-terminale.....	27
2.3.1.2 Région N-terminale.....	28

2.3.2	Modifications post-traductionnelles .....	29
2.3.2.1	Phosphorylation .....	31
2.3.2.2	Sumoylation .....	31
2.3.2.3	Ubiquitylation .....	32
2.3.2.4	Citrullination .....	32
2.4	Fonctions communes aux membres de la famille ING .....	33
2.4.1	Appartenance aux complexes protéiques HAT ou HDAC .....	33
2.4.1.1	Etudes chez la levure .....	33
2.4.1.2	Données chez l'homme .....	34
2.4.2	Interactions avec les marques d'histones H3K4me3.....	34
2.4.3	Existence d'un lien fonctionnel avec la protéine suppressive de tumeur p53.....	35
<b>3</b>	<b>La protéine ING2 : caractérisation d'un gène suppresseur de tumeur .....</b>	<b>36</b>
3.1	Fonctions suppressives de tumeurs.....	36
3.1.1	Fonction suppressives de tumeur « gatekeeper ».....	36
3.1.1.1	Régulation de la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose et le cycle cellulaire	36
3.1.1.2	Régulation de la transcription dépendante du TGF- $\beta$ et de la prolifération cellulaire	37
3.1.1.3	Régulation de l'acétylation de p53, p73 $\alpha$ et inhibition de la prolifération cellulaire.	37
3.1.2	Fonction suppressives de tumeur « caretaker ».....	38
3.1.2.1	Implication dans la réponse aux dommages de l'ADN.....	38
3.1.2.2	Contrôle de la réplication de l'ADN et de la progression du cycle cellulaire.....	39
3.2	Perte d'expression dans les tumeurs humaines.....	40
3.3	Apport des modèles animaux.....	43
<b>4</b>	<b>La protéine ING3 : une ambivalence fonctionnelle dans la cellule tumorale.....</b>	<b>43</b>
4.1	Fonctions suppressives de tumeur.....	43
4.1.1	Membre constitutif du complexe Nu4/Tip60 .....	43
4.1.2	Fonction suppressive de tumeur « gatekeeper » .....	44

4.1.3	Fonction suppressive de tumeurs « caretaker ».....	44
4.1.3.1	Contrôle de la progression du cycle cellulaire.....	44
4.1.3.2	Implication dans la réponse aux dommages de l'ADN.....	45
4.2	Fonctions oncogéniques .....	46
4.3	Niveau d'expression dans les tumeurs humaines .....	46
<b>5</b>	<b>Relation des gènes suppresseurs de tumeur avec le compartiment mitochondrial.....</b>	<b>49</b>
5.1	Généralités sur la mitochondrie.....	49
5.1.1	Origine et structure.....	49
5.1.1.1	Théorie endosymbiotique.....	49
5.1.1.2	Structure mitochondriale.....	49
5.1.1.3	Dynamique mitochondriale .....	50
5.1.1.4	Génomique mitochondriale chez l'homme .....	52
5.1.2	Rôle biologique de la mitochondrie .....	59
5.1.2.1	Les oxydations phosphorylantes.....	59
5.1.2.2	Autres rôles.....	61
5.1.3	Import des protéines mitochondriales .....	64
5.1.3.1	Transport vers l'espace inter membranaire.....	64
5.1.3.2	Import des protéines avec séquences d'adressage vers la fraction interne mitochondriale .....	64
5.1.3.3	Import des protéines au sein de la membrane externe mitochondriale .....	65
5.1.3.4	Import protéique dans l'espace intermembranaire par relais de ponts disulfures ..	65
5.1.3.5	Import des protéines vers la membrane interne.....	66
5.2	Dérégulation du métabolisme mitochondrial dans les cellules tumorales.....	66
5.2.1	Effet Warburg.....	66
5.2.2	Adaptation métabolique des cellules tumorales .....	67
5.2.2.1	Glycolyse anaérobie dans les cellules tumorales .....	68
5.2.2.2	Métabolisme mitochondrial dans les cellules tumorales .....	69

5.2.2.3	Effet Warburg inversé .....	69
5.3	Gènes suppresseurs de tumeur à localisation mitochondriale .....	70
5.3.1	Exemple de p53 .....	70
5.3.1.1	Impact sur la phosphorylation oxydative .....	70
5.3.1.2	Impact sur la maintenance de l'ADN mitochondrial .....	71
5.3.1.3	Rôle direct dans l'apoptose intrinsèque .....	72
5.3.2	Exemple de ING1 .....	72
<b>OBJECTIFS</b>	.....	<b>74</b>
<b>RÉSULTATS</b>	.....	<b>76</b>
<b>1</b>	<b>ARTICLE N°1</b> .....	<b>77</b>
<b>2</b>	<b>ARTICLE N°2</b> .....	<b>107</b>
<b>3</b>	<b>ARTICLE N°3</b> .....	<b>150</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	.....	<b>181</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	.....	<b>192</b>
<b>ANNEXES</b>	.....	<b>212</b>

# **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

**3' UTR** : 3' Untranslated Transcribed Region

**53BP1** : p53-Binding Protein 1

**AAG** : Alkyladenine DNA Glycosylase

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ADP** : Adénosine Di-Phosphate

**AIF** : Apoptosis-Inducing Factor

**ALR** : Augmenter of Liver Regeneration

**APAF-1** : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1

**APE1** : APurinic/aprimidinic Endonuclease 1

**ARE** : Angrogen Response Element

**ARN** : Acide RiboNucléique

**ATP** : Adénosine Tri-Phosphate

**ATM** : Ataxia-Telangiectasia Mutated

**BAM** :  $\beta$ -barrel assembly machinery

**BAK** : Bcl-2 homologous Antagonist Killer

**BAX** : Bcl-2-Associated X

**BCL-2** : B-cell lymphoma 2

**BER** : Base Excision Repair

**BRCA1** : BReast CAncer 1

**CCLE** : Cancer Cell Line Encyclopedia

**CDKN** : Cyclin Dependent Kinase

**CHCHD4** : Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 4

**D-Loop** : Displacement Loop

**DNMT** : DNA MethylTransferase

**Drp1** : Dynamin-related Protein 1

**E2F1** : E2F Transcription Factor 1

**EAF6** : Esa1-Associated Factor 6

**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor

**EPL1** : Enhancer of Polycomb-Like protein 1

**ERBB2** : ERythroBlastic oncogene B 2

**ERR $\alpha$**  : Estrogen-Related Receptor alpha

**EXOg** : Exo/Endonuclease G

**EZH2** : Enhancer of Zeste Homolog 2

**FADH2** : Flavine Adénine Dinucléotide réduite

**FEN1** : Flap structure-specific ENdonuclease 1

**FIS1** : FISsion mitochondrial 1

**GADD45** : Growth Arrest and DNA Damage inducible alpha 45

**GAS5** : Growth Arrest Specific 5

**GDP** : Guanosine diphosphate

**GLUT1** : GLUcose Transporter 1

**GTP** : Guanosine triphosphate

**H2AX** : H2A histone family member X

**HAT** : Histone AcetylTransferases

**HBO1** : Histone acetyltransferase Binding to ORC1

**HDAC** : Histone DésACétylase

**HIF1 $\alpha$**  : Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha

**HK2** : HexoKinase 2

**HMG-box** : High Mobility Group box

**HSP** : Heavy Strand Promoter

**ING** : INhibitor of Growth

**JADE** : Gene for Apoptosis and Differentiation

**JNK** : Jun N-terminal kinase

**KDM** : Histone lysine DeMethylase

**KO** : Knock-Out

**KTM** : Histone lysine Tranferase

**LDHA** : Lactate Dehydrogenase A

**LET-7** : LEThal-7

**LID** : Lamin Interaction domain

**Lnc-ARN** : Long Non-Coding ARN

**LSP** : Light Strand Promoter

**LZL** : Leucine Zipper Like

**MALAT1** : Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1

**MCU** : Mitochondrial Calcium Uniporter

**MCL-1** : Myeloid Cell Leukemia sequence-1

**MCT** : Monocarboxylate Transporters

**MDM2** : Murine Double Minute 2

**MFN** : MitoFusiN

**MIM1** : Mitochondrial IMport protein 1

**MMR** : MisMatch Repair

**MOMP** : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

**MORF** : MOZ-Related Factor

**MOZ** : MONocytic leukemia Zinc-finger protein

**MRE11** : Meiotic Recombination 11

**MSH5** : MutS Homolog 5

**MTERF1** : Mitochondrial transcription TERmination Factor 1

**MTS** : Mitochondrial Targeting Sequence

**mtSSB** : mitochondrial Single-Strand Binding protein

**MUTYH** : mutY DNA glycosylase

**NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate

**NCR** : Novel Conserved Region

**NER** : Nucleotide Excision Repair

**NHEJ** : Non-Homologous End Joining

**NK** : Natural Killer

**NLS** : Nuclear Localization Sequence

**NRF1** : Nuclear respiratory factor 1

**NTHL1** : Nth Like DNA Glycosylase 1

**NTS** : Nuclear Targeting Sequence

**NuA4** : nucleosome acetyltransferase of H4

**OGG1** : 8-Oxoguanine DNA Glycosylase

**OPA1** : Optic Atrophy 1

**ORL** : Oto-Rhino-Laryngée

**OXPHOS** : PHOSphorylation OXYdative

**PAD4** : PeptidylArginine Deiminase 4

**PBD** : Partial Bromo Domain

**PCNA** : Proliferating Cell Nuclear Antigen

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PGC1 $\alpha$**  : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha

**PHD** : Plant HomeoDomain

**PIAS4** : Protein Inhibitor Of Activated STAT 4

**PI3K** : Phospholinositide 3-Kinases

**PI5P** : PhosphatidyInositol 5-Phosphate

**PINK1** : PTEN-INduced Kinase 1

**PIP** : PCNA-Interacting Protein motif

**PRC2** : Polycomb Repressive Complex 2

**POLRMT** : RNA POLymeRase MiTochondrial

**Pol- $\gamma$**  : Polymerase gamma

**PTEN** : Phosphatase and TENsin homolog

**PUMA** : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

**RB** : RetinoBlastoma

**ROS** : Oxygen Reactive Species

**RNF168** : Ring Finger Protein 168

**RRM2B** : Ribonucleotide Reductase Regulatory TP53 Inducible Subunit M2B

**SAM** : Sorting and Assembly Machinery

**SAP30** : Sin3A Associated Protein 30

**SENP1** : SUMO Specific Peptidase 1

**shRNA** : short airpin RNA

**SIRT1** : Sirtuin 1

**Skp2** : S-phase kinase-associated protein 2

**SLC2A1** : Solute Carrier Family 2 Member 1

**SMURF1** : SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1)

**SnoN** : Ski-like oNcogene

**SOD2** : SuperOxide Dismutase 2

**SUMO** : Small Ubiquitin-like MOdifier

**TEFM** : Transcription Elongation Factor, Mitochondrial

**TFAM** : Transcription Factor A, Mitochondrial

**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor beta

**TIGAR** : TP53 Induced Glycolysis Regulatory Phosphatase

**TMA** : Tissue Micro Array

**TMEM71** : TransMEMbrane protein 71

**TOB** : Transducer Of ERBB2

**TOM** : Translocase of the Outer Membrane

**TP53** : Tumor Protein 53

**TSS** : Transcription Starting Site

**UCP** : UnCoupling Protein

**UDG1** : Uracil-DNA Glycosylase 1

**UV** : Ultra-violet

**VDAC** : Voltage Dependent Anion Channel

**XPA** : Xeroderma Pigmentosum A

**XRCC4** : X-Ray Repair Cross Complementing 4

**YB-1** : Y-box-Binding protein 1



# **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

## LISTE DES FIGURES :

**Figure 1 :** Découverte des gènes suppresseurs de tumeurs.

**Figure 2 :** Mécanismes clés de l'oncogénèse.

**Figure 3 :** Types de cancer et charge mutationnelle.

**Figure 4 :** Exemple de la complexité génétique d'une cellule tumorale.

**Figure 5 :** Le code Histone.

**Figure 6 :** Epigénétique et mécanismes d'oncogénèse.

**Figure 7 :** Découverte de ING1.

**Figure 8 :** Localisation chromosomique des gènes ING.

**Figure 9 :** Structure des gènes ING et de leurs transcrits.

**Figure 10 :** Structure des protéines ING.

**Figure 11 :** Modifications post-traductionnelles des protéines ING.

**Figure 12 :** Les protéines ING sont membres de différents complexes Histone AcetylTransférase ou Histone Déacetylase.

**Figure 13 :** Représentation tridimensionnelle de l'interaction entre le domaine PHD de Yng1 (orthologue de ING4/5) et la chromatine.

**Figure 14 :** Fonctions suppressives de tumeurs de type II « gatekeeper » d'ING2.

**Figure 15 :** Fonctions suppressives de tumeurs de type I « caretaker » d'ING2.

**Figure 16 :** Fonctions suppressives de tumeurs d'ING3.

**Figure 17 :** Structure de la mitochondrie.

**Figure 18 :** Processus de fusion et fission mitochondriale.

**Figure 19 :** Organisation du génome mitochondrial humain.

**Figure 20 :** Structure de TFAM et interaction avec l'ADN mitochondrial.

**Figure 21 :** Processus de réplication de l'ADN mitochondrial.

**Figure 22 :** Processus de transcription de l'ADN mitochondrial.

**Figure 23 :** Processus de réparation par excision de bases dans la mitochondrie.

**Figure 24 :** Chaîne respiratoire mitochondriale.

**Figure 25 :** Place de la mitochondrie dans le processus d'apoptose intrinsèque.

**Figure 26 :** Mécanismes d'import des protéines dans la mitochondrie.

**Figure 27 :** Métabolisme cellulaire et lien avec les principaux gènes suppresseurs de tumeurs et oncogène.

**Figure 28 :** Représentation schématique des résultats et questions non résolues à propos du rôle d'ING2 dans la mitochondrie.

**Figure 29 :** Schémas expérimentaux retenus pour la conduite des expériences *in vivo*.

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1 :** Statut de ING2 dans les tumeurs et lignées humaines.

**Tableau 2 :** Statut de ING3 dans les tumeurs et lignées humaines.

## ANNEXES

**Revue de la littérature:** « Exploiting ING2 Epigenetic Modulation as a Therapeutic Opportunity for Non-Small Cell Lung Cancer » *Cancers*. 2019 Oct 21

# PRÉAMBULE

Mon travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de l'équipe qui étudie depuis plusieurs années le rôle des protéines INGs et leur implication dans les processus de tumorigénèse. Ainsi, les thématiques de recherche antérieures du laboratoire ont apporté une contribution importante dans le domaine de la transcription des gènes, de la régulation du cycle cellulaire, de la réplication ou de la réparation de l'ADN en relation avec les protéines INGs.

Mes travaux de recherche s'articulent autour de trois thématiques. Premièrement, j'ai exploré le rôle de la protéine ING2 dans le compartiment mitochondrial. Dans un second temps, j'ai pu mener grâce à une mobilité internationale (Université de Calgary, Canada), un projet de recherche dédié à l'étude de l'expression de la protéine ING2 dans le cancer bronchique non à petites cellules et les vulnérabilités thérapeutiques qui en résultent. Enfin, par le biais d'une seconde collaboration internationale, je me suis aussi intéressé au rôle de la protéine ING3 dans le modèle spécifique du cancer de la prostate.

En conséquence, après une brève introduction générale sur les mécanismes de la cancérogénèse et la famille de gènes *ING*, l'exposé bibliographique qui va suivre a pour but de faire un état de l'art concernant les fonctions des protéines ING2 et ING3. J'ai ensuite choisi de développer un chapitre sur la mitochondrie et ses relations avec les gènes suppresseurs de tumeurs, en l'illustrant par les exemples des protéines p53 et ING1. Ce dernier point a pour but de faciliter la mise en perspective de la publication issue du premier axe de recherche de ma thèse. J'ai choisi de ne pas détailler la biologie spécifique des deux modèles de cancer utilisés dans le deuxième et troisième axe de recherche, afin de permettre l'intégration de mon projet de thèse dans une perspective plus générale.

Cette mise en contexte permettra de mieux appréhender les travaux que j'ai menés au cours de ces années de thèse.

# INTRODUCTION

# 1 GENERALITES SUR LA BIOLOGIE DU CANCER

## 1.1 Point de vue historique

Le mot d'origine latine « cancer » est apparenté au grec *καρκινος*, karkinos (ou «crabe») et a été attribué au père de la médecine occidentale Hippocrate. Il aurait été choisi par analogie à l'aspect clinique des tumeurs mammaires au crabe selon la traduction des ouvrages de Paul d'Égine (médecin grec du VII<sup>ème</sup> siècle).

Initialement considéré comme une maladie résultant d'un excès de « bile noire » selon la médecine de Galien, il fallut près de deux millénaires pour que cette théorie humorale soit remise en question. Les bases génétiques de la cancérogénèse ne se sont imposées qu'en fin de XX<sup>ème</sup> siècle, grâce à la découverte des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs.

### 1.1.1 Définition et découverte des oncogènes

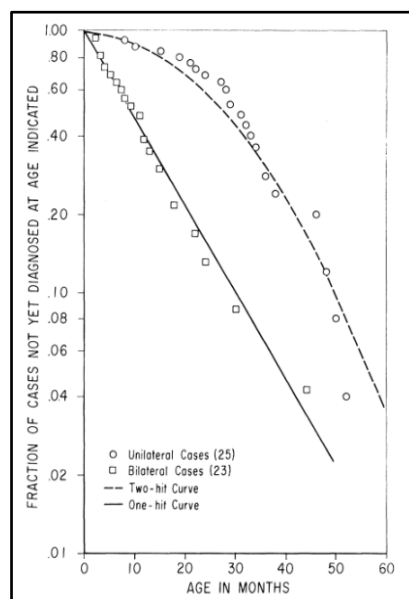
Historiquement les premiers à avoir été identifiés, les oncogènes sont des gènes dont les altérations entraînent une accélération de la prolifération cellulaire et correspondent à un phénotype dominant gain-de-fonction. Leur activation génère un avantage sélectif pour la cellule cancéreuse.

La première démonstration biologique date de 1911, grâce au travail de Peyton Rous portant sur le sarcome du poulet. En effet, ce scientifique américain a démontré que l'ultrafiltrat acellulaire issu de sarcome du poulet entraînait l'apparition de tumeurs, capables de former des métastases et d'envahir les tissus, lorsque celui-ci était injecté aux animaux sains (Rous 1973). On comprendra plus tard qu'il s'agissait de la première description biologique d'un oncogène rétroviral : le gène *v-src*. Il fallut attendre 1976 pour que ce gène aviaire soit identifié et que soit formulé l'hypothèse selon laquelle les oncogènes sont une version altérée de gènes présents physiologiquement dans le génome (Stehelin et al. 1976). En 1982, les premiers oncogènes humains ont été identifiés et clonés, par l'isolement de gènes issus de lignées tumorales humaines capables d'induire un phénotype tumoral lorsqu'exprimés par des fibroblastes murins en culture : les gènes mutés *HRAS* et *KRAS* (Der, Krontiris, et Cooper 1982). Quelques mois plus tard, une mutation du gène *NRAS* a aussi été caractérisée comme oncogénique dans une lignée cellulaire de neuroblastome (Shimizu et al. 1983). Depuis cette date, de nombreux oncogènes ont été découverts et décrits dans le génome humain (exemples : *EGFR* ; *KIT* ; *MET* ; *MYC* ou *ERBB2*).

### 1.1.2 Définition et découverte des gènes suppresseurs de tumeur.

Les gènes suppresseurs de tumeurs (initialement dénommés anti-oncogènes) sont des gènes dont les altérations entraînent une perte du freinage de la prolifération cellulaire et correspondent à une perte-de-fonction, en général récessive. Leur inactivation génère un avantage sélectif pour la cellule cancéreuse.

Au début des années 1970, en se basant sur des modèles mathématiques issus de données épidémiologiques d'incidence des cancers au cours du vieillissement (Armitage et Doll 1957), Alfred Knudson formula l'hypothèse désormais historique, que le processus de cancérogénèse nécessitait deux étapes successives (Knudson 1971). En suivant une cohorte de 48 patients, il compara l'incidence des cas de rétinoblastomes héréditaires aux cas sporadiques. Dans le cas des rétinoblastomes héréditaires, il remarqua que leur incidence observée était proche du modèle statistique dit « one-hit », qui estimait le nombre de nouveau cas si une seule mutation somatique était nécessaire. En revanche, pour les cas de rétinoblastomes sporadiques, l'incidence observée était proche du modèle statistique dit « two-hit », qui estimait le nombre de cas si deux évènements somatiques étaient nécessaires (Figure 1). En effet, la perte d'hétérozygotie du gène *RB1* dans les cas héréditaires étant germinale, un seul évènement génomique est nécessaire à l'inactivation homozygote du gène *RB1* et le développement du rétinoblastome. Pour les cas sporadiques, l'inactivation successive des deux allèles *RB1* au sein d'une même cellule est nécessaire pour le développement du rétinoblastome. Alors même que les bases moléculaires sous-jacentes étaient inconnues à l'époque de la formulation de cette théorie, celle-ci s'est avérée parfaitement exacte dans le cas emblématique du rétinoblastome, dont le gène responsable ne fut identifié qu'en 1986 (Friend et al. 1986). Le gène *RB1* est le premier gène suppresseur de tumeur humain à avoir été isolé.

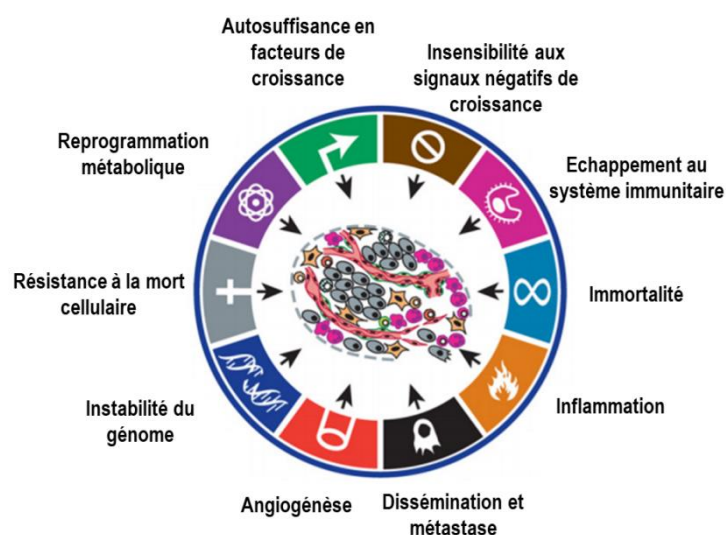


**Figure 1 : Découverte des gènes suppresseurs de tumeurs.** Graphique semi-logarithmique original du nombre de cas observés et du nombre de cas prédits de rétinoblastome selon les modèles statistiques de « one-hit » et « two-hit » en fonction de l'âge (d'après Knudson 1971)



## 1.2 Les bases moléculaires de la tumorigénèse

Résumant des décennies de recherche fondamentale dans le domaine de l'oncogénèse, Hanahan et Weinberg ont publié en 2000 (Hanahan et Weinberg 2000), puis mis à jour en 2011 (Hanahan et Weinberg 2011), les mécanismes clés impliqués chez l'homme dans la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale (Figure 2).



**Figure 2 : Mécanismes clés de l'oncogénèse.** Schéma représentant les différents processus favorisant la tumorigénèse humaine (adapté de Hanahan et Weiberg, 2011)

Cette description des phénomènes de cancérogénèse, présentés comme autonomes et indépendants, peut paraître réductrice. Il est important de rappeler que ceux-ci sont à contextualiser pour chaque tumeur selon leur tissu d'origine et ne sont donc pas toujours à mettre au même plan.

En effet, l'instabilité génomique est un phénomène reconnu comme central au cours de l'oncogénèse, et même pour certains auteurs, à son origine (Negrini, Gorgoulis, et Halazonetis 2010). Selon cette hypothèse, l'autosuffisance en facteur de croissance, l'insensibilité aux signaux négatifs de croissance, la reprogrammation métabolique et la résistance à la mort cellulaire seraient des phénomènes contingents à l'instabilité génomique initiale. En revanche, l'immortalité cellulaire, l'angiogenèse, la dissémination métastatique et l'échappement au contrôle immunitaire seraient des acquisitions phénotypiques plus tardives. Malgré cette hiérarchisation, il convient de rappeler que les mécanismes clés de l'oncogénèse présentent un fort degré d'hétérogénéité entre chaque type de tumeur, auquel s'ajoute un nouveau degré d'hétérogénéité intra-tumoral. Ainsi, il n'existe pas de tumeur strictement identique sur le plan moléculaire, même s'il est possible de classer ces altérations selon les différentes échelles de la cellule.

### 1.2.1 Echelle génomique

Le génome humain peut être sujet à de nombreux types de modifications, allant des simples mutations ponctuelles aux translocations chromosomiques complexes. Les techniques de séquençage de l'ADN génomique ont permis dès 2006, d'illustrer l'importance du phénomène mutationnel dans les cancers humains. En effet, les travaux de séquençage pionniers de l'équipe de Volgenstein ont pu démontrer l'existence d'un taux de mutation au sein du génome de cancers du sein ou du colon d'environ 3,5 mutations par Megabase (analyse restreinte à l'exome) (Sjöblom et al. 2006). Même si certaines de ces mutations intéressaient des oncogènes connus, la majorité intéressait des gènes sans lien connu avec les processus de tumorigénèse. Ces dernières ont été dénommées mutations « passager » secondaires à l'instabilité génomique inhérente à la cellule tumorale, à la différence des mutations « drivers » ou pilotes considérées comme importantes pour l'acquisition du phénotype tumoral. Malgré l'amélioration des connaissances et des technologies de séquençage, il reste toujours difficile de distinguer une simple mutation « passager » d'une mutation « driver ».

De manière beaucoup plus exhaustive, les travaux de l'équipe de Getz (Lawrence et al. 2013) ont référencé la charge mutationnelle d'un large panel de tumeurs humaines par l'exploitation de bases de données génomiques internationales principalement basées sur des technologies de séquençage haut débit. Une grande hétérogénéité du nombre de mutations par Megabase en fonction du type histologique de la tumeur a été observée. Les mélanomes et les cancers du poumon, dont l'épidémiologie est fortement liée à l'exposition aux agents mutagènes de l'environnement (UV et benzopyrène de la fumée de tabac respectivement) sont les types de cancer présentant la plus forte charge mutationnelle (Figure 3).

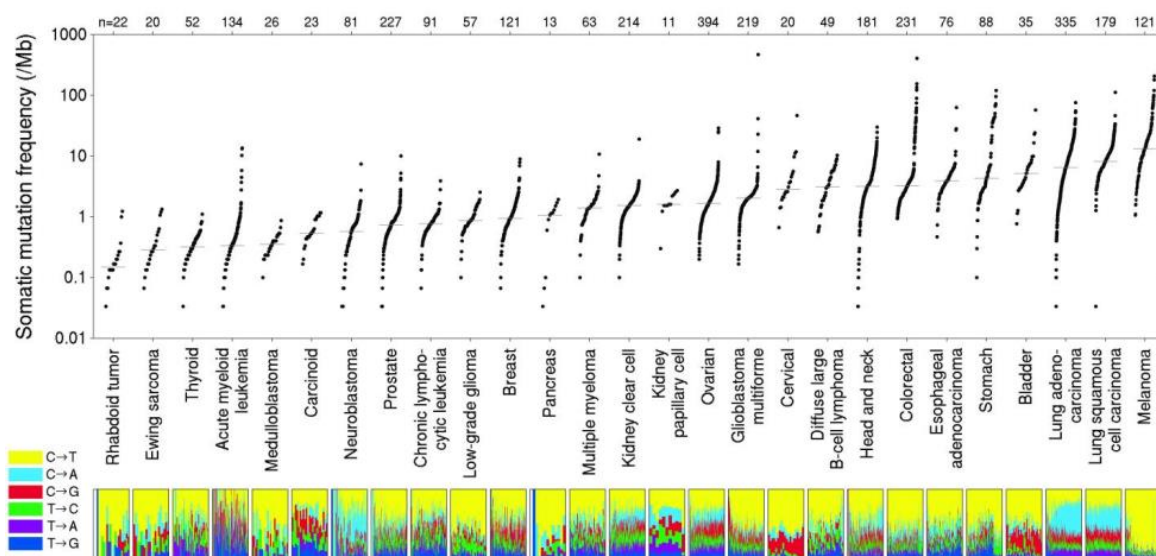
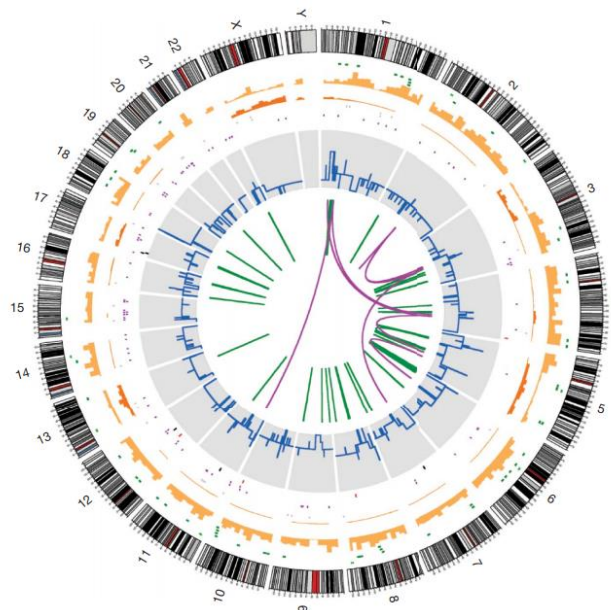


Figure 3 : Types de cancer et charge mutationnelle. Schéma représentant la charge mutationnelle identifiée dans chaque tumeur et classée selon leur type histologique (adapté de Lawrence et al. 2013)

Au-delà des mutations ponctuelles observées sur le génome des tumeurs humaines, des altérations génomiques beaucoup plus complexes ont pu être exhaustivement référencés à l'aide des techniques de séquençage de nouvelle génération : insertions, délétions, amplifications, perte d'hétérozygotie, réarrangement intra ou inter-chromosomiques (Pleasant et al. 2010). Celles-ci illustrent l'importance qualitative et quantitative de l'instabilité génomique présente dans une cellule tumorale (Figure 4).



**Figure 4 : Exemple de la complexité génétique d'une cellule tumorale.** Représentation en « circos plot » des altérations génomiques de la lignée de cancer du poumon à petites cellules NCI-H209, identifiées par séquençage nouvelle génération. (Adapté de Pleasant et al. 2010)

## 1.2.2 Echelle épigénétique

À la suite de la caractérisation du code génétique à la fin des années 50, Conrad Waddington a proposé le terme « épigénétique » pour définir les relations de cause à effets entre les gènes et leur produit faisant apparaître un phénotype. Ce concept a introduit le fait que la diversité biologique n'est pas uniquement imputable à la séquence nucléotidique. L'épigénétique a été ensuite définie comme toutes les modifications affectant l'ADN, ou les protéines qui lui sont associées directement, sans changer la séquence nucléotidique, et qui se transmettent à travers les divisions cellulaires (Andrew P. Feinberg, Koldobskiy, et Göndör 2016).

### 1.2.2.1 Méthylation de l'ADN

La première modification épigénétique à avoir été décrite chez les mammifères est la méthylation de l'ADN génomique. Il s'agit de l'ajout d'un groupe méthyl sur le carbone 5 des résidus cytosines

précédant une guanine (dinucléotides CpG) en utilisant comme donneur la S-adénosyl-méthionine. Ce processus est catalysé par la famille d'enzyme des DNA méthyltransférases (DNMT) dont trois ont été décrites chez les mammifères : DNMT1 assurant les méthylation « de maintenance » à chaque réplication et DNMT3A et 3B assurant les méthylations « de novo » (Greenberg et Bourc'his 2019). Chez l'homme, les dinucléotides CpG ont été largement réduits par désamination de la cytosine dans le génome au cours de l'évolution, aboutissant à une répartition non aléatoire des régions riches ou pauvres en CpG (Holliday et Grigg 1993). Les régions enrichies en dinucléotides CpG ont été nommées « îlots CpG », principalement localisés dans la région promotrice d'environ 60% des gènes. En situation physiologique, ces îlots CpG sont hypométhylés dans les régions promotrices des gènes exprimés. Inversement, les îlots CpG présents dans les régions non codantes, les séquences répétées ou le corps des gènes, sont hyperméthylés et rendus ainsi inaccessibles à la machinerie transcriptionnelle. Il a été montré que la méthylation des îlots CpG était impliquée dans des processus biologiques importants, tel que le développement embryologique, l'empreinte parentale ou la stabilité chromosomique (Robertson 2005).

En 1983, une étude pionnière a démontré l'existence d'altérations de la méthylation du génome des cellules de cancer du côlon par rapport aux cellules saines (A. P. Feinberg et Vogelstein 1983). Des travaux plus récents ont confirmé qu'il existe une hypométhylation globale du génome dans les cancers humains, en particulier au niveau des séquences répétées, contrastant avec une hyperméthylation localisée aux promoteurs de certains gènes suppresseurs de tumeurs (Kulis et Esteller 2010). Parmi ces gènes, on peut citer les cas emblématique d'hyperméthylation du promoteur de *CDKN2A* (p16) dans certaines hémopathies (Drexler 1998) ou du promoteur de *RB1* dans certains cas de rétinoblastomes (Greger et al. 1989). L'hypométhylation de l'ADN contribue à l'instabilité génomique (mobilité des transposons) et l'activation transcriptionnelle anormale d'oncogènes ou de gènes dit « cancer-germline ». Enfin, il a été rapporté, notamment dans des modèles de cancer du poumon, que le statut de méthylation aberrant de l'ADN était consécutif à la modification de marques d'histones, en faveur d'une forte activité transcriptionnelle (Rao et al. 2011).

#### 1.2.2.2 Modification des histones

Le génome eucaryote est enroulé étroitement autour d'octamères de protéines d'histones formant le nucléosome. Celui-ci constitue l'unité de base de la chromatine et comprend deux copies de chacun des histones H3, H4, H2A et H2B. Autour de ce complexe protéique s'enroule environ 146 paires de bases nucléotidiques et les nucléosomes sont reliés et stabilisés entre eux par l'histone de liaison H1. Cette organisation permet une compaction importante du génome dans le volume nucléaire restreint.

Les « queues d'histones » (région N-terminale) dépassent du nucléosome et sont accessibles à de multiples modifications post-traductionnelles sur les nombreux résidus lysine qui les composent (Füllgrabe, Kavanagh, et Joseph 2011). Les deux modifications les plus fréquentes sont l'acétylation, régulée par le couple d'enzymes HAT/HDAC (Histone Acetyl-transférase/Histone deacetylase), et la méthylation, régulée par le couple d'enzyme KMT/KDM (Lysine Methyl-Transférase/Lysine Deméthylase) (Rice et Allis 2001). Ces modifications sont dynamiques car elles peuvent rapidement changer selon les besoins cellulaires et vont conditionner l'accessibilité de l'ADN. En effet, l'acétylation des résidus lysine entraîne une neutralisation de la charge positive des histones et un affaiblissement de l'interaction électrostatique avec l'ADN chargé négativement (effet de remodelage de la chromatine) (Kouzarides 2007). Par conséquent, l'accessibilité du génome est hautement contrôlée par la combinaison des modifications post-traductionnelles des queues d'histones, composant le « code histone » (Figure 5). Ces marques d'histones, en fonction de leur capacité à permettre ou non aux machineries protéiques d'interagir avec une séquence nucléotidique donnée, vont présenter des propriétés activatrices ou répressives sur la transcription.

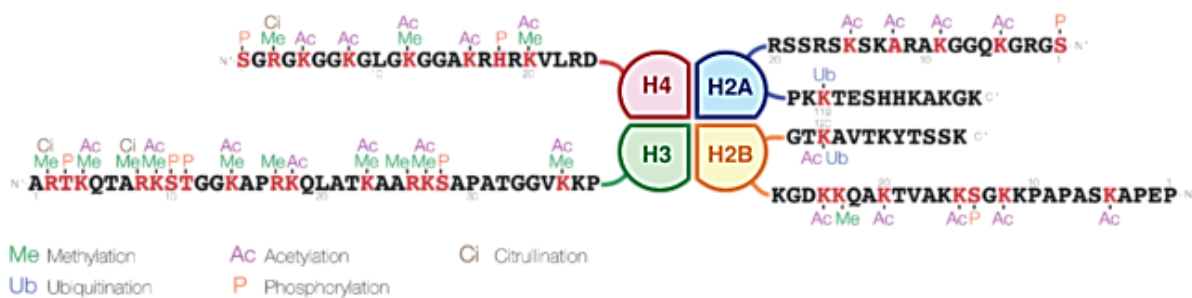
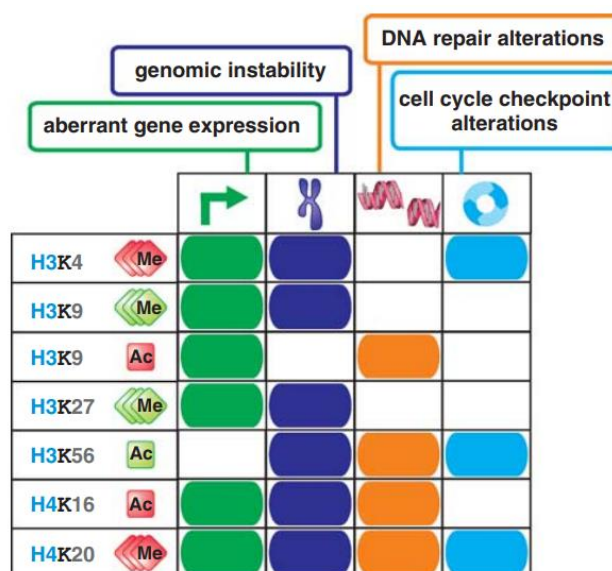


Figure 5 : Le code Histone. Représentation schématique des modifications post-traductionnelles décrites sur les histones humains.

On connaît l'importance de l'acétylation des résidus lysines des histones dans la régulation de la transcription des gènes depuis les années 1960 (Allfrey, Faulkner, et Mirsky 1964). Étant donné leurs implications dans de très nombreux processus biologiques cellulaires, une dérégulation de ces modifications post-traductionnelles des histones a rapidement été identifiée dans les cancers. De manière générale, il existe une tendance à une surexpression des HDAC au cours de l'oncogenèse et de la progression des cancers. Des altérations importantes des différentes marques d'histones ont été observées dans les cellules cancéreuses humaines. Celles-ci vont des altérations précises et spécifiques à certains types de cancer, comme l'hyperméthylation H3K9 du promoteur du gène *CDKN2A* dans les cancer colorectaux, à des altérations plus générales, comme la réduction de la marque H4K14Ac et de H4K20me3 (marques répressives) au niveau des séquences répétées du génome observée dans d'autres types de cancers (Figure 6) (Audia et Campbell 2016).

Il est aujourd'hui admis que l'essentiel de ces altérations épigénétiques observées dans les cancers sont secondaires aux altérations des enzymes qui permettent la reconnaissance (« reader »), l'écriture (« writer »), ou l'effacement (« eraser ») du code histone (Shen et Laird 2013). Leur rôle est parfaitement établi dans de nombreux modèles de cancérogénèse. A titre d'exemple, on peut citer le cas des mutations activatrices du gène *EZH2*, une lysine methyl-transferase appartenant au complexe de remodelage de la chromatine PCR2, retrouvées dans de nombreux types de cancers (lymphome folliculaire, carcinome bronchique, mélanome, glioblastome) et impliquées dans le contrôle de la méthylation de la marque histone H3K27 (K. H. Kim et Roberts 2016, 2). Le phénotype gain-de-fonction du gène *EZH2* induit un enrichissement de la marque histone répressive H3K27me3 et par conséquent une inhibition de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur cibles du complexe PCR2 (au premier rang desquels *CDKN1A* et *CDKN2A*) (Morin et al. 2010).



**Figure 6 : Epigénétique et mécanisme d'oncogénèse.** Représentation des modifications d'histone observées dans les cancers humains. Les modifications post-traductionnelles des histones (perte en rouge, gain en vert) sont classées selon leur implication dans l'expression anormale des gènes (colonne verte), l'instabilité du génome (colonne bleu foncée), les anomalies de réparation de l'ADN (colonne orange) et l'altération des points de contrôle du cycle cellulaire (Adapté de Fullgrabe et al. 2011)

### 1.2.2.3 Rôle des longs ARN non codants

Découverts dans les années 2010, les longs ARN non codants (lncARN) sont de plus en plus reconnus comme des acteurs importants des mécanismes d'oncogénèse. Il s'agit de molécules d'ARN contenant plus de 200 nucléotides et non traduites en protéine. On en recense à ce jour environ 28 000 distincts, issus de 16 000 gènes du génome humain (Gutschner et Diederichs 2012). Les rôles biologiques admis à ce jour sont la régulation de la synthèse des micro-ARN, la régulation épigénétique de l'expression des gènes et la régulation de l'activité de certaines protéines.



Des études récentes ont en effet démontré l'importance du contrôle épigénétique de l'expression des gènes par les lncARN participant aux processus de tumorigenèse (Guzel et al. 2019). De manière tissu-spécifique, ces lncARN peuvent se comporter parfois en produit de suppresseurs de tumeurs parfois en produit d'oncogènes. On peut citer l'exemple du lncARN MALAT1 réprimant l'expression de gènes bloquant l'apparition de métastases et activant l'expression de gènes pro-métastatiques, se comportant ainsi comme un oncogène dans le contexte du cancer bronchique primitif (L. H. Schmidt et al. 2011). Inversement, le lncARN GAS5 inhibe la prolifération, l'invasion et la migration de lignées cellulaires de cancer colorectal. Sa surexpression induit même l'apoptose de ces même lignées cellulaires, lui conférant un rôle suppresseur de tumeur (J. Li et al. 2018).

### 1.2.3 Echelle post-transcriptionnelle

L'une des grandes découvertes de la biologie moderne est celle du contrôle de l'expression des gènes par des petites séquences d'ARN de 19 à 25 nucléotides, appelées micro-ARN. Il est estimé qu'ils contrôlent au moins 30% de l'expression des gènes dans le génome humain. La cible des micro-ARN intéresse dans 70% des cas la partie intronique de gènes codants et dans 30% des cas des régions intergéniques. Ils se fixent à l'extrémité 3'UTR de l'ARNm d'un gène cible par complémentarité incomplète de 2 à 8 nucléotides et aboutissent à la dégradation ou l'inhibition de la traduction de l'ARNm. Du fait de la reconnaissance partielle de la séquence nucléotidique de l'ARNm, un micro-ARN peut cibler plusieurs gènes et un même gène peut être la cible de plusieurs micro-ARN. En conséquence, leur implication dans les processus biologiques humains est aujourd'hui considérée pléiotrope (Mott et Mohr 2015).

L'implication des micro-ARN dans les phénomènes d'oncogenèse a été très vite suspectée après leur mise en évidence (Calin et Croce 2006). En effet, ils peuvent contrôler des fonctions oncogéniques ou suppressives de tumeur selon la nature de l'ARNm ciblé. À titre d'exemple, on peut citer le cluster de micro-ARN 17-92 qui inhibe l'expression du gène suppresseur de tumeur *E2F1*, un facteur de transcription impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire (Ventura et al. 2008), ou encore le cluster de micro-ARN LET-7, réprimant l'expression des oncogènes de la famille RAS et MYC. Ainsi, en fonction de la nature des altérations qualitatives ou quantitatives observées pour un micro-ARN donné, celui-ci peut se comporter comme le produit d'un oncogène ou d'un gène suppresseur de tumeur. La grande interconnexion entre l'effet des micro-ARN sur leurs gènes cibles, dont la variation d'expression peut elle-même modifier aussi l'expression d'autres micro-ARNs, rend délicat la reconnaissance universelle de micro-ARN comme « oncomirs » et leur implication direct dans le processus d'oncogenèse semble dépendante du tissu considéré (Croce 2009). Par exemple, des travaux indépendant ont démontré que

l'expression du miR-221 et miR-222 était perdue dans le contexte de la leucémie érythroblastique, libérant ainsi l'inhibition du gène *KIT*, favorisant ainsi la prolifération tumorale (rôle suppresseur de tumeur du micro-ARN) (Felli et al. 2005). En revanche, dans le contexte de la leucémie lymphoïde chronique ou le carcinome hépatocellulaire, ces deux mêmes micro-ARN sont fréquemment surexprimés et limitent ainsi l'action de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs dont *PTEN* (rôle oncogénique du micro-ARN) (Garofalo et al. 2009).

Enfin, à ce niveau de complexité s'ajoute aussi l'impact épigénétique des micro-ARN qui dans certains contextes tumoraux ciblent certaines protéines régulatrices de l'épigénome, mais aussi l'impact des altérations de la voie de biogénèse des micro-ARN décrites dans certaines tumeurs. On peut citer le cas des mutations germinales du gène *DICER1* (codant une protéine impliquée dans la synthèse des micro-ARN) directement liées avec la cancérogénèse du blastome pleuro-pulmonaire (Hill et al. 2009, 1).

## 2 LES GENES *ING*

### 2.1 Présentation de la famille de gènes *ING*

#### 2.1.1 Historique de la découverte des gènes *ING*

L'acquisition d'altérations génomiques au sein d'une cellule normale est une étape fondamentale du phénomène de tumorigénèse. L'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur sont les deux mécanismes centraux mis en jeu dans ce processus.

Au début des années 1990, dans l'optique d'identifier de nouveaux gènes suppresseurs de tumeur, l'équipe du Pr Riabowol a mis au point une méthode originale d'hybridation soustractive afin d'isoler les gènes dont l'expression est perdue dans les cellules tumorales (Figure 7) (Garkavtsev et al. 1996a). Cette technique consiste en une première étape d'hybridation d'ADNc issues de cellules mammaires normales avec les ADNc issus de lignées de cellules épithéliales de cancer du sein. Les ADNc non hybridés, et donc non exprimés dans les cellules tumorales, vont alors être amplifiés par PCR, puis clonés en anti-sens dans un vecteur rétroviral leur conférant ainsi une capacité à inhiber les ARNm sens correspondants. Après transfection de cellules dites « packing » (permettant la production de rétrovirus), puis infection de cellules mammaires murines immortalisées et implantation de ces mêmes cellules en sous-cutanée à des souris « nude », l'apparition de tumeurs a été observée après 45 jours. Ces résultats suggèrent l'existence d'un ou plusieurs gènes dont l'inhibition expérimentale a favorisé le



processus de transformation tumorale. L'analyse des tumeurs ainsi obtenues a permis d'identifier un ADNc anti-sens dont les propriétés suppressives favorisaient la formation de colonies *in vitro*.

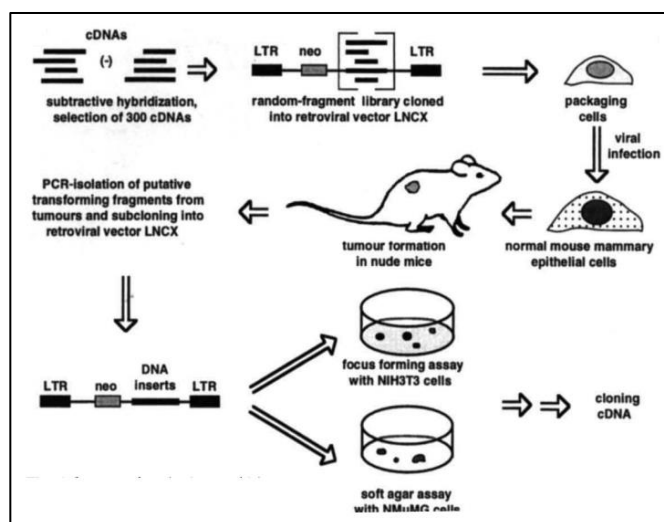


Figure 7 : Découverte de ING1. Représentation schématique originale de la méthode d'hybridation soustractive mise au point par l'équipe de Karl Riabowol (Garkavtsev et al. 1996a)

Le gène complémentaire à cet ADNc anti-sens a été cloné et les auteurs de ces travaux ont proposé l'appellation *INhibitor of Growth 1 (ING1)*, en référence à ses propriétés antiprolifératives.

Dans les années qui ont suivies, les quatre autres membres de la famille de gène *ING* ont été identifiés *in silico* par recherche d'homologie de séquence, à l'aide des bases de données référencant le génome humain. Ces gènes ont été nommés *ING2* (Shimada et al. 1998), *ING3* (Makoto Nagashima et al. 2003), *ING4* et *ING5* (Shiseki et al. 2003) selon l'ordre chronologique de leur découverte.

### 2.1.2 Phylogénétique de la famille de gènes *ING*

Dès les années 2000, des séquences homologues au gène *ING1* ont été détectées dans le génome de deux micro-organismes : *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* (Loewith et al. 2000). Cette découverte suggérait l'existence d'une conservation du gène *ING1* au cours de l'évolution.

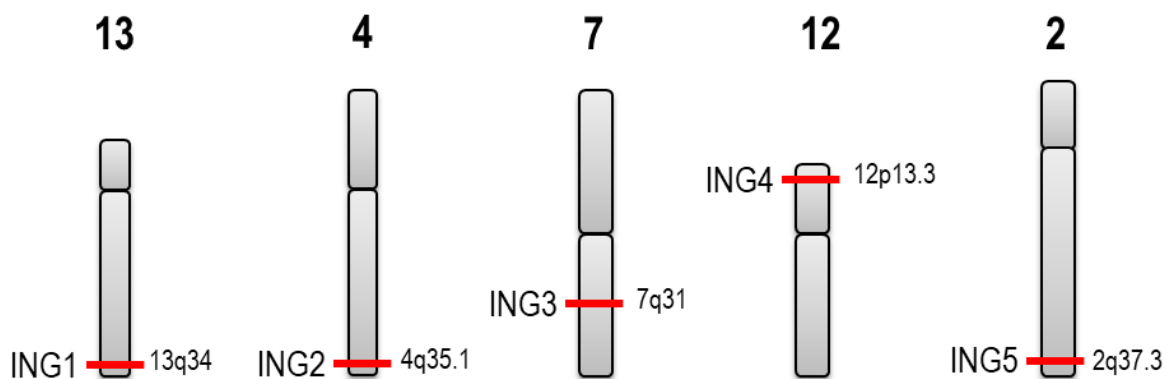
Une étude phylogénétique plus récente a corroboré cette hypothèse pour l'ensemble des gènes de la famille *ING* (G. H. Y. He et al. 2005). En effet, ce travail a mis en évidence la présence d'homologues aux gènes *ING* dans de le génome de nombreux organismes (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* etc). Selon l'analyse phylogénique des séquences protéiques pour ces différents homologues, les auteurs ont observé que les protéines *ING1* et *ING2* d'une part, et *ING4* et *ING5* d'autre part,

partagent une origine ancestrale commune. Même si la protéine ING3 semble présenter un parcours évolutif distinct, ces résultats soutiennent l'hypothèse d'un ancêtre commun à l'ensemble des gènes de la famille *ING* décrits chez les vertébrés. Enfin, la conservation de ces gènes au cours de l'évolution des espèces souligne l'importance de leurs fonctions biologiques.

## 2.2 Famille de gènes *ING* : structure et régulation de l'expression

### 2.2.1 Structure des gènes *ING*

Les cinq membres de la famille de gène *ING* ont été identifiés sur cinq chromosomes distincts (Figure 8) (G. H. Y. He et al. 2005). A l'exception du gène *ING3*, ces gènes sont localisés en région sub-télomérique, position décrite comme vulnérable aux réarrangements génomiques et à l'érosion télomérique (Blasco 2007). De manière notable, un pseudo-gène nommé *INGX* a été localisé sur le chromosome X (Xq12).



**Figure 8 : Localisation chromosomique des gènes *ING*.** La position de chaque gène *ING* est indiquée sur un chromosome par un trait rouge avec, à droite, sa localisation précise. Le numéro des chromosomes est indiqué au-dessus (adapté d'après He et al. 2005).

### **ING1**

Le gène *ING1* comprend quatre exons et (E1a, E1b, E1c et E2) dont les trois premiers sont chacun sous le contrôle de promoteurs distincts (Figure 9). Ces trois exons peuvent être épissés avec l'exon E2 générant les transcrits *ING1v1*, *ING1v3* et *ING1v4*, codant respectivement les protéines p33ING1b, p27ING1d et p47ING1a. Un épissage alternatif de l'exon E1a ou E1b est possible aboutissant à deux autres transcrits: *ING1v2* et *ING1v5*. De manière surprenante, ces transcrits pourtant sous le contrôle de deux promoteurs et de séquences régulatrices différents, codent la même protéine : p24ING1c. Le variant majoritaire dans les cellules est p33ING1b (Garkavtsev et al. 1998; Jäger et al. 1999; Gunduz et al. 2000; Saito et al. 2000).

## ING2

Le gène *ING2* comprend trois exons (E1a, E1b et E2) (Figure 9). Chacun des deux exons subit un épissage avec l'exon E2 donnant lieu aux transcrits ING2a et ING2b. Le variant majoritaire est ING2a dans les cellules, dans la mesure où l'expression du variant ING2b n'a jamais été observée. En conséquence, ING2a est dénommé ING2 dans la nomenclature internationale (Unoki et al. 2008).

## ING3

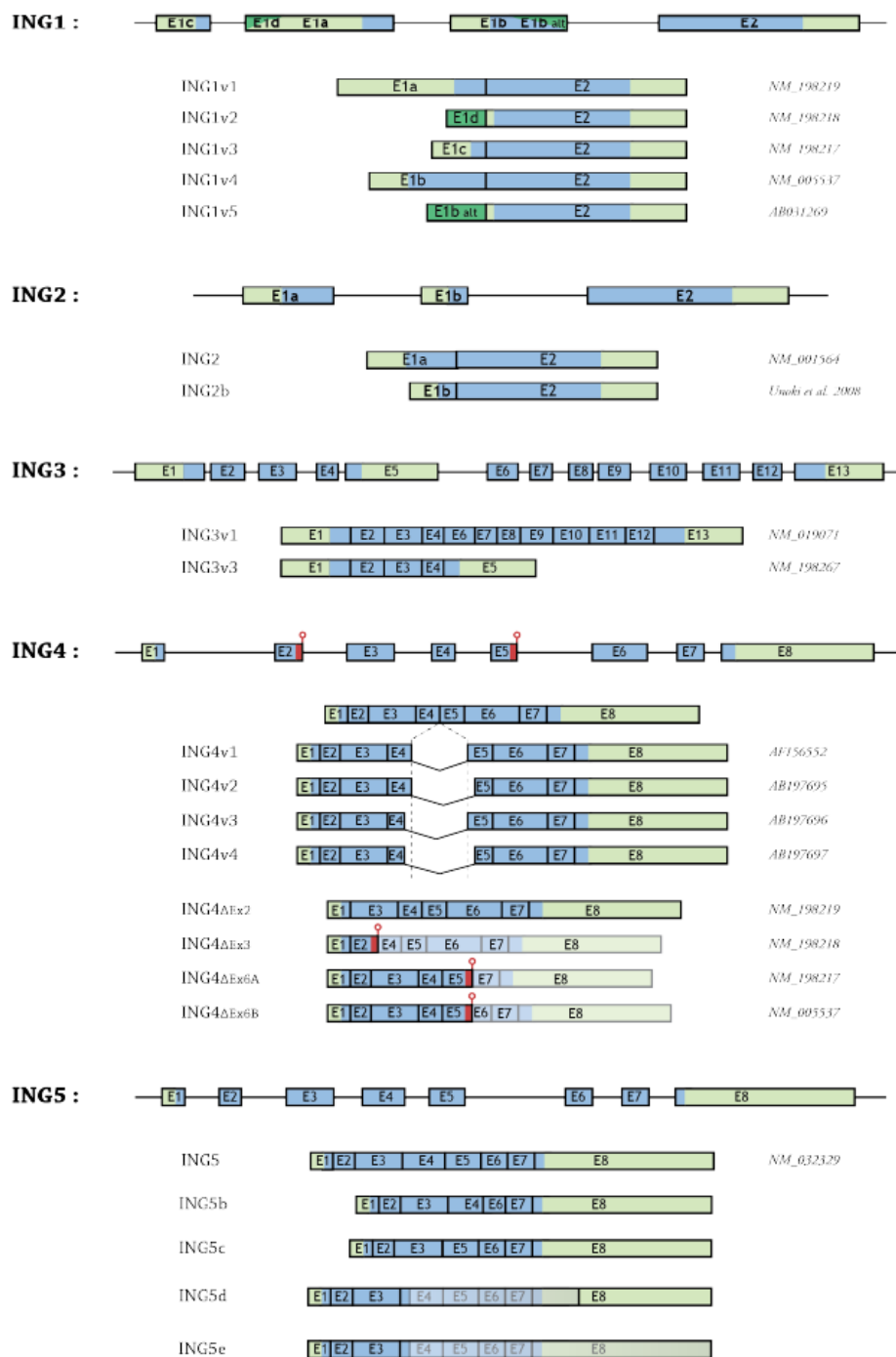
Le gène *ING3* est composé de 13 exons (E1 à E13) (Figure 9). Le transcrit ING3v1 résulte de l'épissage des exons E1 à E4, puis E4 à E6 et enfin E6 à E13. Un épissage alternatif des exons E1 à E5 entre eux a été décrit et le variant ING3v3 prédit. Cependant son existence n'a jamais été démontrée (Makoto Nagashima et al. 2003).

## ING4

Le gène *ING4* est composé de huit exons (E1 à E8) (Figure 9). Il comprend deux sites d'épissage permettant la génération de quatre transcrits : ING4v1, ING4v2, ING4v3 et ING4v4. Récemment, quatre transcrits supplémentaires ont été décrits : ING4ΔEx2 (perte de l'exon 2), ING4ΔEx3 (perte de l'exon 3 et décalage du cadre de lecture aboutissant à un codon STOP prématuré dans l'exon 4), ING4ΔEx6A (perte de l'exon 6 et décalage du cadre de lecture aboutissant à un codon STOP prématuré dans l'exon 7) et ING4ΔEx6B (décalage du cadre de lecture aboutissant à un codon STOP prématuré dans l'exon 6) (Shiseki et al. 2003; Raho et al. 2007; Unoki et al. 2006).

## ING5

Le gène *ING5* est composé de huit exons (E1 à E8) (Figure 9). Cinq variants d'épissage ont été identifiés à ce jour. Le premier transcrit identifié a été nommé ING5, et est le résultat de l'épissage des huit exons. Quatre variants d'épissage supplémentaires ont ensuite été rapportés : ING5b (résultat de l'épissage entre les exons 1 et 3, une partie de l'exon 4, l'exon 5, une partie de l'exon 6 et les exons 7 et 8), ING5c (résulte de l'épissage des exons 1 et 2 avec les exons 5 à 8), ING5d (résulte de l'épissage des exons E1 à 3 et une partie de l'exon 4 et 8 aboutissant à un codon STOP prématuré dans l'exon 4), ING5e (résultant de l'épissage des exons 1 à 3 et une partie de l'exon 4 aboutissant à un codon STOP prématuré dans l'exon 4) (Shiseki et al. 2003; Cengiz et al. 2010).



**Figure 9 : Structure des gènes ING et de leurs transcrits.** La structure génomique de chaque gène ING est représentée avec en dessous la structure des différents transcrits qu'ils expriment. De part et d'autre de chaque transcrit est indiqué son nom (à gauche) et son numéro de référencement GenBank (à droite). Les différents exons (E) sont représentés par des rectangles au sein desquels les régions codantes et non codantes apparaissent en bleu ou vert. Les marques rouges représentent des codons STOP dont la présence dépend du type d'épissage réalisé (Adapté d'après Ythier et al., 2008).

### 2.2.2 Régulation par mi-ARN

Les mi-ARN sont des ARN non codants de 18 à 25 nucléotides, découverts depuis maintenant une vingtaine d'année (R. C. Lee, Feinbaum, et Ambros 1993, 14). En fonction de leur analogie nucléotidique avec la séquence de l'ARNm cible, ils entraînent une répression traductionnelle ou sa dégradation. Des travaux récents confirment que la reconnaissance de l'ARNm cible peut se faire sur la partie non-codante, en région 3'UTR principalement, mais aussi en région 5'UTR ou ORF (Mott et Mohr 2015; Lytle, Yario, et Steitz 2007). Au cours des dernières années, un nombre croissant d'études confirme l'existence d'une régulation de l'expression des gènes INGs par des mi-ARN (Gournay et al. 2019).

#### ING1

Une étude a démontré que le miR-371-5p pouvait cibler directement l'ARNm de ING1 dans le contexte de lignées tumorales pancréatiques (D. He et al. 2014). De manière intéressante, cette même étude démontre la présence de la protéine ING1 sur le promoteur du gène *MIR371A* codant le miR-371-5p, suggérant l'existence d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif. Une deuxième étude récente a aussi démontré l'existence d'une interaction *in vitro* entre l'ARNm de ING1 et le miR-500 et miR-628 dans des lignées humaines de cancer du poumon (M. Jiang et al. 2018). L'inhibition de ces miARN entraîne dans ce travail une augmentation de l'expression de la protéine ING1 et une diminution de la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires.

#### ING2

A ce jour, il existe plusieurs études qui démontrent l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle de l'expression de ING2 par des miRNA. Premièrement, à l'aide d'approches expérimentales *in silico* et *in vitro*, il a été observé une interaction entre l'ARNm de ING2 et le miR-8084 (Gao et al. 2018). Dans cette même étude, la surexpression du miR-8084 entraînait une diminution de l'expression de la protéine ING2 et l'apparition d'un phénotype tumoral agressif *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs lignées de tumeurs mammaires humaines. Enfin, deux études récentes ont aussi démontré l'existence d'une interaction entre l'ARNm de ING2 et le miR-153-3p ou le miR-92a, respectivement dans des lignées humaines de leucémie aiguës lymphoblastiques (J. Jiang et al. 2019) ou dans une lignée humaine de cancer gastrique (Tao et al. 2019).

#### ING3

Les données de la littérature soutiennent l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle de l'expression de ING3 par le miR-21. Ce mi-ARN, impliqué est dans les processus de migration et de prolifération cellulaire dans plusieurs types de cancer, est reconnu pour ses propriétés oncogéniques (Javanmardi et al. 2017). Une première étude a démontré que le miR-21 contrôle notamment l'expression de la protéine ING3, et que cela impacte la différenciation monocyttaire (Cekaite, Clancy, et Sioud 2010). Dans le contexte du cancer colorectal, une deuxième étude a aussi rapporté que l'expression de ING3 était modulée directement par le miR-21 (Z. Zhang et al. 2017). Par ailleurs, d'après une analyse *in silico*, la protéine ING3 a été identifiée comme une cible potentielle des miR-494 et miR-522 (B. Zhang, Lin, et He 2015).

#### **ING4**

Dans le cas de la protéine ING4, de nombreux mi-ARN ont été identifiés *in silico* comme potentiels régulateurs post-transcriptionnels : miR-214 (X. J. Zhang et al. 2010), miR-761 (Yan et al. 2015), miR-650 (Lango-Chavarría et al. 2017) , miR-330 (Hu et al. 2017), miR-423-5p (S. Li et al. 2017), miR-214 (K.-M. Park et al. 2016), miR-361-3p, miR-1910-5p ou miR-3691-3p (Lin, Kaptein, et Sheikh 2017). Cependant, les données probantes d'interaction directe *in vitro* sont limitées au miR-214, miR-761, miR-330 et miR-423-5p, et ce dans différents contextes de lignées tumorales humaines (respectivement cancer du pancréas, hépatocarcinome, glioblastome et cancer bronchique).

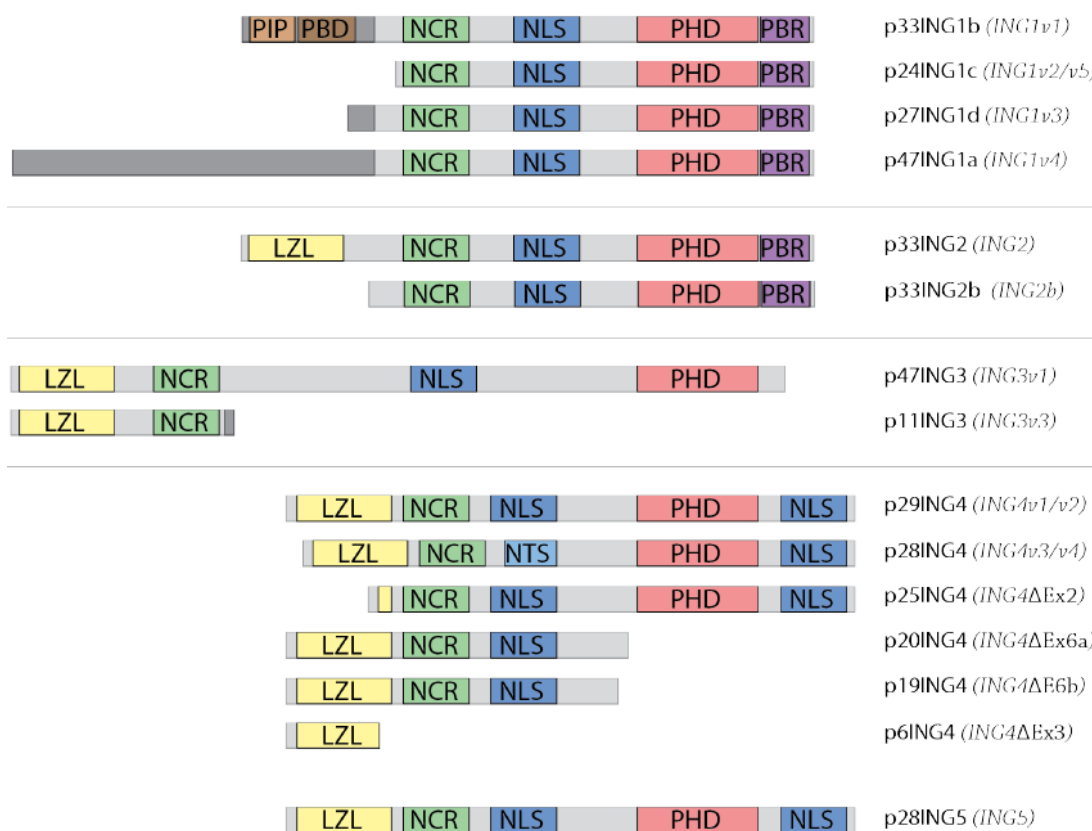
#### **ING5**

De nombreuses études corroborent aussi pour la protéine ING5 l'existence d'une régulation par mi-ARN. En effet, il a été démontré expérimentalement que la région 5'UTR de ING5 interagissait avec de nombreux mi-ARN : miR-196a dans une lignée de cancer du pancréas (M. Liu et al. 2013), miR-1307 dans des lignées de cancer de l'ovaire (W.-T. Chen et al. 2017), miR-24 dans une lignée de cancer du sein (Cui et al. 2017), miR-23-3p dans deux lignées d'ostéosarcomes (Ye et al. 2018), miR-193a-3P dans plusieurs lignées de cancer de vessie (Y. Li et al. 2015), miR-331-3p et miR-181b dans des lignées d'hépatocarcinomes associés au virus de l'hépatite B (Cao et al. 2015; Xie et al. 2018), miR-196b-5p dans une lignée de cancer colo-rectal (Xin et al. 2020) ou encore le miR-193 dans la lignée cellulaire HEK 293T (Jue Wang et al. 2012, 5). Dans la grande majorité de ces travaux, l'augmentation de l'expression du mi-ARN candidat entraîne une perte d'expression d'ING5 et est corrélée à un phénotype cellulaire plus agressif. Inversement, une restauration des propriétés suppressives de tumeur associée à ING5 était observée en cas d'inhibition de l'expression du mi-ARN candidat.

## 2.3 Protéines ING : structure et modifications post-traductionnelles

### 2.3.1 Structure

Les protéines ING sont caractérisées par une grande conservation de leur séquence au cours de l'évolution du vivant, notamment au niveau de leur région C-terminale (G. H. Y. He et al. 2005). *A contrario*, la partie N-terminale des protéines ING est beaucoup plus variable ce qui a pour conséquence d'attribuer à chaque membre de cette famille des fonctions biologiques spécifiques (Figure 10).



**Figure 10 : Structure des protéines ING.** La séquence des protéines ING est représentée avec ses différents domaines. On notera la grande similitude de la partie C-terminale de ces protéines composée d'un Plant Homeo Domain (PHD), et d'au moins un domaine de localisation nucléaire (NLS). La partie N-terminale comprend un domaine Nouvelle Région Conservée (NCR) et plusieurs domaines spécifiques : Leucine ZipperLike motif (LZL) pour ING2, ING3 et ING5; un domaine d'interaction avec PCNA (PIP) et un Bromo Domaine partiel (PBD) (Adapté d'après Ythier et al., 2008).

#### 2.3.1.1 Région C-terminale

##### Domaine PHD

La principale caractéristique commune à l'ensemble des protéines ING est la présence d'un domaine PHD (Plant HomeoDomain) au niveau de leur région C-terminale. Ce domaine permet l'interaction avec

des atomes de zinc et forme ainsi une structure tridimensionnelle dite en « doigt de zinc », caractérisée par la séquence Cys4–His–Cys3 qui est classiquement observée au sein des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (Bienz 2006).

Il a été démontré que le domaine PHD des protéines ING se fixe spécifiquement au niveau de la lysine 4 de l'histone H3, selon un degré d'affinité dépendant de son statut de méthylation (Shi et al. 2006). Dans les cellules eucaryotes, les histones se regroupent en 8 protéines (2 histones H2A, 2 histones H2B, 2 histones H3 et 2 histones H4) formant le nucléosome, sur lequel s'enroule environ 146 paires de bases. Les queues d'histones (région N-terminale) dépassent du nucléosome et les différents résidus qui les composent sont accessibles à des modifications post-traductionnelles dont les deux plus fréquentes sont l'acétylation et la méthylation. Concernant les protéines ING, il a été démontré que l'affinité de l'interaction avec l'histone H3 se majore selon le nombre de résidus méthylés présents sur la lysine 4 (H3K4Me3 > H3K4Me2 > H3K4Me). Les fonctions de ce domaine seront détaillées dans la partie 1.3 et 1.4.

### Domaine NLS

La séquence dite de localisation nucléaire, appelée NLS (Nuclear Localisation Signal), est une petite séquence d'acides aminés basiques, capable d'adresser la protéine porteuse vers les systèmes d'import nucléaire (Robbins et al. 1991). Toutes les protéines ING comportent une telle séquence. Il existe une particularité pour les protéines ING1, ING2 et ING4 pour lesquelles le domaine NLS comprend une ou plusieurs séquences NTS (Nucleolar Targeting Sequence), responsable d'un adressage nucléolaire. Il a d'ailleurs été rapporté que ING1 était présente au niveau du nucléole en réponse aux UV (Scott, Boisvert, et al. 2001). Les systèmes de translocation nucléo-cytoplasmique des protéines ING restent mal connus. Seule une interaction entre la protéine cargo 14-3-3 $\eta$  et le motif REASP de ING1 est décrite dans la littérature, permettant sa translocation du noyau vers le cytoplasme (Gong et al. 2006). À noter que ce motif d'acides aminés est aussi présent sur la protéine ING2 mais qu'une interaction avec la protéine 14-3-3 $\eta$  n'a pas été démontrée à ce jour.

#### 2.3.1.2 Région N-terminale

### Domaine NCR

Le domaine NCR (Novel Conserved Region) est particulièrement spécifique aux protéines ING au sein du protéome humain (He et al. 2005). Ce domaine a servi d'ailleurs de base à l'identification de tous les membres composant cette famille. Toutes les protéines ING appartiennent à des complexes Histone AcétylTransférase (HAT) ou Histone DéAcétylase (HDAC) de la chromatine, il a donc été suggéré que



le domaine NCR était responsable de la stabilisation de cette interaction (Kuzmichev et al. 2002). Du fait de l'existence d'une interaction entre la protéine ING1 avec la lamine-A (Han et al. 2008), un composant essentiel de la lamina nucléaire, certaines équipes ont renommé cette région LID pour « Lamin Interaction Domain » (Dantas et al. 2019). Cependant, il est important d'observer que cette interaction n'a été montrée que pour la protéine ING1.

### Domaine LZL

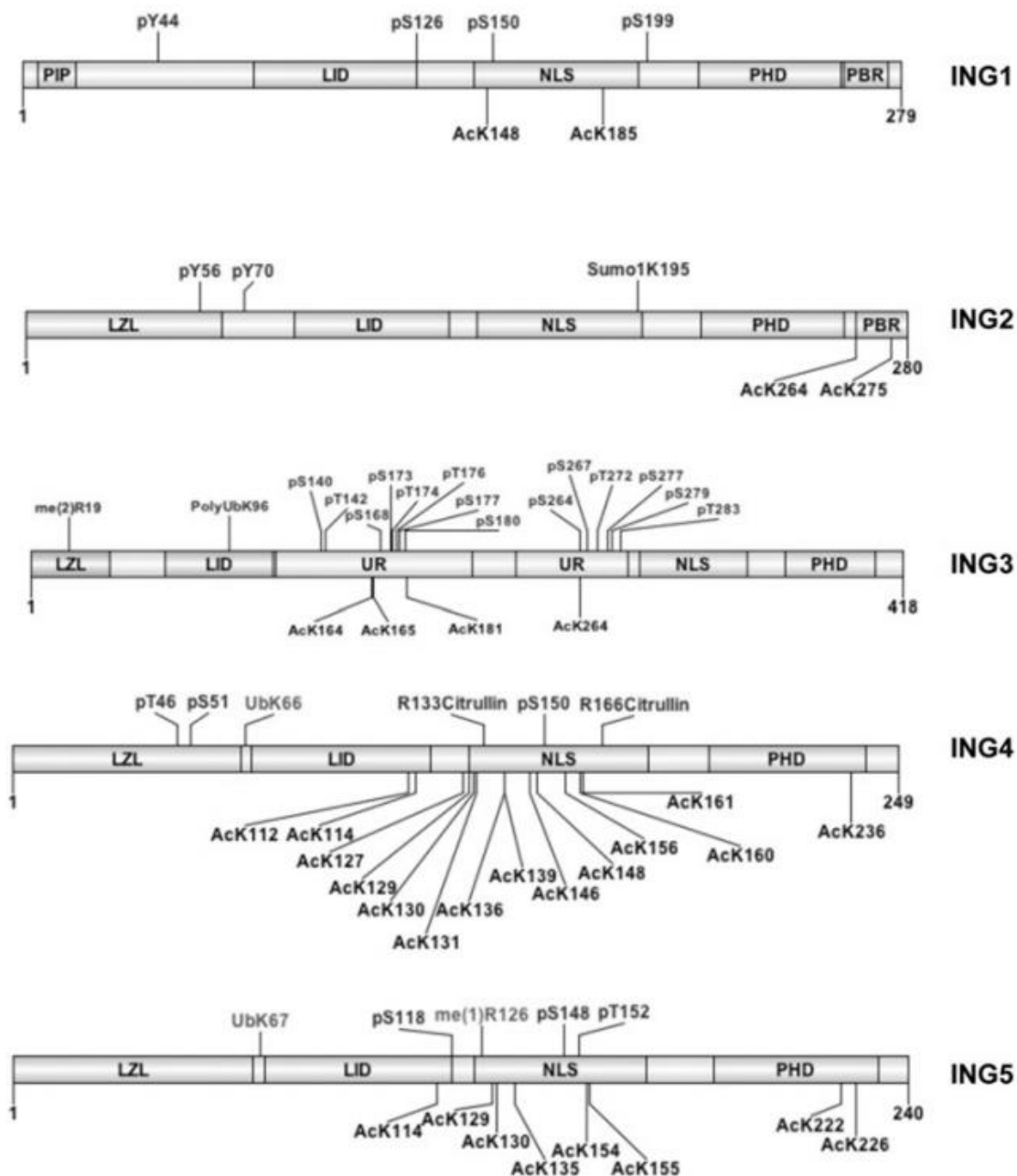
Le domaine LZL est commun à tous les membres de la famille ING à l'exception d'ING1. Ce domaine contient un résidu leucine tous les sept acides aminés formant ainsi une zone hydrophobique, rapportée comme favorable à l'interaction avec des protéines portant un domaine similaire. Par ailleurs, même si les données sur le potentiel d'homo ou hétéro-dimérisation des protéines ING se limitent surtout à des analyses *in silico* (Eapen et al. 2012), des travaux sur la structure cristallographique du domaine LZL de ING4 suggère l'existence d'une homo-dimérisation (Culurgioni et al. 2010, 4; 2012). À titre d'exemple, il a été démontré que ce domaine, également présent sur ING2, est critique à l'interaction avec p53 en réponse aux dommages à l'ADN induits par les UV (Y. Wang, Wang, et Li 2006).

### Domaines PIP et PBD

Deux domaines ont été identifiés uniquement sur la protéine ING1 et associés à des fonctions spécifiques : le domaine PIP (PCNA Interacting Protein motif) et le domaine PBD (Partial BromoDomain). Le premier domaine permet l'interaction de la protéine ING1 avec la protéine PCNA, composant majeur de la fourche de réplication de l'ADN génomique, en réponse aux UV (Scott, Bonnefin, et al. 2001). Le deuxième est un domaine dont la fonction n'a pas été clairement élucidée, mais qui serait nécessaire à l'expression de Heat Shock Protein 70 (HSP70) médiée par ING1 (Feng, Bonni, et Riabowol 2006) et à l'interaction avec la protéine SAP30, composant du complexe mSin3A-HDAC1/2 (Kuzmichev et al. 2002).

#### **2.3.2 Modifications post-traductionnelles**

Les principales modifications post-traductionnelles intéressant les protéines ING sont résumées dans la Figure 11 (Satpathy, Nabbi, et Riabowol 2013).



**Figure 11 : Modifications post-traductionnelles des protéines ING.** Chaque protéine ING est représentée schématiquement avec notification du site (acide aminé et sa position) et du type (p : phosphorylation ; Ac : acetylation ; me : méthylation ; Sumo : sumoylation ; Ub : ubiquitinylation ; citrullin : citrullination) des modifications post-traductionnelles décrites à ce jour (dapté d'après Satpathy et, 2013).

### 2.3.2.1 Phosphorylation

La phosphorylation est un mécanisme de régulation post-traductionnel très commun pour les protéines humaines. En effet, des analyses biochimiques suggèrent qu'environ 70% du protéome humain pourrait être phosphorylé (Olsen et al. 2010).

Concernant les protéines de la famille ING, la première preuve de phosphorylation a été faite sur le résidu Ser199 de la protéine ING1. L'interaction entre ING1 et la protéine cargo 14-3-3 $\eta$  est dépendante de cette phosphorylation, assurant ainsi son export du noyau vers le cytoplasme (Gong et al. 2006). De plus, il a été montré que la protéine ING1 est phosphorylée sur son résidu Ser126 par la protéine kinase CHK1 en réponse à un stress induit par les UV dans une lignée humaine de mélanome (Garate et al. 2007). Cette phosphorylation est importante pour la stabilité de la protéine ING1, dans la mesure où celle-ci promeut l'interaction entre ING1 et la NAD(P)H quinone oxydoreductase 1, inhibant la dégradation de cette dernière par le protéasome 20S (Garate et al. 2008). Par ailleurs, des travaux récents ont rapporté l'existence d'une phosphorylation de ING1 par la protéine à activité tyrosine kinase Src (Yu et al. 2013, 1), ce qui impacte également sa stabilité. À noter que les sites de ING1 phosphorylés par la protéine Src sont, à ce jour, toujours inconnus.

Enfin, on rappellera que la grande majorité des sites de phosphorylation mis en évidence sur les protéines ING proviennent d'analyse *in silico* (Hornbeck et al. 2012) et leur relevance biologique reste encore à démontrer.

### 2.3.2.2 Sumoylation

La sumoylation est un mécanisme post-traductionnel d'une grande importance biologique pour la régulation de la fonction et de la localisation des protéines. Elle se caractérise par la création d'une liaison covalente entre le résidu lysine d'une protéine cible et une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin like MOdifier). Ce processus biologique est très dynamique car réversible par les protéases de la famille des SENP (SENtrin-specific Protease), mécanisme dénommé désomoylation (Yeh 2009).

La première démonstration d'une régulation post-traductionnelle par sumoylation concernant la famille des gènes *ING* a intéressé la protéine ING2. Une étude antérieure de notre groupe a en effet démontré l'existence d'une sumoylation sur le résidu lysine 195 de la protéine ING2, aussi bien *in vitro* que *in vivo*. D'un point de vue fonctionnel, cette modification apparaît nécessaire pour l'interaction de ING2 avec mSin3a et favorise l'accès du promoteur du gène *TMEM71* au complexe mSin3a-HDAC-ING2 (D. Ythier et al. 2010). De manière analogue, des travaux plus récents ont confirmé l'existence d'une sumoylation du résidu lysine 193 de la protéine ING1 par la SUMO-ligase PIAS4. À nouveau, l'occupation du

promoteur de gènes cibles de ING1 (*GCR8* et *ISG15*) et leur activité transcriptionnelle apparaît dépendante de cette sumoylation (Satpathy et al. 2014). Par ailleurs, une étude de notre groupe a démontré que cette même sumoylation permet l'interaction entre le facteur de transcription HIF1 $\alpha$  (Hypoxia Inductible Factor 1) et ING1 dans un modèle de cellules souches dérivées de tissu adipeux. Cette interaction protéique permet d'orienter HIF1 $\alpha$  vers le protéasome et régule ainsi sa dégradation. Dans la mesure où HIF1 $\alpha$  contrôle la différenciation des cellules souches dérivées de tissu adipeux, cette étude a proposé un modèle de contre-régulation médiée par la sumoylation de ING1 (Bigot et al. 2015).

### 2.3.2.3 Ubiquitylation

L'ubiquitylation est un processus multi-étapes aboutissant à la liaison covalente et réversible d'ubiquitine sur un résidu lysine d'une protéine cible. Cette modification post-traductionnelle nécessite l'action de trois groupes d'enzymes spécifiques : « E1 Ubiquiting activating », « E2 Ubiquitin conjugating » puis « E3 Ubiquitin ligase ». L'ubiquitylation des protéines permet leur adressage vers le protéasome et ainsi leur dégradation (Reinstein et Ciechanover 2006).

Il a été démontré que la dégradation des protéines ING1 et ING2 par le protéasome est régulée par ubiquitylation par l'E3 ubiquitine ligase SMURF1 (Smad Ubiquitination Regulating Factor 1). En ce qui concerne ING2, ce sont les domaines NLS et NCR qui sont impliqués dans cette interaction protéique alors que la polyubiquitylation intéresse le domaine PHD (Nie et al. 2010). Enfin, la protéine ING3 est aussi ubiquitylée sur son résidu lysine 96 par l'E3 ubiquitine ligase Skp2 (G. Chen et al. 2010).

### 2.3.2.4 Citrullination

La citrullination consiste en une modification enzymatique d'un peptidylarginine en peptidycitrulline. Cette modification post-traductionnelle est une désamination qui entraîne une perte de la charge positive de la protéine changeant ainsi sa conformation et en conséquence, ses fonctions biologiques (György et al. 2006).

Une étude a démontré que la protéine ING4 pouvait subir une citrullination sur son résidu arginine en position 166 (domaine NLS), *via* l'enzyme PAD4. Cette modification post-traductionnelle empêche l'interaction entre ING4 et la protéine p53. De plus, la protéine ING4 citrullinée est dégradée plus rapidement en comparaison à sa forme non modifiée (Guo et Fast 2011).

## 2.4 Fonctions communes aux membres de la famille ING

Les protéines ING ne présentent aucune activité enzymatique et leurs fonctions dépendent exclusivement des partenaires protéiques qui leur sont associés. Les fonctions biologiques impliquant cette famille de gènes sont nombreuses dont certaines sont partagées par tous ses membres. Ainsi, chacun des membres de la famille ING appartient à un complexe HAT ou HDAC dont la principale fonction est la régulation de la prolifération cellulaire.

### 2.4.1 Appartenance aux complexes protéiques HAT ou HDAC

#### 2.4.1.1 Etudes chez la levure

La première démonstration de l'interaction des protéines ING avec les complexes impliqués dans les modifications post-traductionnelles des queues d'histones a été faite chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Deux équipes canadiennes ont été les premières à identifier dans ce modèle animal, au début des années 2000, la présence des orthologues des protéines ING1/2 (Pho23) au sein du complexe HDAC Rpd3 (Loewith et al. 2001, 23) et ING3 (Yng2) au sein du complexe HAT NuA4 (Nourani et al. 2001). Une autre étude a suivi peu après pour confirmer que l'orthologue de ING4/5 (Yng1) appartenait au complexe HAT NuA3 (Howe et al. 2002). Ces travaux sur modèles animaux ont montré que les orthologues des protéines ING étaient nécessaires pour le fonctionnement normal des complexes HAT et HDAC, maillons indispensables du remodelage de la chromatine (Figure 12).

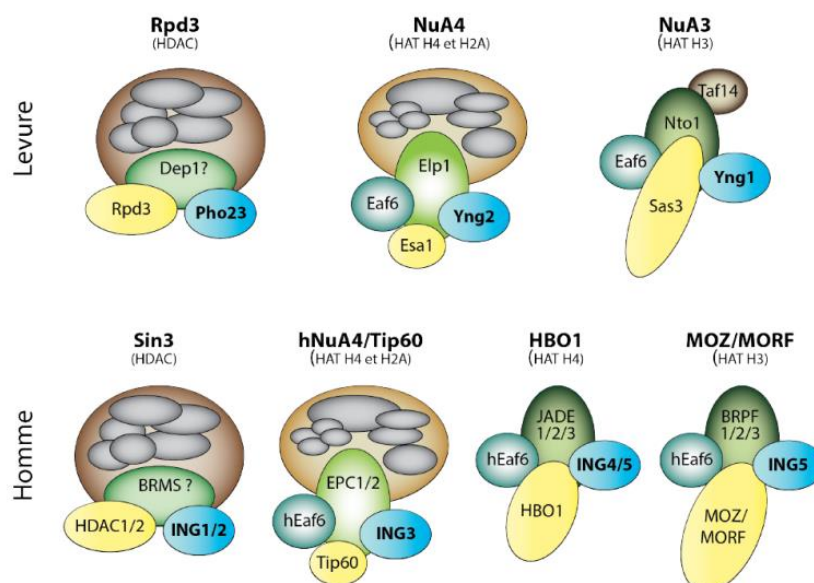


Figure 12: Les protéines ING sont membres de différents complexes Histone AcetylTransférase ou Histone Déacetylase. La partie supérieure représente l'état des connaissances chez la levure, la partie inférieure représente l'état des connaissances chez l'homme (Adapté d'après Doyon et al., 2006).

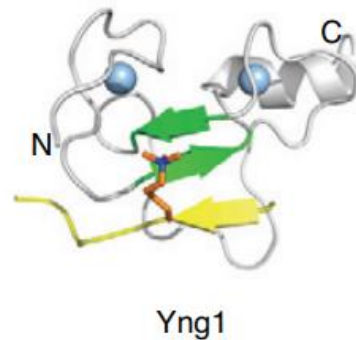
#### 2.4.1.2 Données chez l'homme

Plusieurs études complémentaires menées sur cellules humaines ont dans un premier temps démontré l'existence d'une association entre la protéine ING1 et le complexe mSin3a-HDAC par le biais d'une interaction directe avec la protéine SAP30 (Skowyra et al. 2001; Kuzmichev et al. 2002). En 2006, les travaux de Doyon ont pu préciser davantage le lien étroit entre les protéines ING et les complexes HAT ou HDAC. En effet, à l'aide de la spectrométrie de masse et technique de co-immunoprécipitation, ils ont pu confirmer que ING1 et ING2 appartenait au complexe mSin3a/HDAC, mais de manière mutuellement exclusive. De plus, ils ont pu caractériser l'appartenance de ING3 au complexe HAT NuA4/Tip60, l'appartenance de ING4 et ING5 au complexe HAT HBO1/JADE et l'appartenance spécifique de ING5 au complexe HAT MOZ/MORF (Doyon et al. 2006). Ces découvertes, largement confirmées depuis, permettent d'asseoir l'importance chez l'homme des protéines ING dans les phénomènes de modification de la chromatine.

#### 2.4.2 Interactions avec les marques d'histones H3K4me3

L'une des caractéristiques communes structurales aux protéines ING est la préservation d'un domaine PHD au sein de tous les membres de cette famille. Ce domaine comporte 50 à 80 acides aminés et comprend une séquence Cys4–His–Cys3 dite en « doigt de zinc », qui est classiquement décrite dans les nombreuses protéines associées à la chromatine (Figure 13) (Sanchez et Zhou 2011).

La première confirmation de l'interaction entre une protéine ING et la chromatine a été faite en 2006. Un travail reposant sur des méthodes complémentaires d'immunoprécipitation protéique et de chromatine a pu démontrer que la protéine ING2 se liait à la marque histone H3K4 avec une affinité dépendante de son statut de méthylation. En effet, l'interaction la plus forte était observée en cas de triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 puis diminuait à mesure du retrait des groupes méthyl (H3K4me3>H3K4me2>H3K4me1) (Shi et al. 2006). De manière frappante, les acides aminés responsables de l'interaction avec H3K4me3 sont intégralement conservés au sein de chaque domaine PHD des protéines ING (S. Kim et al. 2016; G. H. Y. He et al. 2005). Enfin, une analyse protéomique de criblage à grande échelle a pu caractériser l'existence d'une interaction entre Yng1, Yng2 et Pho23 et la marque histone H3K4me3 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Shi et al. 2007).



**Figure 13 : Représentation tridimensionnelle de l'interaction entre le domaine PHD de Yng1 (orthologue de ING4/5) et la chromatine.** En vert apparaît les deux hélices  $\beta$  du domaine PHD, les atomes de Zinc sont représentés par des sphères bleues et une partie de l'histone H3 est visible en jaune (apparaissant triméthylé). (adaptée d'après Sanchez et Zhou, 2011)

Au total, ces données démontrent que les protéines ING sont des protéines lectrices (« readers ») du code histone et que l'interaction avec la marque d'histone H3K4me3 est restée hautement conservée au cours de l'évolution. Ce mécanisme permet donc le recrutement des complexes HAT ou HDAC sur les promoteurs des gènes activement transcrits (marques H3K4me3) et ainsi réguler leur expression.

#### 2.4.3 Existence d'un lien fonctionnel avec la protéine suppressive de tumeur p53

Les premiers travaux à l'origine de la découverte des gènes *ING* en 1996 avaient déjà montré l'existence d'un lien fonctionnel entre la protéine ING1 et p53 (Garkavtsev et al. 1996b). En effet, une expression exogène de la protéine ING1 dans un modèle cellulaire sauvage pour le gène *TP53* induisait un arrêt de la prolifération cellulaire. Ce phénotype n'était pas observé dans le même modèle ayant subi une inactivation du gène *TP53*, suggérant alors une dépendance à la voie de signalisation p53. Depuis, plusieurs études ont démontré que les protéines ING étaient capables d'interagir avec l'acétylase p300, contrôlant ainsi le statut d'acétylation de p53 sur la lysine 382 et par conséquent des gènes cibles tels que *Bax* ou *p21* (M. Nagashima et al. 2001, 53; Pedoux et al. 2005; X. Zhang et al. 2005, 4). La protéine ING3 n'est pas décrite pour interagir avec p300 mais la publication à l'origine de sa description démontre que la surexpression de ING3 influence l'expression de *Bax* et *p21* et ce, de manière dépendante de l'expression p53 (Makoto Nagashima et al. 2003, 3). Par ailleurs, des travaux complémentaires ont montré que ING1 est aussi impliquée dans le maintien de l'acétylation de p53 par la liaison avec la déacétylase SIRT1 (Sirtuin1), ce qui résulte en l'inhibition de son activité sur p53 (Kataoka et al. 2003). Enfin, une étude a aussi démontré que ING1 est capable d'interagir avec MDM2 (Mouse Double Minute 2 - principale E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation de p53), de manière compétitive avec p53, abrogeant ainsi sa dégradation (Leung et al. 2002, 2). Des travaux plus

récents ont démontré que la protéine ING5 interagit avec le cofacteur TIP60, ce qui favorise l'acétylation de p53 sur son résidu lysine 120 et induit la transcription des gènes cibles *GADD45* et *Bax* (N. Liu et al. 2013).

Au final, toutes ces études confirment le lien fonctionnel unissant les protéines ING et l'activité de la protéine p53. On se doit de rappeler cependant que l'essentiel des travaux à l'origine de ces découvertes repose sur des modèles de surexpression, biaisant ainsi la finesse de l'analyse mécanistique. Enfin, les données publiées à propos des modèles murins déficients (knock-out) pour les gènes *ING1* et *ING2* confirment aussi l'existence de leur implication dans les mécanismes de mort par apoptose, de façon indépendante de p53. En effet, quel que soit le statut de p53, les lignées primaires inactivées pour le gène *ING1* sont plus sensibles à l'apoptose en condition de stress radio-induit (Coles et al. 2007). Par ailleurs, le défaut de spermatogénèse observé chez les souris déficientes pour *ING2* et l'augmentation des marqueurs d'apoptose au niveau tubes séminifères est indépendant de l'expression de p53 (M. Saito et al. 2010). En conséquence, nombre des fonctions des protéines ING, bien que redondantes avec la voie de signalisation p53, restent bien distinctes de cette dernière et doivent donc être mieux caractérisées.

### **3 LA PROTEINE ING2 : CARACTERISATION D'UN GÈNE SUPPRESSEUR DE TUMEUR**

Les gènes *ING1* et *ING2* ont été proposés comme des gènes suppresseurs de tumeur depuis leur découverte à la fin des années 1990. Concernant le gène *ING2*, nous allons détailler ci-après les principaux arguments scientifiques qui supportent cette hypothèse : l'implication de la protéine *ING2* dans des processus biologiques suppresseurs de tumeur, la perte d'expression fréquente du gène *ING2* dans les tumeurs humaines et l'apparition spontanée de tumeurs dans les modèles murins *ING2-KO*.

#### **3.1 Fonctions suppressives de tumeurs**

##### **3.1.1 Fonction suppressives de tumeur « gatekeeper »**

###### **3.1.1.1 Régulation de la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose et le cycle cellulaire**

Les premiers travaux sur la protéine *ING2* ont décrit son interaction avec l'histone H3 et suspecté un rôle de régulateur épigénétique. Du fait de l'absence d'interaction observée *in vitro* par l'utilisation de protéines recombinantes, il a été proposé la possibilité d'une interaction dépendante de modifications post-traductionnelles de l'histone H3. C'est l'équipe du Dr Gozani qui a en effet pu démontrer que



l'affinité de ING2 pour l'histone H3 était influencée par son statut de méthylation sur la lysine 4 (Shi et al. 2006, 3). Des travaux ultérieurs ont montré que l'interaction d'ING2, via son domaine PHD, avec les marques H3K4me3 permettait le recrutement du complexe Sin3A/HDAC. L'impact fonctionnel observé est la répression transcriptionnelle de gènes cibles par déacétylation des histones (Peña et al. 2006, 4; Doyon et al. 2006). Parmi les gènes dont l'expression est régulée par ING2 en réponse à un stress génotoxique, on peut citer les gènes *Cyclin D1*, *c-myc*, *p21* ou *TMEM71*. Ainsi, la protéine ING2 régule l'activité transcriptionnelle de gènes contrôlant l'apoptose, la sénescence et la progression du cycle cellulaire (Figure 14).

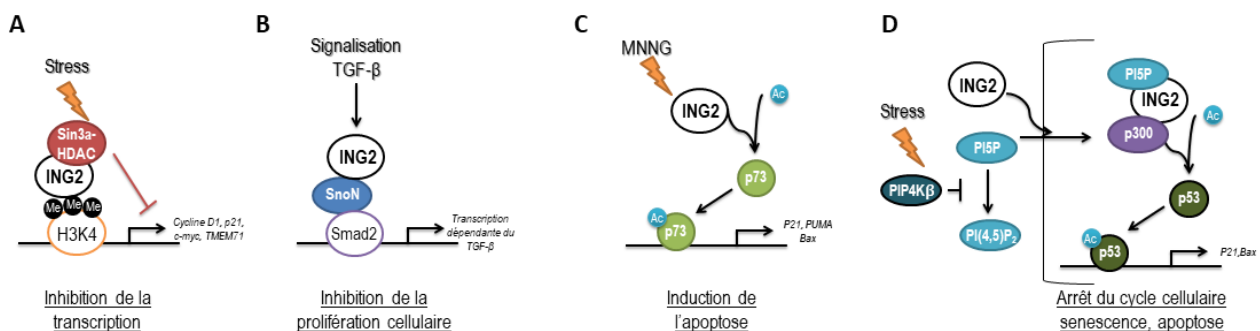
### 3.1.1.2 Régulation de la transcription dépendante du TGF- $\beta$ et de la prolifération cellulaire

Un lien entre la signalisation TGF- $\beta$  et ING2 a été mise en évidence en 2008. En effet, une étude a démontré qu'une liaison entre ING2 (par son domaine PHD) et la protéine SnoN (Ski-like oncogene) survenait en réponse à une stimulation de la voie TGF- $\beta$  (Figure 14). Cette interaction permet le recrutement du facteur de transcription SMAD2 et la formation d'un complexe protéique qui induit ensuite la transcription de gènes cibles du TGF- $\beta$ . Cela conduit au final à une inhibition de la prolifération cellulaire (Sarker et al. 2008). Dans la mesure où les altérations de la voie TGF- $\beta$  sont impliquées dans les processus d'oncogenèse, les auteurs ont proposé que la perte de l'expression d'ING2 observée dans les tumeurs humaines puisse constituer un mécanisme d'échappement à la régulation par le TGF- $\beta$  dépendante de SMAD2.

### 3.1.1.3 Régulation de l'acétylation de p53, p73 $\alpha$ et inhibition de la prolifération cellulaire

Sur le plan expérimental, la surexpression de ING2 dans des fibroblastes humains induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub> et un phénotype cellulaire sénescence. Inversement, la diminution de l'expression d'ING2 aboutit à une perte de la capacité des cellules à entrer en sénescence (M. Nagashima et al. 2001). D'un point de vue fonctionnel, il a été démontré que la protéine ING2 contrôlait l'acétylation de p53 sur son résidu lysine 382 par une interaction avec l'acétylase p300 (Pedeux et al. 2005). Une autre étude a pu rapporter qu'en réponse à un stress génotoxique (M-methyl-N'-nitro-N-nitrosoGuanidine), ING2 contrôlait aussi le statut d'acétylation de p73 $\alpha$  (dans un modèle cellulaire sauvage pour le gène *TP53*) même si l'acétylase impliquée dans ce cas précis n'est pas encore connue (Sun, Jin, et Baskaran 2009). Or, l'acétylation des protéines de la famille p53 est critique pour la régulation de leur activité transcriptionnelle (Collavin, Lunardi, et Del Sal 2010). En conséquence, par le contrôle de cette modification post-traductionnelle, ING2 module l'activité transcriptionnelle de p53 et p73 $\alpha$  dont les gènes cibles sont des acteurs majeurs du contrôle de l'apoptose ou du cycle cellulaire (par exemple, *PUMA*, *Bax* ou *p21*) (Figure 14). Dans le cas de p53, une étude a aussi démontré qu'en

réponse à un stress génotoxique (etoposide), une interaction entre ING2 et le phosphatidylinositol-5-phosphate (PI5P) était nécessaire à l'acétylation de p53, faisant de la protéine ING2 une protéine effectrice des PIP (Gozani et al. 2003). Les PIP sont des molécules de signalisation lipidiques régulant un grand nombre de processus biologiques, comprenant la survie, la croissance et la prolifération cellulaire. Sur le plan mécanistique, une seconde étude a démontré que c'est par la phosphorylation de PI4K $\beta$  (kinase phosphorylant PI5P en PI(4,5)P $_2$ ) que le niveau de PI5P et de ING2 augmentait au niveau de la fraction chromatinienne (Figure 14) (Jones et al. 2006).



**Figure 14 : Fonctions suppressives de tumeurs « gatekeeper » d'ING2.** A. En réponse à un stress génotoxique, ING2 complexé avec Sin3a/HDAC se lie, via son PHD, à l'histone 3 tri-méthylée sur sa lysine 4 permettant la régulation transcriptionnelle de ses cibles. B. SnoN s'associe à ING2 permettant la transcription médiée par Smad2 et induite par le TGF- $\beta$ . C. En réponse à un stress génotoxique induit par le MNNG, ING2 favorise l'acétylation de p73a et donc la transcription de ses gènes cibles. D. En réponse à un stress la protéine kinase p38 est phosphorylée. Cette activation de p38 permet la phosphorylation de PIP4K $\beta$  bloquant ainsi la transformation de PI5P en PI(4,5)P $_2$ . L'accumulation de PI5P est alors rendue possible. Le passage de PI5P dans le noyau et son accumulation à la chromatine permet la stabilisation d'ING2. Ce recrutement d'ING2 permet l'acétylation de p53 via p300 et donc une activation transcriptionnelle des gènes cibles par p53 (adapté d'après Guérillon, Larrieu, et Pedoux 2013).

### 3.1.2 Fonction suppressives de tumeur « caretaker »

#### 3.1.2.1 Implication dans la réponse aux dommages de l'ADN

Les premières études sur ce sujet ont démontré dans un premier temps que la protéine ING1 était impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN induit par les UV, via le système de réparation NER (Nucleotide Excision Repair) (Scott, Bonnefin, et al. 2001; Scott, Boisvert, et al. 2001; Kuo et al. 2007). Des travaux indépendants sur des lignées de mélanome ont montré, quelques années plus tard, que la protéine ING2 était nécessaire d'une part à l'acétylation de la queue d'histone H4 afin de décompacter la chromatine en réponse aux radiations UV, et d'autre part au recrutement de la protéine XPA sur les sites d'ADN endommagés (Jing Wang, Chin, et Li 2006).

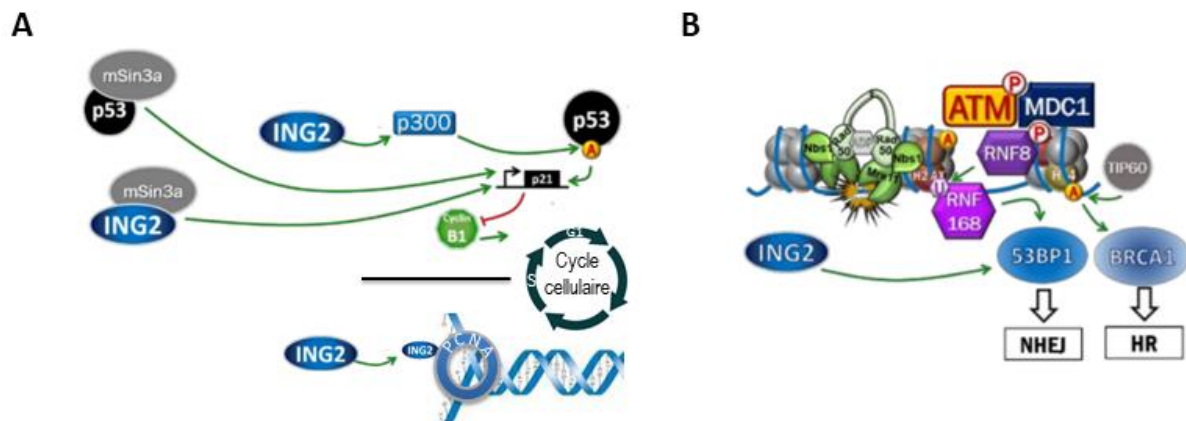
En plus de l'implication dans le système de réparation NER, des travaux datant du début des années 2000, ont aussi démontré un rôle potentiel d'ING2 dans la réponse aux cassures double brin de l'ADN. En effet, les premiers indices reposaient sur l'observation expérimentale d'une augmentation de l'expression de la protéine ING2 dans des modèles cellulaires tumoraux, en réponse à certains stress

génotoxiques tels que l'etoposide ou la neocarzinostatine (M. Nagashima et al. 2001). De plus, d'autres travaux avaient aussi observé qu'à l'état basal, les cellules dont l'expression d'ING2 étaient réprimée présentaient une augmentation de la phosphorylation de l'histone H2AX, témoin moléculaire de dommages à l'ADN (Larrieu et al. 2009). Récemment, des travaux de l'équipe ont démontré que la protéine ING2 favorisait le recrutement de la protéine 53BP1 (effecteur majeur de la réparation de l'ADN par NHEJ) sur les sites de cassures double brin de l'ADN induites par micro-irradiation laser (Figure 15). Plus précisément, l'expression de ING2 est en effet nécessaire à la localisation chromatinienne de la protéine RNF168 (E3 ubiquitin ligase) dont le rôle est critique pour l'ubiquitinylation de 53BP1 et l'histone H2A, modification post-traductionnelle qui garantit leur activité fonctionnelle précoce en réponse aux cassures double brin de l'ADN (Guerillon et al. 2012).

### 3.1.2.2 Contrôle de la réplication de l'ADN et de la progression du cycle cellulaire

Des travaux antérieurs de l'équipe ont démontré que la protéine ING2 pouvait réguler la progression de la fourche de réplication de l'ADN (Larrieu et al. 2009). En effet, en réprimant l'expression de la protéine ING2 dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome sauvage pour p53 (U2OS), il a été observé une diminution de la présence de la protéine PCNA sur la fraction chromatinienne. ING2 interagit avec la protéine PCNA *via* une région comprise entre ses domaines LZL et NLS. L'abrogation de cette interaction induit un ralentissement de la progression de la fourche de réplication et une augmentation du taux d'échanges des chromatides sœurs suggérant l'induction d'une instabilité chromosomique.

De manière cohérente avec ces travaux, l'inhibition de l'expression de ING2 aboutit à une accumulation des cellules en phase S du cycle cellulaire (Larrieu et al. 2010). L'impact d'ING2 sur le cycle cellulaire ne se limite pas au ralentissement de la phase S, dans la mesure où ING2 exerce aussi un contrôle de l'expression du gène *p21*, inhibiteur principal de la transition  $G_1/S$  et ce, de manière à la fois dépendante et indépendante de p53 (Figure 15). En effet, la diminution expérimentale de l'expression d'ING2 dans des lignées cellulaires aboutit à une diminution de l'acétylation de p53 sur son résidu lysine 382 par l'acétylase p300, ce qui en conséquence, inhibe son activité transcriptionnelle sur le gène *p21* (M. Nagashima et al. 2001; Pedoux et al. 2005). Par ailleurs, il a été démontré que le gène *Cyclin D1* était aussi une cible du complexe répresseur ING2/Sin3A/HDAC, indépendamment de p53 (Shi et al. 2006). Ensuite, ING2 a aussi été impliquée dans les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire induits par le TGF- $\beta$  (Sarker et al. 2008). On notera enfin qu'au cours du cycle cellulaire, il existe une augmentation constitutive de l'expression de ING2 du début de la phase S jusqu'à la transition  $G_2/M$ , et ce de manière parallèle à l'expression de p21 (Larrieu et al. 2010).



**Figure 15 : Fonctions suppressives de tumeurs de type I « caretaker » d'ING2.** A. ING2 contrôle le statut d'acétylation de p53 par l'intermédiaire de l'acétylase p300. Cette modification post-traductionnelle de p53 régule l'activité transcriptionnelle sur ses gènes cibles, notamment *p21*. De manière indépendante, le complexe mSin3a/ING2 régule directement l'expression du gène *p21*. Ainsi, par deux mécanismes, ING2 régule la transition S/G1 du cycle cellulaire. De plus, ING2 contrôle la vitesse de progression de la fourche de réplication par l'intermédiaire de son interaction avec PCNA et donc influence le déroulement de la phase S du cycle cellulaire. B. En réponse à une cassure double brin de l'ADN, ING2 est recrutée sur les sites de cassure après la cascade de signalisation initiale et participe à l'accumulation de la protéine 53BP1. (adapté d'après Archambeau, Blondel, et Pedoux 2019).

### 3.2 Perte d'expression dans les tumeurs humaines

À ce jour, plusieurs études ont exploré le statut des gènes *ING*, et particulièrement du gène *ING2* dans les tumeurs humaines. Notre équipe a déjà publié une revue exhaustive sur le sujet (Guérillon, Bigot, et Pedoux 2013) qui a été mise à jour récemment (Blondel et al. 2019). Le tableau 1 ci-dessous résume l'état des connaissances sur ce point.

Type de tumeur	Origine	Altération	Fréquence	Référence
<b>Ameoblastome</b>	Patient	Perte d'hétérozygotie	14/28	<i>Borkosky et al.</i>
<b>Cancer du sein</b>	Lignées	Diminution de l'ARNm	3/9	<i>Walzak et al.</i>
<b>Cancer du colon</b>	Patient	Augmentation de l'ARNm	22/39	<i>Kumamoto et al</i>
	Lignées	Augmentation de l'ARNm	3/8	
<b>Cancer ORL</b>	Patient	Perte d'hétérozygotie	30/55	<i>Borkosky et al.</i>
<b>Hépatocarcinome</b>	Patient	Diminution de l'ARNm	16/29	<i>Zhang et al.</i>
		Diminution de l'expression protéique	40/84	
	Patient	Perte d'hétérozygotie	41,2%	
<b>Cancer bronchique</b>	Lignées	Diminution de l'ARNm	7/8	<i>Stark et al.</i>
	Lignées	Diminution de l'ARNm	2/2	<i>Walzak et al.</i>
	Patient	Diminution de l'ARNm	15/22	<i>Ythier et al.</i>
		Diminution de l'expression protéique	70/120	
<b>Mélanome</b>	Patient	Diminution de l'expression protéique	-	<i>Lu et al.</i>
<b>Cancer de l'ovaire</b>	Lignées	Pas de modification de l'ARNm	1	<i>Walzak et al.</i>
<b>Cancer du pancréas</b>	Lignées	Pas de modification de l'ARNm	1	<i>Walzak et al.</i>
<b>Cancer de la prostate</b>	Lignées	Pas de modification de l'ARNm	2	<i>Walzak et al.</i>

Tableau 1 : Statut de *ING2* dans les tumeurs et lignées humaines. (adapté de Guérillon, Bigot, et Pedoux 2013)

Sur le plan génomique, la fréquence de mutation du gène *ING2* est très faible dans les tumeurs humaines et l'altération la plus fréquemment observée est la délétion, notamment par perte d'hétérozygotie de la région chromosomique de *ING2* (4q.35.1). Celles-ci ont été décrites par des petites séries rétrospectives dans les pathologies suivantes : améloblastome (14/28), carcinome ORL (30/55), carcinome hépatocellulaire (41.2%) et carcinome basocellulaire (3/11) (Sironi et al. 2004; Borkosky et al. 2009; Huakun Zhang et al. 2010; Borkosky et al. 2010; Cetin et al. 2008). Dans les cancers ORL, cette altération est associée à un stade tumoral plus avancé et une survie-sans-récidive plus courte. Par ailleurs, des pertes chromosomiques plus larges contenant le gène *ING2* ont aussi été rapportées dans des cas de léiomyosarcomes utérins (3/6) (Mittal et al. 2009). Enfin, une étude portant sur les carcinomes épidermoïdes œsophagiens a rapporté l'existence d'une hyperméthylation d'îlots CpG sur plusieurs régions introniques du gène *ING2* (H.-Q. Wang et al. 2018), mais l'impact fonctionnel de cette altération épigénétique sur l'expression du gène *ING2* reste à déterminer.

À l'échelle transcriptomique, plusieurs travaux se sont intéressés au taux d'ARNm du gène *ING2* au sein du tissu tumoral humain à l'aide d'approche qPCR. Ces études, principalement rétrospectives et basées sur de petits effectifs, ont montré des résultats contradictoires. En effet, parfois une diminution

de l'expression du gène *ING2* était observée dans certains contextes tumoraux (carcinomes hépatocellulaires, carcinomes baso-cellulaires et ostéosarcomes), contrastant avec des résultats inverses observés dans d'autres types de cancers (par exemple dans les cancers colorectaux) (Hua-kun Zhang et al. 2008; X.-R. Han et al. 2014; Temel et al. 2015, 2; Kumamoto et al. 2009). De manière intéressante, une étude menée à partir de lignées de cancers mammaires humains a démontré l'existence d'une régulation du gène *ING2* par le miR-8084 (Gao et al. 2018). L'existence d'une telle régulation post-transcriptionnelle pourrait expliquer une partie des résultats contradictoires observés entre l'expression de la protéine *ING2* et le niveau de transcription de son ARNm (Shuang Zhao et al. 2016).

Enfin, plusieurs études s'intéressant à l'expression d'*ING2* par analyse immunohistochimique ont aussi rapporté une grande variabilité de son expression en fonction du type de tumeur considéré. Ainsi, une diminution de l'expression de *ING2* a été rapportée dans le cancer bronchique, le mélanome, le carcinome hépatocellulaire et l'ostéosarcome (Lu et al. 2006; Hua-kun Zhang et al. 2008; Shuang Zhao et al. 2016; Damien Ythier et al. 2010; Pan et al. 2014). Dans certains de ces travaux, la perte d'expression d'*ING2* était associée à des caractéristiques cliniques ou pronostiques comme la taille tumorale, le stade de la maladie ou le type histologique. En cohérence avec les données transcriptomiques, plusieurs études immunohistochimiques ont démontré, l'existence d'une surexpression d'*ING2* dans certains types tumoraux, comme le carcinome de l'endomètre (Shuang Zhao et al. 2016). De plus, des études menées sur des lignées cellulaires ont aussi démontré que *ING2* pouvait être surexprimée à l'échelle protéique dans le carcinome du col utérin, le cancer du côlon ou la leucémie aiguë lymphoblastique (Kumamoto et al. 2009; Shuang Zhao et al. 2016; J. Jiang et al. 2019). Il est important de souligner que les anticorps reconnaissant *ING2* utilisés dans chacune de ces études de cohortes rétrospectives étaient différents et leur spécificité est reconnue comme étant très hétérogène.

À la lumière de tous ces travaux, on peut retenir que l'expression de la protéine *ING2* est majoritairement perdue dans les tumeurs humaines. D'un point de vue fonctionnel, cette perte à l'échelle protéique n'est pas expliquée par la présence d'altérations génomiques (faible proportion de perte d'hétérozygotie, très faible taux de mutation et majoritairement non-sens). Le niveau de transcription de l'ARNm de *ING2* est très variable selon les études considérées et plusieurs études indépendantes suggèrent l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle par micro-ARN qui pourrait expliquer, au moins en partie, la perte d'expression observée dans certains types de cancer (J. Jiang et al. 2019; Gao et al. 2018).

### 3.3 Apport des modèles animaux

Des modèles murins avec inactivation bi-allélique de *ING2* ont été élaborés par l'équipe du Dr Saito en 2010 (M. Saito et al. 2010). Ces souris sont stériles et développent spontanément et avec une plus grande fréquence des sarcomes des tissus mous (*ING2*<sup>-/-</sup>:13/28 soit 48% contre *ING2*<sup>+/+</sup>: 3/22 soit 14%; suivi de 2 ans). Plus précisément, une majorité d'histiocytosarcomes et quelques cas d'hémangiosarcomes ou de neurofibrosarcomes ont été constatés et ce, sans détecter de signes de vieillissement précoce sur les sujets de l'étude. Par ailleurs, l'analyse plus précise de la cause d'infertilité a permis de démontrer que ces souris présentaient une déficience de la spermatogénèse (petits testicules, dégénération des tubes séminifères, morphologie et motilité anormale des spermatozoïdes). Les auteurs ont pu observer que ce phénotype était secondaire à un échec de méiose lors de la gamétogénèse. Ces expérimentations animales confortent donc la fonction suppressive de tumeur du gène *ING2*.

## 4 LA PROTEINE ING3 : UNE AMBIVALENCE FONCTIONNELLE DANS LA CELLULE TUMORALE

À l'instar de la protéine *ING2*, *ING3* est impliquée dans des fonctions suppressives de tumeur (Figure 16). Cependant, celles-ci restent encore mal connues et des études récentes suggèrent un potentiel rôle oncogénique dans certaines conditions tissus-spécifiques. Les modèles murins inactivés pour *ING3* se sont révélés létaux et leur développement s'arrête après 10,5 jours d'embryogénèse par défaut de fermeture du tube neural (Fink et al. 2019).

### 4.1 Fonctions suppressives de tumeur

#### 4.1.1 Membre constitutif du complexe Nu4/Tip60

Des travaux de spectrométrie de masse et d'immuno-précipitation de protéines ont démontré que la protéine *ING3* était l'un des membres constitutifs du complexe minimal histone acétyltransférase NuA4, comprenant aussi les protéines EAF6, EPC1 et TIP60 dans les cellules humaines (Doyon et al. 2006).

Les fonctions biologiques de ce complexe sont essentielles à la réparation de l'ADN ou à l'expression de gènes impliqués dans le contrôle des points de contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose (Xiaoli, Jiyong, et Yepeng 2017). D'un point de vue fonctionnel, une étude a rapporté que la diminution expérimentale de l'expression d'*ING3* au sein d'oocytes murins induit un échec de polarisation et une

division cellulaire symétrique anormale. Les auteurs ont relié ce constat à un défaut d'acétylation global de H4K12 (Suzuki et al. 2013), classiquement médiée par le complexe NuA4/TIP60.

#### 4.1.2 Fonction suppressive de tumeur « gatekeeper »

À l'image de ce qui a été rapporté pour ING2, la protéine ING3 est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'apoptose. En effet, des travaux précoces ont démontré que la protéine ING3 régule la transcription des gènes *p21* et *Bax* de manière dépendante de p53 (Makoto Nagashima et al. 2003). Il est important de souligner que ING3 peut réguler l'expression des gènes positivement, par l'intermédiaire du complexe NuA4/TIP60, ou à l'inverse, négativement, par l'interaction avec l'histone chaperone ANP32E (Obri et al. 2014). Une étude s'intéressant à des modèles cellulaires de carcinomes gastriques a démontré que la surexpression de ING3 induisait un arrêt du cycle cellulaire et favorisait l'apoptose par le blocage de la voie PI3K/AKT. Ce blocage est réversible par l'activation de cette voie *via* l'IGF-1 (Song Zhao et al. 2018). Dans un modèle de lignée cellulaire de mélanome, l'expression d'ING3 est augmentée en réponse aux UV et induit l'activation de la cascade de signalisation du récepteur de mort Fas de manière indépendante de p53 (Y. Wang et Li 2006). Enfin, une étude récente suggère que les fonctions suppressives de tumeurs de ING3 sont dépendantes de sa localisation intracellulaire dans la mesure où l'expression d'une protéine ING3 mutante K164A (domaine NLS) retenue dans le cytoplasme les abroge (Zhou et al. 2020).

#### 4.1.3 Fonction suppressive de tumeurs « caretaker »

##### 4.1.3.1 Contrôle de la progression du cycle cellulaire

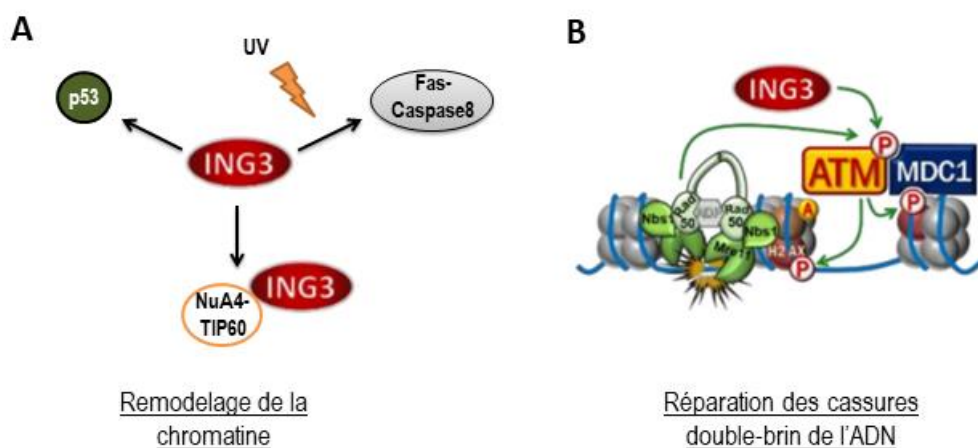
La protéine ING3 est capable d'inhiber le cycle cellulaire au cours de différentes phases. En effet, la surexpression de la protéine ING3 induit un défaut de prolifération cellulaire par deux mécanismes dans les modèles de lignées tumorales humaines. Premièrement, de manière dépendante de p53, le promoteur du gène *p21* est très actif en présence de la protéine ING3, bloquant ainsi la transition G<sub>1</sub>/S (Makoto Nagashima et al. 2003). Deuxièmement, des travaux récents ont montré qu'ING3 pouvait aussi inhiber la progression dans le cycle cellulaire par une diminution de l'expression du gène *CyclinD1*, secondairement à une inactivation du complexe PI3K/AKT, et donc indépendamment de p53 (Song Zhao et al. 2018).



#### 4.1.3.2 Implication dans la réponse aux dommages de l'ADN

Des travaux récents de notre équipe ont révélé pour la première fois l'existence d'un nouveau rôle « caretaker » de la protéine ING3 par l'intermédiaire de son implication dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Mouche et al. 2019).

En partant du constat que la perte d'expression de ING3 entraînait une sensibilité accrue aux agents génotoxiques à l'aide d'un modèle de levure et d'une lignée tumorale humaine, les auteurs ont exploré le rôle de ING3 en réponse aux dommages à l'ADN. Ces travaux ont démontré que la protéine ING3 était recrutée directement sur les sites de cassures double-brin et était essentielle au processus de recrutement des facteurs de réparation de l'ADN tels que RNF8, 53BP1 et BRCA1. En effet, ING3 assure le maintien et l'amplification de la phosphorylation d'ATM (un médiateur majeur de la réponse aux cassures double brin de l'ADN) et le recrutement de TIP60 par deux mécanismes indépendants. Enfin, l'étude de la recombinaison de classe des immunoglobulines (faisant intervenir une réparation de cassures double brin) a montré qu'un défaut de switch en IgA est observé dans les lymphocytes B sous-exprimant ING3. Ces résultats illustrent l'importance biologique de ce nouveau rôle suppresseur de tumeur pour la protéine ING3.



**Figure 16 : Fonctions suppressives de tumeurs ING3.** A. Fonctions de type II « gatekeeper » : La protéine ING3 est capable de réguler l'apoptose de manière dépendante de p53 en activant l'expression de ces gènes cibles tels que *p21* et *Bax*. En réponse aux UV, ING3 régule aussi l'apoptose de manière indépendante d'ING3 *via* la régulation transcriptionnelle du récepteur de mort Fas. Pour finir, ING3 au sein du complexe HAT NuA4/Tip60 a un rôle dans le remodelage de la chromatine. B. Fonctions de type I « caretaker » : ING3 participe à la réparation des cassures de l'ADN double brin en favorisant la phosphorylation d'ATM et l'accumulation de 53BP1 ou BRAC1 (protéines initiatrices de la réparation par NHEJ ou recombinaison homologue respectivement). (adaptée d'après Archaubeau, Blondel, et Pedoux 2019).

## 4.2 Fonctions oncogéniques

Malgré les publications princeps conférant un rôle suppresseur de tumeur à la protéine ING3, des données récentes suggèrent l'existence d'un potentiel rôle oncogénique.

Premièrement, une étude centrée sur le statut d'ING3 dans les tissus humains a observé que le niveau d'expression immunohistochimique de cette protéine était enrichi dans les tissus à renouvellement cellulaire rapide, tel que la moelle osseuse, les épidermes ou la muqueuse intestinale. (Nabbi et al. 2015), ce qui apparaît contradictoire avec son statut de gène suppresseur de tumeur. Deuxièmement, dans le contexte spécifique du cancer de la prostate, une autre étude a démontré que l'inhibition de l'expression de ING3 par ARN interférence entraînait une diminution de la migration et l'invasion cellulaire (Almami et al. 2016). Enfin, des travaux complémentaires de la même équipe, ont pu montrer l'existence d'une association entre l'expression d'ING3 et l'activité des récepteurs aux androgènes dans le contexte spécifique du cancer prostatique. Leurs travaux montrent, qu'indépendamment de son activité chromatinienne, la protéine ING3 favorise l'interaction cytoplasmique entre TIP60 et les récepteurs aux androgènes et par conséquent, leur acétylation et translocation nucléaire. De manière cohérente, leurs auteurs ont observé que l'expression d'ING3 était corrélée à une survie globale plus courte dans plusieurs bases de données indépendantes de carcinomes de la prostate (Nabbi et al. 2017).

Au total, la protéine ING3 semble présenter des fonctions oncogéniques tissu-spécifique. Des études plus précises sont cependant nécessaires pour décrire les mécanismes impliqués.

## 4.3 Niveau d'expression dans les tumeurs humaines

Le statut d'expression de la protéine ING3 est moins bien caractérisé que les autres membres de la famille ING.

Sur le plan génomique, les mutations du gène *ING3* sont très rarement rapportées dans les tumeurs humaines. Ce sont des pertes d'hétérozygotie par délétion de la région 7q31 contenant le gène *ING3* qui ont été le plus décrites, notamment dans des séries de carcinomes ORL et tumeurs odontogènes (Borkosky et al. 2010; Mehmet Gunduz et al. 2008).

À l'échelle transcriptomique, une perte de l'ARNm d'ING3 est fréquemment rapportée dans quelques tumeurs humaines. À titre d'exemple, cela a été observé dans plusieurs cohortes de carcinomes hépatocellulaires et de carcinomes ORL (H.-Y. Yang et al. 2012; Mehmet Gunduz et al. 2002) et parfois associé à un moins bon pronostic clinique.

Enfin, à l'échelle de la protéine ING3, on ne dispose à ce jour que de peu d'études basées sur une analyse immunohistochimique de tumeurs humaines. On peut citer les travaux récents d'une équipe chinoise, qui illustrent des données contradictoires sur ce sujet. En effet, l'analyse comparative de tissus normaux appariés à des tissus tumoraux de multiples organes a révélé que la protéine ING3 était moins fréquemment détectée dans les tissus néoplasiques que dans les tissus sains (perte d'expression estimée à 65,5% des cas). Cependant, des disparités en fonction du type histologique ont été soulignées avec une perte d'expression plus marquée dans les carcinomes rénaux à cellules claires, les hépatocarcinomes et les carcinomes œsophagiens, à l'inverse des carcinomes de l'endomètre, mammaires ou du col utérin (Gou et al. 2017).

Il est important de souligner aussi la variabilité des anticorps utilisés dans ces études, de même que la méthode d'analyse du signal immunohistochimique (principalement semi-quantitatif). Au-delà de cette réserve, l'ensemble des données de la littérature convergent vers l'observation d'une perte d'expression de la protéine ING3 dans les tumeurs humaines, même s'il semble exister des variations propres au type histologique considéré (Tableau 2).

Type de tumeur	Origine	Altération	Fréquence	Référence
<b>Ameoblastome</b>	Patients	Perte d'hétérozygotie	14/28	<i>Borkosky et al.</i>
<b>Cancer du sein</b>	Lignées	Diminution de l'ARNm	3/9	<i>Walzak et al.</i>
	Patients	Diminution de l'expression protéique	113/211	<i>Wu et al.</i>
		Augmentation de l'expression protéique	98/211	
<b>Cancer du colon</b>	Patients	Augmentation de l'ARNm	22/39	<i>Kumamoto et al</i>
	Lignées	Augmentation de l'ARNm	3/8	
<b>Cancer ORL</b>	Patients	Perte d'hétérozygotie	30/55	<i>Borkosky et al.</i>
<b>Hépatocarcinome</b>	Patients	Diminution de l'ARNm	16/29	<i>Zhang et al.</i>
		Diminution de l'expression protéique	40/84	
	Patients	Perte d'hétérozygotie	41,2%	
<b>Cancer bronchique</b>	Lignées	Diminution de l'ARNm	7/8	<i>Stark et al.</i>
	Lignées	Diminution de l'ARNm	2/2	<i>Walzak et al.</i>
	Patients	Diminution de l'ARNm	15/22	<i>Ythier et al.</i>
		Diminution de l'expression protéique	70/120	
<b>Mélanome</b>	Patients	Diminution de l'expression protéique	-	<i>Lu et al.</i>
<b>Cancer de l'ovaire</b>	Lignées	Diminution de l'ARNm	-	<i>Walzak et al.</i>
<b>Cancer du pancréas</b>	Lignées	Diminution de l'ARNm	-	<i>Walzak et al.</i>
<b>Cancer de la prostate</b>	Lignées	Diminution de l'ARNm	-	<i>Walzak et al.</i>
	Patients	Diminution de l'expression protéique	n=312	<i>Almami et al.</i>
<b>Cancers solides</b>	Patients	Diminution de l'expression protéique	65,5%	<i>Gou et al.</i>

Tableau 2 : Statut de ING3 dans les tumeurs et lignées humaines (adapté de Guérillon, Bigot, et Pedoux 2013).

## **5 RELATION DES GÈNES SUPPRESSEURS DE TUMEUR AVEC LE COMPARTIMENT MITOCHONDRIAL**

Du fait de leur capacité de prolifération et de survie prolongée, les cellules cancéreuses sont caractérisées par des besoins énergétiques considérables. La compréhension des mécanismes d'adaptation métabolique des cellules cancéreuses nécessaire à la prolifération cellulaire intense a débuté depuis près d'un siècle (Otto Warburg 1924). Plusieurs voies métaboliques centrées sur la mitochondrie permettent à la cellule tumorale d'utiliser les nutriments de son microenvironnement pour générer les précurseurs métaboliques nécessaires à la production énergétique, la synthèse de la biomasse et le maintien de la balance d'oxydo-réduction intracellulaire. Ce chapitre va décrire le lien existant entre le métabolisme cellulaire et les gènes suppresseurs de tumeur dans le contexte biologique de la cellule tumorale humaine.

### **5.1 Généralités sur la mitochondrie**

#### **5.1.1 Origine et structure**

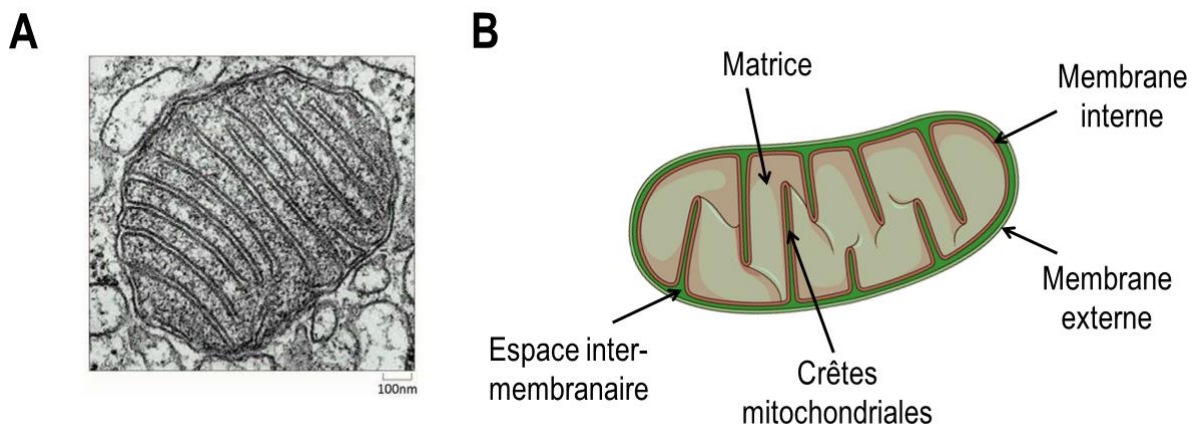
##### **5.1.1.1 Théorie endosymbiotique**

Initialement formulée au XIX<sup>ème</sup> siècle, la théorie endosymbiotique de l'origine de la mitochondrie est celle qui prévaut aujourd'hui. Selon celle-ci, les mitochondries seraient un vestige de l'assimilation d'une  $\alpha$ -protéobactérie au sein d'une archaebactérie suite à l'apparition d'un environnement riche en oxygène au cours de l'évolution, deux milliards d'années avant notre ère (Lang, Gray, et Burger 1999). Ainsi, l'oxygène toxique pour l'archaebactérie anaérobie aurait été neutralisé par l' $\alpha$ -protéobactérie aérobie, qui en échange aurait reçu les apports nutritionnels nécessaires à sa survie. Les données plus récentes de phylogénie moléculaire et génomique confortent cette théorie, suggérant que l'ADN mitochondrial dériverait d'une  $\alpha$ -protéobactérie, ancêtre de *Rickettsia prowazekii* (D. Yang et al. 1985; Andersson et al. 1998).

##### **5.1.1.2 Structure mitochondriale**

La première observation de la mitochondrie remonte au XVIII<sup>ème</sup> siècle, mais la description précise de la structure de cet organite a été possible grâce aux travaux de microscopie électronique menés dans les années 1950. Les différentes composantes de la mitochondrie ont alors été décrites : membrane externe ; espace inter-membranaire ; membrane interne ; et matrice mitochondriale (Palade 1953). La

membrane lipidique externe et la membrane lipidique interne délimitent les deux compartiments mitochondriaux : la matrice et l'espace inter-membranaire (Figure 17).



**Figure 17 : Structure de la mitochondrie.** A. Image de microscopie électronique montrant une mitochondrie humaine et son ultrastructure (adaptée de Chaffey et al. 2003). B. Représentation schématique d'une mitochondrie en coupe.

La membrane mitochondriale externe, de composition lipidique proche de la membrane plasmique, est perméable aux ions et protéines de petits poids moléculaires (jusqu'à 5kDa) du fait de la présence de canaux ioniques voltage-dépendants appelés porines. En conséquence, les compositions ioniques du cytosol et de l'espace inter-membranaire sont proches (A. C. Lee et al. 1998).

En revanche, la membrane interne est beaucoup moins perméable du fait de l'absence de porines. De plus, sa composition particulière, riche en cardiolipines, permettrait la stabilisation des nombreux complexes protéiques qui la composent (Mejia et Hatch 2016). Des systèmes protéiques spécifiques, tels que les complexes de la chaîne respiratoire, sont donc nécessaires au transport des molécules vers la matrice mitochondriale, générant ainsi un gradient électrochimique.

Enfin, la matrice mitochondriale est le siège de nombreuses réactions enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire, comprenant notamment le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative.

### 5.1.1.3 Dynamique mitochondriale

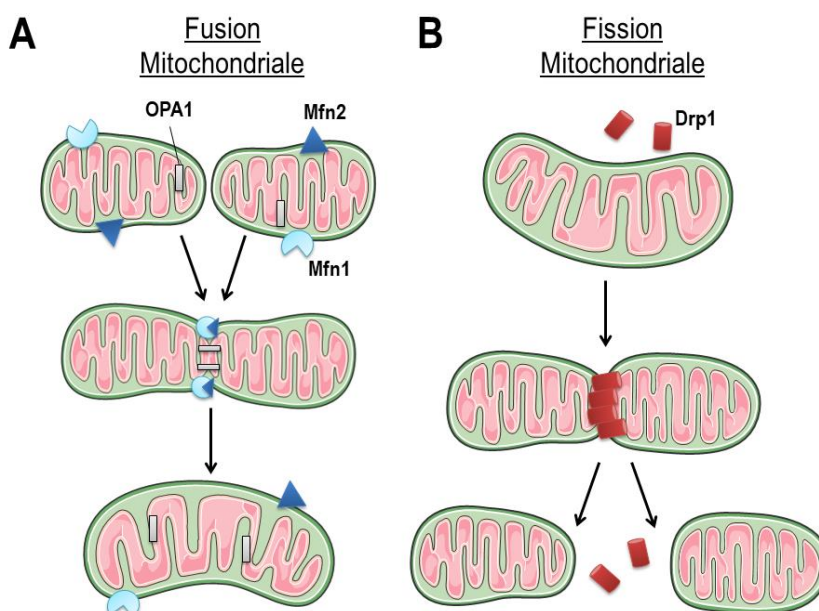
Les mitochondries sont organisées sous la forme d'un réseau au sein du cytoplasme. Un remodelage constant de l'architecture de ce réseau est régi par les phénomènes de fusion et de fission mitochondriale, de mitophagie et de biogenèse mitochondriale. Il se présente sous deux formes possibles : filamenteux avec de longs tubules interconnectés, ou granuleux avec de petites sphères fragmentées (Giacomello et al. 2020). Témoin du dynamisme de ces phénomènes, les mitochondries voient leur aspect largement modifié au cours d'un même cycle cellulaire, allant d'un réseau interconnecté en phase G<sub>1</sub> à un réseau fragmenté en phase S (Horbay et Bilyy 2016).

### Fusion mitochondriale

La fusion mitochondriale consiste en l'intégration de deux organites en un seul. Un premier contact entre les membranes externes se fait par l'intermédiaire de protéines de la famille des dynamines appelées mitofusines (Mfn1 ou Mfn2), très conservées au cours de l'évolution. Il s'en suit une fusion de la membrane externe mitochondriale permettant ensuite le contact entre les deux membranes internes, médiée par une autre protéine de la famille des dynamine OPA1 (Figure 18) (Koshiba et al. 2004). Des travaux ont montré que 8 isoformes de la protéine OPA1 étaient importées dans la mitochondrie et que leur implication fonctionnelle dans le processus de fission pouvait être différent, même s'il reste mal compris (Olichon et al. 2007).

### Fission mitochondriale

La fission mitochondriale consiste en la division de l'organite en deux autres parfaitement distincts. Des travaux de criblages génétiques ont permis d'identifier les acteurs de ce mécanisme chez la levure, puis secondairement les gènes homologues chez les mammifères. La protéine Drp1 est le médiateur principal du mécanisme de fission, par la formation d'une structure hélicoïdale en anneau autour du tubule mitochondrial (Smirnova et al. 2001). Le recrutement de Drp1 sur les sites de fission nécessite la protéine FIS1 enchâssée dans la membrane externe mitochondriale (Figure 18) (Losón et al. 2013).



**Figure 18 : Processus de fusion et fission mitochondriale.** A. Les protéines de la famille des mitofusines Mfn1 et Mfn2 permettent la première étape d'amarrage entre les membranes mitochondriales. La deuxième étape de fusion fait intervenir des mécanismes différents selon la membrane interne ou externe. C'est la protéine OPA1 qui permet le contact entre les membranes internes mitochondriales chez l'homme. B. Les protéines cytosoliques Drp1 vont être recrutées sur les sites de fission et former ainsi une structure hélicoïdale en anneau par oligomérisation. Ce complexe protéique va permettre la scission du tubule mitochondrial et la formation de deux mitochondries distinctes (d'après Westermann 2010).



### Mitophagie

La mitophagie est un processus de recyclage de la mitochondrie par le biais du mécanisme d'autophagie. De manière spécifique à cet organite, la protéine kinase PINK-1 va être exprimée sur la membrane externe des mitochondries caractérisée par un potentiel de membrane faible. Cela va permettre le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase Parkin, à l'origine de la formation du protéasome, puis de la cascade de signalisation aboutissant à l'autophagocytose mitochondriale (Eiyama et Okamoto 2015).

### Biogénèse mitochondriale

La néo-synthèse des mitochondries, appelée biogénèse mitochondriale est un processus essentiel au remplacement des mitochondries altérées et à l'adaptation de la biomasse mitochondriale. L'acteur central de ce processus est la protéine PGC-1 $\alpha$ , permettant la transcription de plusieurs facteurs de transcription tels que NRF-1, NRF-2 ou ERR $\alpha$  (Scarpulla 2011). PGC-1 $\alpha$  est activée selon l'état de stress cellulaire ou les besoins énergétiques.

#### 5.1.1.4 Génomique mitochondriale chez l'homme

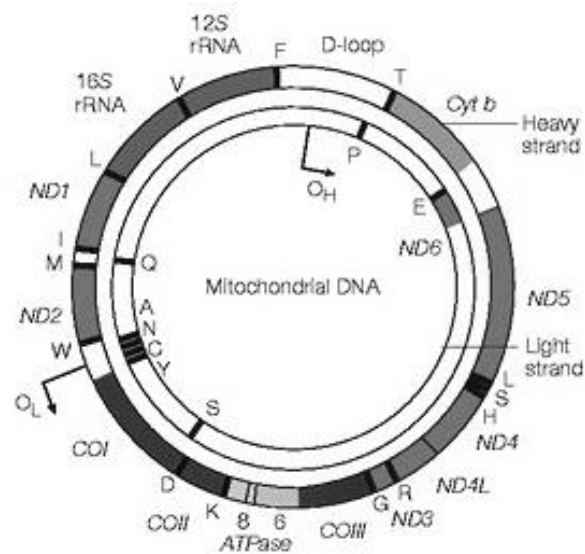
### Structure et organisation de l'ADN mitochondrial humain

Séquencé pour la première fois en 1981, l'ADN mitochondrial chez l'homme est un ADN circulaire double brin de 16569 paires de bases (Cann, Stoneking, et Wilson 1987; Anderson et al. 1981). Celui-ci est de petite taille en comparaison au génome mitochondrial d'autres organismes telle que la levure *Saccharomyces cerevisiae* (85,8 Kb). L'hypothèse communément avancée est celle du transfert d'un gène mitochondrial vers le génome nucléaire au cours de l'évolution des mammifères, épargnant les gènes codant les protéines mitochondriales, très hydrophobes, qui ne peuvent passer facilement les membranes mitochondriales (Pakendorf et Stoneking 2005; Lang, Gray, et Burger 1999).

L'ADN mitochondrial humain est occupé de façon dense par des portions codantes. En effet, il comprend 37 gènes mitochondriaux dont 13 gènes codent des sous-unités des complexes de la phosphorylation oxydative, 22 gènes d'ARN de transfert et 2 gènes d'ARN ribosomiaux. Ces gènes ne possèdent pas d'introns ou de séquences intergéniques. Ils se répartissent sur les deux brins d'ADN dont leur composition nucléotidique permet de différencier un brin dit « lourd » (heavy strand ou brin H, riche en guanine) et un brin « léger » (light strand ou brin L, pauvre en guanine). De plus, une séquence courte d'ADN supplémentaire sur le brin H forme une structure en triple brin sur une zone précise de l'ADN mitochondrial dénommée D-Loop (Displacement-Loop) (Figure 19). Cette région régulatrice

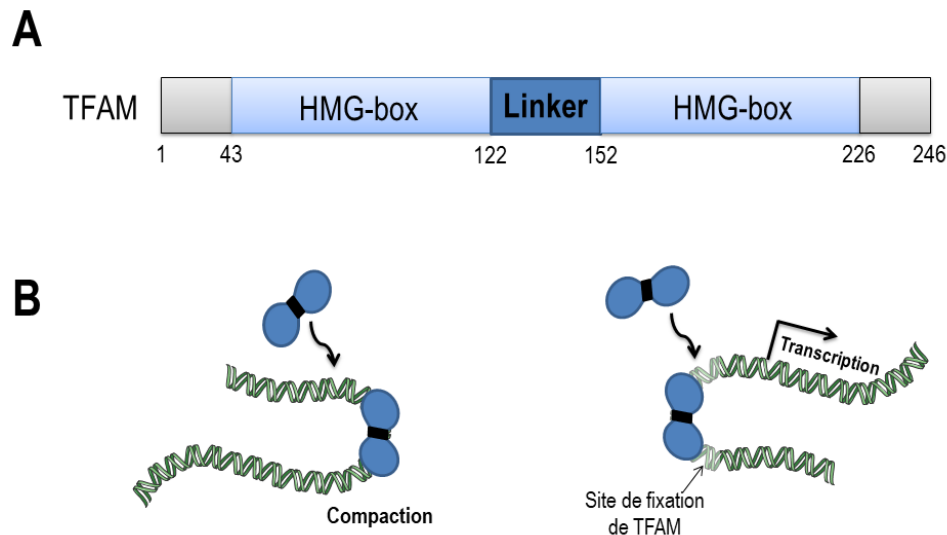


contient les promoteurs de la transcription, les sites d'initiation de la transcription des deux brins, et l'origine de réplication du brin H (Falkenberg, Larsson, et Gustafsson 2007).



**Figure 19 : Organisation du génome mitochondrial humain.** Les deux brins de l'ADN mitochondrial sont représentés par des cercles nommés « heavy strand » (brin lourd) ou « light strand » (brin léger). Les gènes des ARNt codés par chacun des deux brins sont indiqués par la lettre de l'acide aminé correspondant. Chaque gène de l'ADN mitochondrial est dénommé en italique (d'après Taylor et Turnbull 2005).

Une cellule humaine contient environ 1000 copies du génome mitochondrial qui se répartissent dans l'ensemble du réseau mitochondrial sous la forme de structures nucléo-protidiques compactées appelées nucléoïdes. Ces complexes de taille allant de 100 à 300 nm contiennent 1 à 10 copies d'ADN mitochondrial. Le médiateur principal de la compaction de l'ADN mitochondrial humain est la protéine TFAM (*Mitochondrial Transcription Factor A*) qui possède deux domaines HMG-box séparés par un linker, formant ainsi un sillon pour l'interaction avec l'ADN mitochondrial. TFAM peut interagir de manière spécifique ou non-spécifique avec l'ADN mitochondrial (Figure 20). Même si les mécanismes précis restent encore mal élucidés, cette conformation tridimensionnelle serait favorable à la formation des supercoils d'ADN mitochondrial observés dans les nucléoïdes (Farge et Falkenberg 2019). La protéine TFAM est aussi impliquée dans la transcription de l'ADN mitochondrial, ce qui a amené certains auteurs à qualifier cette protéine d'« histone-like » pour l'ADN mitochondrial (Kanki et al. 2004).

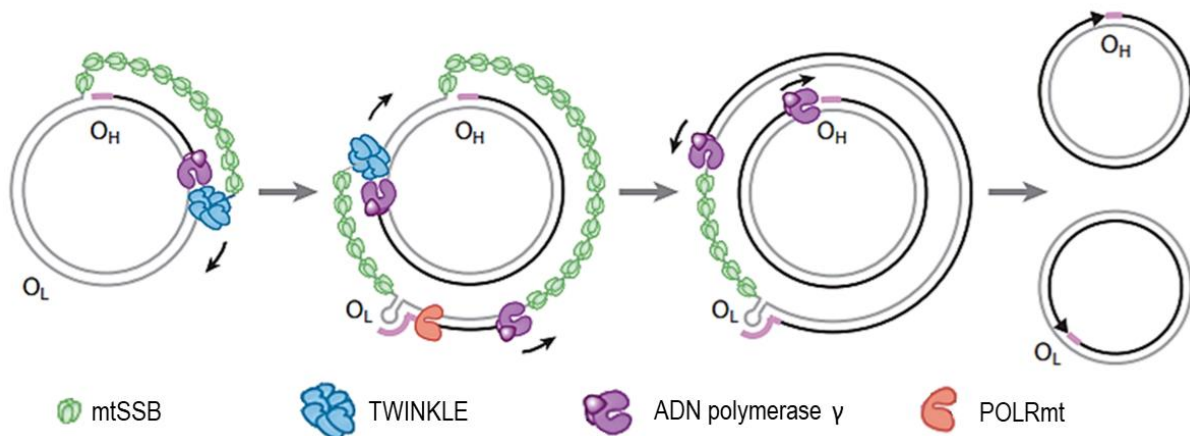


**Figure 20 : Structure de TFAM et interaction avec l'ADN mitochondrial.** A. Représentation schématique de la protéine TFAM. Les deux domaines HMG-box séparés par un linker, forme un sillon pour l'interaction avec l'ADN mitochondrial. B. TFAM peut se lier à l'ADN mitochondrial de manière non-spécifique et induire sa compaction. Il peut aussi reconnaître des séquences spécifiques et activer la transcription de l'ADN mitochondrial (d'après Farge et Falkenberg 2019)

### Réplication de l'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial présente deux sites d'origine de réplication qui sont situés sur deux régions non complémentaires de chacun des deux brins d'ADN ( $O_H$  et  $O_L$ ). Cela entraîne une réplication asymétrique et asynchrone de chacun des deux brins d'ADN mitochondrial (Figure 21).

La première étape est la séparation des deux brins par l'hélicase TWINKLE au niveau de l'origine de réplication du brin H ( $O_H$ ). Une réplication unidirectionnelle du brin H débute *via* la polymérase POL- $\gamma$  (POLymerase- $\gamma$ ), seule ADN polymérase présente dans le compartiment mitochondrial (Kaguni 2004). Parallèlement une protection du brin H parental est assurée par son recouvrement grâce à la protéine mtSSB (mitochondrial Single-Stranded DNA-Bindind protein). Lorsque la machinerie répliquative atteint l'origine de réplication du brin L ( $O_L$ ), l'ADN du brin L prend alors une structure tridimensionnelle en tige-boucle qui permet le recrutement de la POLRmt (mitochondrial DNA-directed RNA POLymerase), puis de POL- $\gamma$ . Celle-ci initie alors la réplication unidirectionnelle du deuxième brin d'ADN mitochondrial (Gustafsson, Falkenberg, et Larsson 2016).

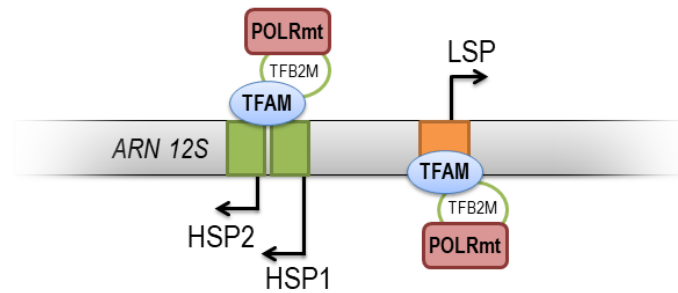


**Figure 21 : Processus de réplication de l'ADN mitochondrial.** La réplication de l'ADN mitochondrial débute par la séparation des deux brins par l'hélicase TWINKLE au niveau de l'origine de réplication O<sub>H</sub>. Au cours de la réplication unidirectionnelle du brin H par l'ADN polymérase γ, le brin L est protégé par recouvrement de l'ADN par les protéines mtSSB. La réplication du brin L débute par le recrutement de POLRmt, une fois que la machinerie répliquative atteint l'origine de réplication O<sub>L</sub> (d'après Gustafsson, Falkenberg, et Larsson 2016).

### Transcription de l'ADN mitochondrial

Le site de régulation de la transcription de l'ADN mitochondrial est le D-Loop. Celui-ci contient trois sites d'initiation de la transcription : un site sur le brin L (LSP) et deux sur le brin H (HSP1 et HSP2) (Figure 22). Les transcrits générés à partir des sites LSP et HSP2 sont polycistroniques et couvrent la totalité de l'ADN mitochondrial. En revanche, le site d'initiation de la transcription HSP1, très actif, génère des transcrits plus courts comprenant notamment les ARN ribosomiaux 12S and 16S, ce qui expliquerait leur abondance dans la cellule (Falkenberg, Larsson, et Gustafsson 2007).

L'initiation de la transcription est orchestrée par l'ARN polymérase POLRmt dont la structure est très proche de celle des ARN polymérases des bactériophages T3 et T7. Le bon fonctionnement de la machinerie transcriptionnelle mitochondriale nécessite le recrutement des protéines TFAM et TFB2M (Mitochondrial Transcription Factor B2) qui permettent l'accès au promoteur (Ramachandran et al. 2017). L'élongation de la transcription fait ensuite intervenir le facteur TEFM (Mitochondrial Transcription Elongation Factor) qui promeut l'activité de POLRmt et empêche la terminaison précoce du processus transcriptionnel. Enfin, la terminaison de la transcription est régulée par le facteur MTERF1 selon des mécanismes qui sont encore à ce jour non formellement élucidés (D'Souza et Minczuk 2018).



**Figure 22 : Processus de transcription de l'ADN mitochondrial.** Représentation schématique du processus d'initiation de la transcription mitochondriale au niveau des sites d'initiation de la transcription HSP1, HSP2 (brin H) et LSP (brin L) (d'après Falkenberg, Larsson, et Gustafsson 2007).

### Maintenance de l'ADN mitochondrial

À l'instar du génome nucléaire, l'ADN mitochondrial est régulièrement soumis à des stress pouvant l'endommager au cours d'une vie cellulaire. Ces stress sont principalement endogènes de par la proximité de l'ADN mitochondrial avec la chaîne de transport des électrons, qui produit les ROS (espèces réactives de l'oxygène) au cours de la respiration cellulaire. Les multiples copies du génome mitochondrial présentes dans une seule cellule ont longtemps amené la communauté scientifique à présumer que l'ADN mitochondrial endommagé n'était pas réparé mais simplement éliminé. Même si les mécanismes de reconnaissance des dommages de l'ADN par la machinerie protéique mitochondriale restent mal décrits, plusieurs équipes indépendantes ont désormais démontré l'existence de systèmes complexes de réparation de l'ADN commun au compartiment mitochondrial et nucléaire (Stein et Sia 2017). La réparation par excision de base (BER, Base Excision Repair) est le premier mécanisme de réparation à avoir été décrit dans la mitochondrie. Récemment, la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue, jonction des extrémités non-homologue (NHEJ, Non-Homologous End-Joining), de même que la réparation des mésappariements (MMR, MisMatch Repair) ont été mis en évidence dans le compartiment mitochondrial. En revanche, la réparation par excision de nucléotide (NER) apparaît absente de la mitochondrie.

#### *a La BER*

La réparation par excision de base est le premier mécanisme de réparation de l'ADN mitochondrial à avoir été décrit et est aussi le mieux connu (Domena et Mosbaugh 1985). Cette voie de réparation est impliquée dans le principal type de dommage endogène subit par l'ADN mitochondrial qui correspond aux adduits de 7,8 dihydro-8-oxoguanine secondaires à l'exposition aux ROS. En effet, à forte concentration, les ROS entraînent une oxydation des dGTPs libres. Ceux-ci vont être incorporés dans la séquence nucléotidique à la place du dTTP et créer une mutation par transversion (Pursell et al. 2008).

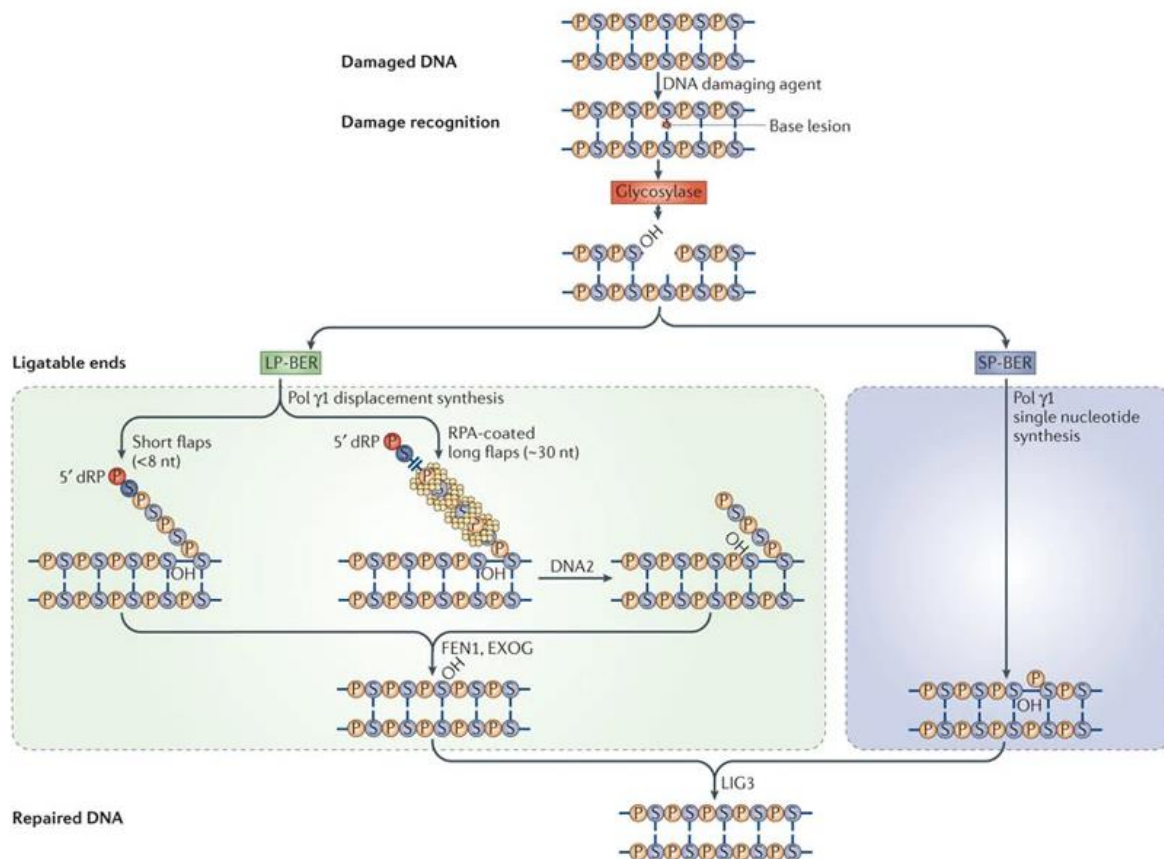
Comme dans le noyau, deux sous-catégories de réparation sont possibles dans la mitochondrie : la voie BER rapide et la voie BER lente (Figure 23).

Plusieurs glycosylases sont actives dans la mitochondrie et peuvent être réparties en deux groupes : les glycosylases bifonctionnelles avec activité lyase (OGG1, NTHL1, NEIL1 et NEIL2) et les glycosylases monofonctionnelles (UDG1, AAG et MUTYH). Les premières sont capables de cliver directement le site abasique et sont dédiées à la réparation des dommages oxydatifs, alors que les secondes nécessitent l'intervention de l'endonucléase APE1 et sont plus spécifiques à la réparation des bases alkylées ou désaminées (Prakash et Doublé 2015).

Dans le cas de la BER rapide, le nucléotide manquant complémentaire au brin opposé est ajouté par la polymérase Pol- $\gamma$ , puis la Ligase 3 relie ce nucléotide au reste de l'ADN mitochondrial.

La voie de réparation BER lente est privilégiée lorsque le site endommagé est réfractaire à l'action de Pol- $\gamma$  (par exemple dans le cas des adduits de 2-desoxyribonolactones sur l'extrémité 5' en cas de stress oxydatif). La polymérase va alors créer une séquence nucléotidique dite « flap » contenant 2 à 12 nucléotides pour remplacer le nucléotide manquant. Les endonucléases spécifiques FEN1, EXOG et DNA2 vont ensuite éliminer les nucléotides non complémentaires avant que la Ligase 3 intervienne (Kazak, Reyes, et Holt 2012).

La voie mitochondriale de réparation BER est très efficace. En effet, une étude a démontré que la réparation des adduits de 7,8 dihydro-8-oxoguanine est plus performante dans la mitochondrie que dans le noyau (Thorslund et al. 2002).



**Figure 23 : Processus de réparation par excision de bases dans la mitochondrie.** En réponse à un dommage oxydatif sur l'ADN mitochondrial, deux mécanismes de réparation par excision de bases peuvent être engagés selon l'affinité du site de cassure avec l'ADN polymérase  $\gamma$ : la BER-lente (SP-BER) et la BER-rapide (LP-BER) (adapté de Kazak, Reyes, et Holt 2012)

### b La MMR

La réparation par mésappariements de bases est la deuxième voie de réparation des dommages simple brin à entrer en jeu dans le compartiment mitochondrial. Celle-ci a été mise en évidence pour la première fois en 2003 à partir d'extraits mitochondriaux de rat (Mason et al. 2003). La protéine mitochondriale YB-1 (*Y box binding protein*) est l'acteur principal de la reconnaissance des mésappariements sur l'ADN mitochondrial. En dehors de MSH5, les médiateurs de la MMR du compartiment nucléaire n'ont pas été détectés dans la mitochondrie ce qui suggère l'existence de voies de signalisation MMR spécifiques dans cet organe (Zinovkina 2018).

### c La réparation des cassures double brin

Bien que plusieurs acteurs de la réparation des cassures double brin nucléaires soient impliqués dans la maintenance de l'ADN mitochondrial, les mécanismes précis de réparation sous-jacents restent encore mal compris. À titre d'exemple, un isoforme de la protéine Ku80, tronquée sur sa partie

N-terminale et transloquée dans la mitochondrie, jouerait un rôle dans la réparation des dommages oxydatifs subis par l'ADN mitochondrial (Coffey et Campbell 2000). D'autres protéines très étudiées dans le contexte de la réparation de l'ADN nucléaire telles que XRCC4, MRE11 ou RAD51, ont aussi été identifiées comme critiques pour la maintenance de l'ADN mitochondrial (Sage, Gildemeister, et Knight 2010; Wisnovsky, Jean, et Kelley 2016; Dmitrieva, Malide, et Burg 2011). L'activité de recombinaison homologue a été bien décrite dans les mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae* (Stein, Kalifa, et Sia 2015). Concernant les mitochondries humaines, il a été démontré qu'elles sont capables de catalyser la recombinaison homologue de plasmides *in vitro* (Thyagarajan, Padua, et Campbell 1996). Concernant la NHEJ, les données issues des modèles de mammifères sont contradictoires, certaines suggérant l'existence des mécanismes de réparation par NHEJ classique (Bacman et al. 2014), alors que d'autres travaux soutiennent l'existence d'une réparation médiée uniquement par NHEJ alternative (Tadi et al. 2016). Il est important de souligner que la plupart des travaux menés dans le domaine de la réparation des cassures double brin de l'ADN mitochondrial ont été menés dans des modèles de levures et leur extrapolation systématique à l'homme reste encore incertaine.

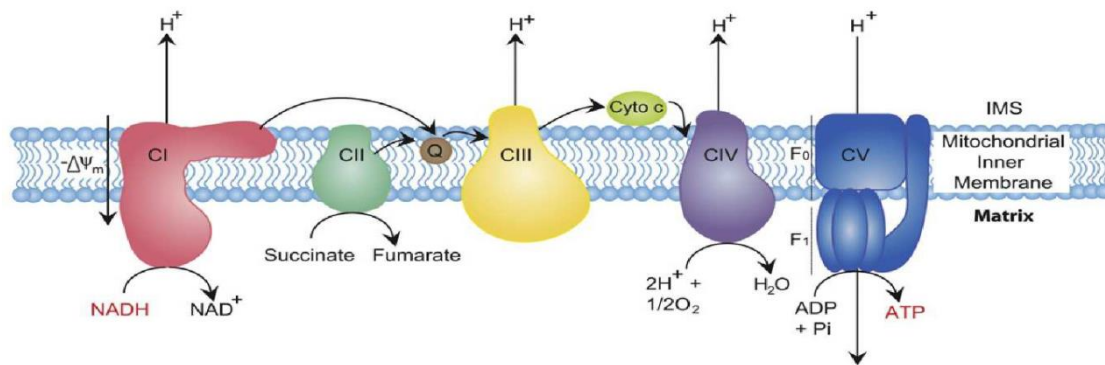
## 5.1.2 Rôle biologique de la mitochondrie

### 5.1.2.1 Les oxydations phosphorylantes

La mitochondrie est le siège de réactions d'oxydoréduction au niveau des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale qui, couplée à l'activité de l'ATP synthase, sont regroupées sous l'appellation phosphorylation oxydative. Les substrats de ce processus biochimique sont les coenzymes réduites NADH ou FADH<sub>2</sub>, et le résultat final une synthèse d'ATP.

#### Chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de quatre complexes multienzymatiques et de l'ATP synthase. Ceux-ci sont tous enchâssés dans la membrane interne mitochondriale au niveau des crêtes mitochondriales.



**Figure 24 : Chaîne respiratoire mitochondriale.** Les complexes de la chaîne respiratoire sont enchâssés dans la membrane interne mitochondriale, tandis que les transporteurs d'électrons coenzyme Q et cytochrome c sont mobiles. Les électrons et les protons donnés par les coenzymes NADH et FADH<sub>2</sub> sont transportés d'un complexe à un autre *via* les transporteurs mobiles d'électrons. L'énergie libérée par les réactions d'oxydoréductions successives permet le pompage de protons par les complexes I, III et IV et la création d'un potentiel de membrane ( $\Psi_m$ ) entre l'espace intermembranaire et la matrice. Il est indispensable à la synthèse d'ATP au niveau du complexe V, qui est l'ATP synthase (adaptée d'après Osellame, Blacker, et Duchon 2012)

#### a *Le complexe I ou NADH déshydrogénase*

Le complexe I est le point d'entrée du NADH, provenant de la glycolyse, de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, du cycle de Krebs ou encore de la décarboxylation oxydative du pyruvate. Il s'agit du plus gros complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale dont la conformation change au cours du processus de réduction. Le NADH cède 2 électrons au complexe I qui est transféré à l'ubiquinone grâce à ses groupes rédox (flavine mononucléotide) et ses protéines à centre fer-soufre. En parallèle, le complexe I catalyse la réduction du coenzyme Q. Ces réactions permettent le transfert total de 4 protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire.

#### b *Le complexe II ou succinate déshydrogénase*

Le complexe II possède une masse de 124 kDa et est situé au niveau de membrane interne du côté de la matrice mitochondriale. Il est le point d'entrée du FADH<sub>2</sub>, issue du cycle de Krebs, dont il capture deux électrons et les transmet vers l'ubiquinone. Le complexe II ne peut pas libérer de protons vers l'espace intermembranaire car l'énergie générée par les réactions d'oxydoréduction n'est pas suffisante.

#### c *Les complexe III ou succinate déshydrogénase*

Le complexe III (240kDa) prend ensuite en charge l'ubiquinol, forme hydrophobe de l'ubiquinone réduite par le complexe I et II. Par une protéine à centre fer-soufre, deux cytochrome b et le cytochrome c1, le complexe III transfère deux électrons au cytochrome c. L'énergie de cette réaction permet la translocation de quatre protons dans l'espace intermembranaire.



#### *d Le complexe IV ou cytochrome c oxydase*

Le complexe IV permet l'oxydation du cytochrome réduit, associée à la réduction de l'oxygène moléculaire dans la matrice mitochondriale. Ce processus est possible du fait de la présence d'un cytochrome a, d'un cytochrome a3 et de deux ions cuivre. Il génère une molécule d'H<sub>2</sub>O et permet la translocation de quatre protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

#### *e ATP synthase*

L'ATP synthase, ou complexe V, est un complexe protéique de 600 kDa composé de 16 sous-unités. Il s'agit de l'enzyme finale de la phosphorylation oxydative qui va catalyser la synthèse d'ATP à partir d'ADP. Ce complexe protéique fonctionnerait en dimère et serait localisé à l'extrémité distale des crêtes mitochondriales (Hahn et al. 2016). Par gradient de concentration, les protons accumulés dans l'espace intermembranaire vont traverser l'ATP synthase au niveau des sous-complexes F<sub>0</sub> et générer l'énergie permettant les modifications conformationnelles de plusieurs sous-unités du sous-complexe catalytique F. Celles-ci permettent alors l'exposition des sous-unités catalytiques de l'ATP synthase à l'ADP et au phosphate inorganique dans la matrice mitochondriale, pour former de l'ATP (Papa et al. 2012).

### **Mécanismes de régulation**

Afin d'adapter efficacement la cellule à ses besoins énergétiques, la phosphorylation oxydative est finement régulée. Au-delà de la dynamique mitochondriale impliquant biogénèse, fusion et fission, qui sont des éléments centraux de la régulation énergétique cellulaire, plusieurs mécanismes intrinsèques à la chaîne respiratoire mitochondriale sont impliqués. Premièrement, on peut citer le rétrocontrôle du ratio ATP/ADP mitochondrial. En effet, lorsque ce rapport est trop élevé (production importante d'énergie), l'ATP inhibe de manière allostérique le complexe IV. Deuxièmement, une régulation de l'efficacité de couplage (proportion de phosphates par molécule d'oxygène consommée intégrée dans l'ATP) peut aussi survenir par la modification de l'efficacité de la pompe à protons ou du gradient électrochimique (notamment *via* les protéines découplantes UCP) (Kadenbach 2003).

#### 5.1.2.2 Autres rôles

### **Homéostasie calcique**

La mitochondrie a un rôle clé dans la régulation de l'ion Ca<sup>2+</sup> dans la cellule. En dehors d'un rôle tampon permettant la régulation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique (stockage ou libération), le calcium mitochondrial participe à l'efficacité de la production énergétique. Ainsi, l'import du NADH, substrat du cycle de

Krebs, vers la mitochondrie dépend de transporteurs liant le  $\text{Ca}^{2+}$ . L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie (par les porines VDAC pour la membrane externe puis par les canaux MCU pour la membrane interne) stimule l'activité de l'ATP synthase (Nicholls 2005). Enfin, l'implication de la mitochondrie dans la signalisation calcique cytosolique se fait en étroite collaboration avec le réticulum endoplasmique.

### Balance d'oxydo-réduction

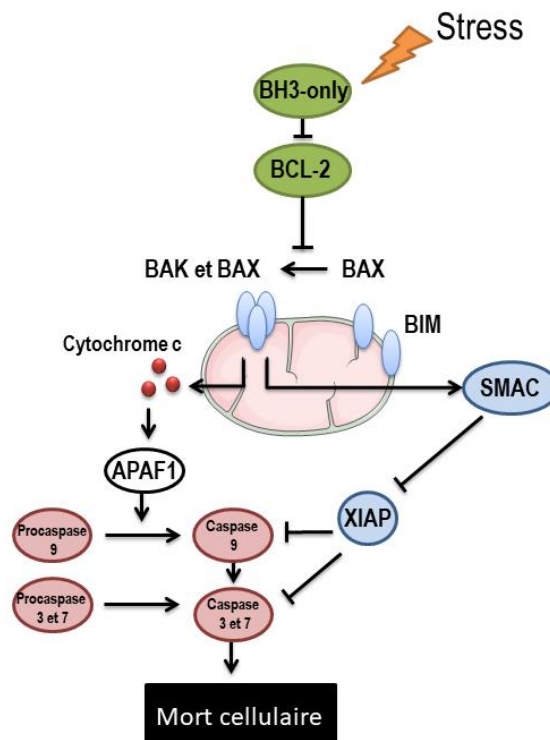
Le compartiment mitochondrial est la source principale de production de ROS dans une cellule eucaryote. Cette production est issue de la phosphorylation oxydative par la fuite d'électrons qui réagissent avec les molécules d' $\text{O}_2$ . Celles-ci subissent une réduction incomplète par un électron devenant ainsi un radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , instable et très réactif (Glasauer et Chandel 2013). Ces ROS ont une action néfaste sur la cellule dans la mesure où ils peuvent endommager les composants moléculaires de la cellule induisant un stress oxydatif. Les enzymes superoxyde dismutases (SOD2 dans la matrice mitochondriale) régulent la quantité de ROS par transformation de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , principal messenger de la balance d'oxydo-réduction. En effet, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  induit des changements allostériques par oxydation des groupements thiols des cystéines, entraînant ainsi des modifications des voies de signalisation intracellulaires. On peut citer par exemple l'activation de HIF-1 $\alpha$ , p53 ou JNK-1, ou à l'inverse, l'inhibition de PTEN en cas d'augmentation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sena et Chandel 2012; Schieber et Chandel 2014). De ce fait, il a été largement démontré que la balance d'oxydo-réduction mitochondriale est impliquée dans certains mécanismes biologiques centraux (notamment le renouvellement des cellules souches) et dans le développement de nombreuses pathologies (par exemple, les maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives).

### Apoptose intrinsèque

L'apoptose est un mécanisme physiologique qui permet l'homéostasie tissulaire et peut être déclenché en réponse à divers stimuli cellulaires. L'apoptose peut survenir selon deux mécanismes distincts : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La mitochondrie joue un rôle central dans l'apoptose intrinsèque (Hotchkiss et al. 2009).

La voie intrinsèque est déclenchée suite à un stress cellulaire (dommages à l'ADN, stress oxydatifs, stress réplicatifs...). Ces signaux de stress convergent vers la mitochondrie et entraînent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP), véritable « point de non-retour » pour le mécanisme de mort cellulaire programmée, puis la libération de cytochrome c. Le cytochrome c peut alors se lier à la protéine Apaf-1 pour former le complexe nommé apoptosome. Celui-ci recrute les

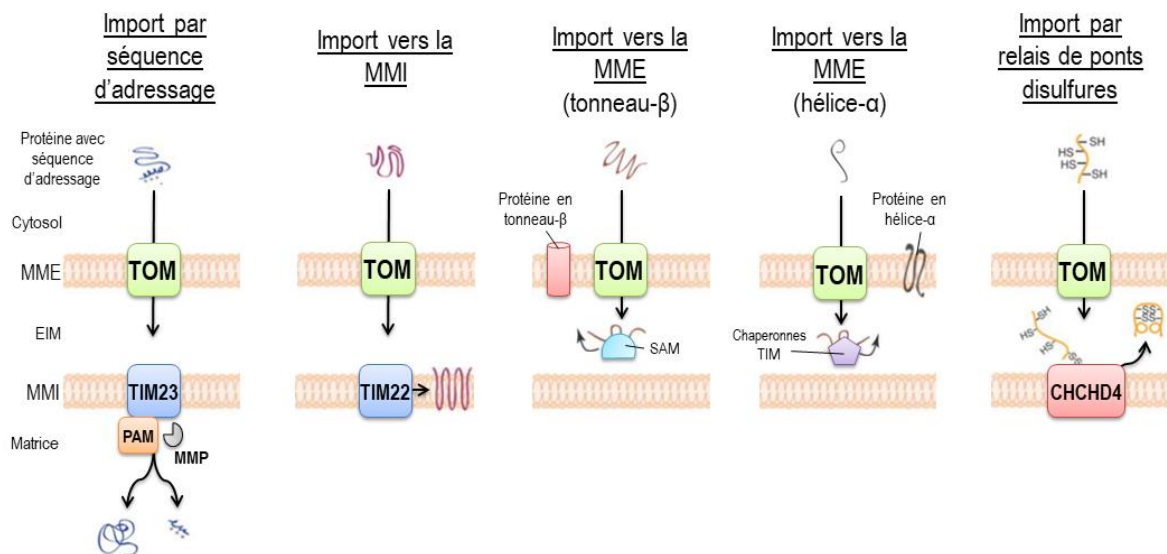
caspases effectrices en cascade, ce qui aboutit à la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques. Découverte dans les années 1980, les protéines de la famille Bcl-2 (B Cell Lymphoma-2) contrôlent la perméabilité de la membrane mitochondriale externe. Cette famille se compose de membres dits pro-apoptotiques et anti-apoptotiques qui ont en commun la présence d'un nombre variable de domaines BH (Bcl-2 Homology). Parmi les protéines du premier groupe, BAK (Bcl-2 Antagonist killer) et BAX sont des protéines dites «effectrices», car leur oligomérisation au niveau de la membrane externe mitochondriale est directement impliquée dans le mécanisme de MOMP. À l'inverse, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL, et MCL-1 (myeloïd cell leukemia 1), l'inhibent. En plus des groupes de protéines pro- et anti-apoptotiques, il existe une sous-famille de protéines dites «BH3-only», caractérisée par la présence unique d'un domaine BH3, qui peut entraîner une activation (Bid, PUMA...) ou une dérégulation (NOXA, Bik...) des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. En l'absence de stimuli de stress, les protéines « BH3-only » se lient aux protéines pro-apoptotiques pour empêcher leur oligomérisation (Moldoveanu et al. 2014).



**Figure 25 : Place de la mitochondrie dans le processus d'apoptose intrinsèque.** Le stress cellulaire augmente l'activité des protéines BH3-only dans le cytosol. Cela favorise l'oligomérisation des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2 (BAX et BAK) au niveau de la membrane mitochondriale externe. Ce processus libère le cytochrome c qui en retour active la formation de l'apoptosome. La cascade de signalisation qui en découle, dépendante des caspases, va aboutir à la mort cellulaire par apoptose (d'après Ashkenazi et al. 2017, 2).

### 5.1.3 Import des protéines mitochondriales

La grande majorité des protéines présentes dans le compartiment mitochondrial sont codées par l'ADN nucléaire. En conséquence, un système d'import des protéines depuis le cytosol vers la mitochondrie est nécessaire. Plusieurs voies complexes d'import protéique ont été décrites à ce jour, mais elles constituent toujours une explication très insuffisante à la localisation mitochondriale de plus de 1500 protéines (Figure 26) (O. Schmidt, Pfanner, et Meisinger 2010; Becker, Böttlinger, et Pfanner 2012).



**Figure 26 : Mécanismes d'import des protéines dans la mitochondrie.** Cinq mécanismes d'import des protéines mitochondriales ont été décrits. MMI : membrane mitochondriale interne ; MME : membrane mitochondriale externe ; EIM : espace inter-membranaire (adapté de Becker, Böttlinger, et Pfanner 2012)

#### 5.1.3.1 Transport vers l'espace inter membranaire

L'ensemble des systèmes d'import de protéines dans la mitochondrie connus repose sur le complexe TOM (Translocase Outer Membrane). Ce complexe multiprotéique, dont le composant principal est Tom40, est le point de passage initial permettant le franchissement de la membrane mitochondriale externe. En fonction des séquences présentes sur les protéines importées, dites séquences d'adressage, celles-ci vont ensuite être prises en charge par d'autres complexes d'import dans l'espace intermembranaire (Chacinska et al. 2009).

#### 5.1.3.2 Import des protéines avec séquences d'adressage vers la fraction interne mitochondriale

Les protéines importées possédant une séquence d'adressage mitochondrial sont transférées vers la translocase TIM23. Ces séquences sont localisées en région N-terminale, sont composées de 15 à 50 acides aminés, et forment des hélices  $\alpha$  chargées positivement. Elles traversent le complexe TIM23

avec le concours de la protéine PAM (presequence translocase-associated motor). Après clivage de leur séquence d'adressage, ces protéines vont atteindre la matrice mitochondriale. En revanche, les protéines possédant en aval de leur séquence d'adressage une séquence signal hydrophobe vont stopper leur translocation et être intégrée dans la membrane mitochondriale interne (Chacinska et al. 2009).

### 5.1.3.3 Import des protéines au sein de la membrane externe mitochondriale

Deux systèmes d'import intéressant deux types de protéines de structure de la membrane externe mitochondriale ont été décrits. Le premier intéresse les protéines en tonneau- $\beta$ , qui après avoir été importées dans l'espace intermembranaire par le complexe TOM, sont insérées dans la membrane externe mitochondriale par l'action du complexe protéique TOB (topogenesis of mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel aussi appelée SAM : Sorting and Assembly Machinery) (Takeda et al. 2021). On peut citer les porines VDAC ou Tom40 dont l'import et l'insertion membranaire dépendent de ce mécanisme. Le deuxième processus d'import vers la membrane externe intéresse les protéines en hélice- $\alpha$ . La connaissance des mécanismes moléculaires précis sous-jacents reste très fragmentaire mais ce système d'import ne semble pas dépendant de la voie Tom40 (O. Schmidt, Pfanner, et Meisinger 2010). En fonction de l'ancrage N- ou C-terminal dans la membrane externe de la protéine importée, des acteurs protéiques différents entreraient en jeu. À titre d'exemple, on peut citer Mim1 (mitochondrial import 1) qui permet l'insertion membranaire des protéines à ancrage N-terminal (notamment Tom20 ou Tom70) (Becker et al. 2008).

### 5.1.3.4 Import protéique dans l'espace intermembranaire par relais de ponts disulfures

De nombreuses protéines mitochondriales au sein de l'espace intermembranaire sont des petites protéines inférieures à 50kDa ne contenant pas de séquence d'adressage (Dudek, Rehling, et van der Laan 2013). Récemment, un système de piégeage de protéines importées dans l'espace intermembranaire a été découvert (Chacinska et al. 2004; Terziyska et al. 2005). Celui-ci repose sur la formation de ponts disulfures inter-moléculaires intermittents avec la protéine CHCHD4 (Mia40 chez la levure) puis sur la formation de ponts disulfures intramoléculaires. C'est la présence d'une séquence hydrophobique riche en résidus cystéines (motif « jumeau »  $C_xC$ ) qui permet la reconnaissance de la protéine importée par CHCHD4. L'activité de CHCHD4 dépend de son statut d'oxydation, qui est contrôlé par la protéine ALR (Erv1 chez la levure) dont le propre statut d'oxydation est lui-même régulé par le cytochrome c et donc par l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (Grumbt et al. 2007; Allen et al. 2005). Les substrats de CHCHD4 ayant ainsi formés des ponts disulfures intramoléculaires sont alors piégés du fait de leur conformation « repliée » dans l'espace inter-membranaire. Plusieurs

modèles d'interaction entre CHCHD4, ALR et la protéine cible ont été proposés mais aucun n'a été établi avec certitude à ce jour (Hell 2008). On notera que des données suggèrent que ce système d'import protéique est responsable, au moins en partie, de la localisation mitochondriale de la protéine suppressive de tumeur p53 (Zhuang et al. 2013).

#### 5.1.3.5 Import des protéines vers la membrane interne

La membrane interne est riche en transporteurs permettant les échanges de métabolites entre la matrice mitochondriale et l'espace inter-membranaire. Ces transporteurs contiennent une ou plusieurs séquences d'adressage discontinues d'une dizaine d'acides aminés permettant leur reconnaissance par les protéines chaperonnes hexamériques Tim9-Tim10 dans l'espace inter-membranaire (Webb et al. 2006). Elles sont alors transférées vers le complexe TIM22 qui est responsable ensuite de l'insertion dans la membrane interne mitochondriale selon des processus moléculaires encore mal connus (Davis et al. 2007).

## 5.2 Dérégulation du métabolisme mitochondrial dans les cellules tumorales

### 5.2.1 Effet Warburg

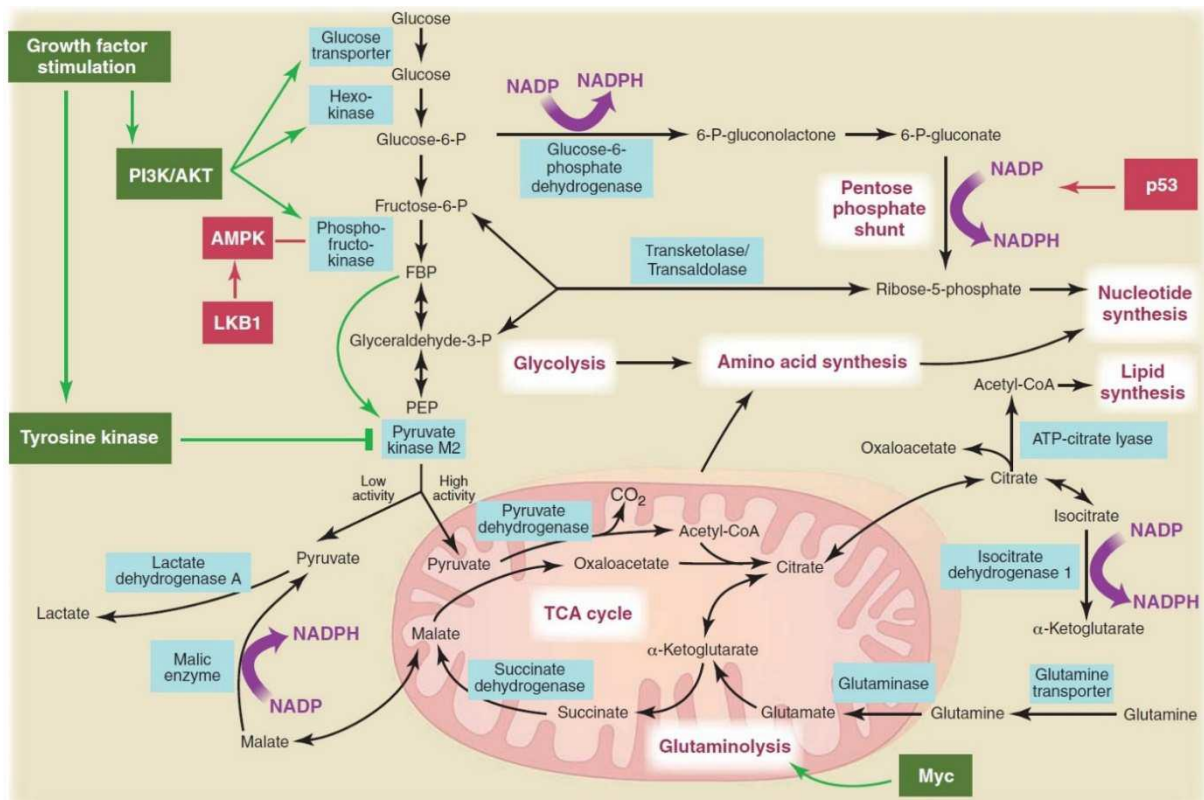
Ce phénomène, baptisé du nom du chercheur qui en a fait la première description dans les années 1920, est une des caractéristiques de la cellule tumorale (Otto Warburg 1924). Selon cette hypothèse, la cellule cancéreuse va préférentiellement utiliser les voies de production de l'ATP à rendement médiocre afin de réserver le glucose à la synthèse de macromolécules. En effet, Otto Warburg a démontré qu'en condition aérobie, les cellules tumorales génèrent leur énergie par la voie de la glycolyse anaérobie plutôt que par la phosphorylation oxydative mitochondriale (O. Warburg 1956). Cette observation peut paraître paradoxale dans la mesure où la phosphorylation oxydative est la plus rentable quantitativement en termes de production d'ATP. L'hypothèse initiale d'altération des enzymes mitochondriales avancée par Warburg fut rapidement écartée. L'explication aujourd'hui acceptée est celle d'une adaptation de la cellule tumorale qui capte et dégrade le glucose de manière accrue, en l'absence ou en présence d'oxygène, principalement pour satisfaire la demande en dérivés glycosylés. En effet, ceux-ci sont indispensables aux réactions anaboliques permettant la synthèse de la biomasse cellulaire (lipides, nucléotides et acides aminés) pour la prolifération tumorale, et non pour la production d'ATP (Vander Heiden, Cantley, et Thompson 2009).

### 5.2.2 Adaptation métabolique des cellules tumorales

Plusieurs mécanismes permettent cette adaptation avantageuse du métabolisme de la cellule cancéreuse. Premièrement, l'augmentation de l'expression des transporteurs du glucose (principalement la protéine GLUT1 codée par le gène *SLC2A1*) est un phénomène largement décrit dans les cellules cancéreuses et activé par les oncogènes *KRAS*, *BRAF* ou *AKT* (Adekola, Rosen, et Shanmugam 2012). Deuxièmement, les enzymes de la glycolyse, telles que HK2 (hexokinase2), PGK1 ou LDHA, notamment sous le contrôle de l'oncogène *MYC*, sont surexprimées dans les cellules cancéreuses. HK2, première enzyme de la glycolyse, est l'isoforme prédominant dans les cellules tumorales contrairement aux tissus sains (en dehors des cellules adipeuses et musculaires) (Moreno-Sánchez et al. 2007). Le LDHA transforme le pyruvate en lactate permettant ainsi le recyclage du NADH en NAD<sup>+</sup>, substrat indispensable à la continuation de la glycolyse (San-Millán et Brooks 2017). Troisièmement, une diminution des capacités de phosphorylation oxydative dans les cellules tumorales en comparaison aux cellules saines a été confirmée dans de nombreux types de cancer (Seyfried et al. 2014). Un lien avec les modifications de l'ultrastructure des mitochondries de la cellule cancéreuse a été avancé par certains auteurs (Arismendi-Morillo 2009). Enfin, l'excrétion de lactates, produits finaux de la glycolyse anaérobie est particulièrement efficace dans les cellules tumorales, notamment par l'expression augmentée de transporteurs de lactates tels que *SLC16A4* ou la famille de transporteurs MCT (Pereira-Nunes et al. 2020).

La figure 27 récapitule les voies du métabolisme cellulaire et leur relation avec les principaux gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes.





**Figure 27 : Métabolisme cellulaire et lien avec les principaux gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes.** La cellule tumorale oriente la glycolyse et le métabolisme mitochondrial vers la génération de précurseurs pour les processus de biosynthèse. De ce fait, une production de coenzymes telle que le NADPH est favorisée (via la voie des pentoses phosphates, du malate ou encore du  $\alpha$ -ketoglutarate) ce qui permet la synthèse des lipides et le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction nécessaire à la prolifération tumorale afin de produire les nombreuses macromolécules dont les cellules cancéreuses ont besoin pour proliférer. Ces processus sont sous le contrôle de plusieurs oncogènes (verts) et gènes suppresseurs de tumeur (rouge) (d'après Vander Heiden et al. 2009).

### 5.2.2.1 Glycolyse anaérobie dans les cellules tumorales

La glycolyse anaérobie offre divers avantages à la cellule tumorale. En effet, des travaux soutiennent que la synthèse de l'ATP est plus rapide par la glycolyse que par la phosphorylation oxydative (Pfeiffer, Schuster, et Bonhoeffer 2001). De plus, la glycolyse est une large source de précurseurs pour les processus de biosynthèse des acides aminés, lipides ou des nucléotides ce qui approvisionnent la cellule tumorale en macromolécules nécessaires pour sa division rapide. Au-delà de cet avantage biosynthétique, une activité glycolytique forte permet la production de NADPH par la voie des pentoses phosphates. Or, par cette production, la glycolyse anaérobie contribue largement au maintien de l'homéostasie redox dans les cellules tumorales (Cairns, Harris, et Mak 2011). En outre, la production de lactates permet la restauration rapide du coenzyme NAD via sa transformation en pyruvate (Israelsen et Vander Heiden 2015).

La libération du lactate en dehors des cellules tumorales entraîne une acidification du milieu extracellulaire, ce qui selon certains auteurs, leur confère un avantage sélectif (Gatenby et al. 2006).



Contrairement aux cellules normales, les cellules tumorales ont la capacité de survivre et proliférer dans un environnement acide. Certaines études démontrent que l'acidification du microenvironnement tumoral favorise la migration et l'invasion tumorale par déstabilisation des jonctions adhérentes intercellulaires (K.-H. Chen et al. 2008), dégradation de la matrice extracellulaire (Rofstad et al. 2006) et activation de facteurs angiogéniques (Végran et al. 2011). Au-delà de ces propriétés pro-métastatiques, des données récentes démontrent aussi que le lactate extracellulaire altère les fonctions immunitaires des cellules NK ou des lymphocytes T et pourrait aussi participer à l'échappement immunitaire observé dans les tumeurs (Romero-Garcia et al. 2016).

#### 5.2.2.2 Métabolisme mitochondrial dans les cellules tumorales

Du fait de son rendement énergétique faible, la glycolyse n'est pas suffisante pour remplir les besoins réplicatifs des cellules tumorales. Une étude a estimé à seulement 17% la proportion d'ATP provenant de la glycolyse, suggérant que la respiration mitochondriale est elle aussi largement impliquée dans la production énergétique tumorale (Zu et Guppy 2004). De plus, la respiration mitochondriale est aussi indispensable pour la biosynthèse de précurseurs non générés par la glycolyse, comme le citrate pour la synthèse des lipides, le malate pour la formation de pyruvate, ou encore l'oxaloacétate pour la synthèse d'acides aminés. Ainsi le cycle de Krebs est fortement impliqué dans la genèse d'intermédiaires de biosynthèse dans les cellules tumorales. Il est alors alimenté par d'autres voies métaboliques qui lui permettent de fonctionner de manière optimale, comme la glutaminolyse, l'autophagie ou la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Hosios et al. 2016; DeBerardinis 2020; White, Mehnert, et Chan 2015). Avec une respiration mitochondriale déficiente, les cellules tumorales sont incapables (par exemple en cas de déplétion de l'ADNmt) de proliférer, ce qui illustre bien l'importance du métabolisme mitochondrial dans les cellules tumorales (Tan et al. 2015).

#### 5.2.2.3 Effet Warburg inversé

Il est bien démontré que les différents cancers humains ne présentent pas le même phénotype métabolique. De même, une même tumeur est composée de plusieurs sous-populations de cellules caractérisées par un profil métabolique variable. En effet, du fait d'une grande hétérogénéité de perfusion au sein d'une même tumeur, certaines zones sont richement approvisionnées en nutriments alors que d'autres présentent un accès limité aux ressources nutritives. L'une des principales caractéristiques de la cellule tumorale est la capacité à s'adapter à cette variabilité. À titre d'exemple, il a été démontré que dans un milieu pauvre en nutriments, certaines tumeurs sont capables de capter les protéines du microenvironnement pour produire de la glutamine et ainsi pourvoir la chaîne respiratoire mitochondriale en substrats (Kamphorst et al. 2015). D'autres travaux ont démontré qu'en condition

hypoxique, la cellule promeut la glycolyse, ce qui entraîne la production de lactates, aux dépens de la phosphorylation oxydative (Moreno-Sánchez et al. 2014). Au sein d'une même tumeur, des travaux sur des modèles de culture 3D ont récemment démontré qu'une collaboration métabolique existait entre les cellules centrales de la culture (hypoxiques) et les cellules situées en périphérie de la culture (normoxiques) (Semenza 2008). En effet, la production de lactates issus de la glycolyse des cellules en zone hypoxique va être utilisée par les cellules situées en périphérie pour alimenter la phosphorylation oxydative et la production d'ATP. Le glucose est alors disponible pour les cellules hypoxiques. Cette collaboration métabolique a aussi été observée entre les cellules tumorales et les cellules stromales situées dans leur microenvironnement immédiat (Pavlidis et al. 2009). Ce phénomène a été dénommé l'effet Warburg inversé ou symbiose métabolique.

### 5.3 Gènes suppresseurs de tumeur à localisation mitochondriale

Étant donné l'importance de la mitochondrie dans le métabolisme tumoral, de nombreuses études se sont intéressées à l'existence d'un lien entre les gènes suppresseurs de tumeur et le fonctionnement de cet organelle. Même si leur rôle fonctionnel reste parfois mal élucidé, plusieurs protéines suppressives de tumeur ont été isolées dans le compartiment mitochondrial au cours des dernières décennies. À titre d'exemple, on peut citer l'identification des protéines p53 (Marchenko, Zaika, et Moll 2000), RB (Attardi et Sage 2013) ou encore VHL (Shiao et al. 2000) au sein de la mitochondrie.

#### 5.3.1 Exemple de p53

La protéine p53 est une protéine centrale dans le fonctionnement cellulaire. Les mutations de TP53 sont très fréquentes dans les tumeurs humaines et ses nombreux rôles suppresseurs de tumeur ont été largement décrits depuis sa découverte (implication notamment dans les phénomènes d'apoptose, de sénescence, de réparation de l'ADN, de prolifération cellulaire ou encore d'autophagie) (Velculescu et El-Deiry 1996; Freed-Pastor et Prives 2012). Au-delà de son activité nucléaire, p53 est aussi impliquée dans de multiples rôles dans la mitochondrie, de manière dépendante ou non de son activité transcriptionnelle (Galluzzi et al. 2011).

##### 5.3.1.1 Impact sur la phosphorylation oxydative

De nombreuses études ont démontré que la protéine p53 contrôle le transfert d'un métabolisme basé sur la phosphorylation oxydative à la glycolyse anaérobie dans de nombreux modèles de cancers (Matoba et al. 2006; J. Liu et al. 2019). Un premier niveau de contrôle s'exerce par une régulation transcriptionnelle de nombreux gènes dont la modification d'expression oriente le métabolisme cellulaire

vers la glycolyse. Ainsi, l'expression du gène *SCO2*, codant une protéine responsable de l'assemblage de cytochrome c oxydase, est dépendante de p53. Certains acteurs de la glycolyse sont aussi sous le contrôle transcriptionnel de p53, comme l'enzyme phosphoglycérate mutase et HK2 (Mathupala, Heese, et Pedersen 1997, 53) ou la protéine TIGAR (Bensaad et al. 2006). De plus, p53 inhibe l'expression des transporteurs membranaires du glucose GLUT1 et GLUT4 (Schwartzberg-Bar-Yoseph, Armoni, et Karnieli 2004). Un second niveau de contrôle du métabolisme est lié à la capacité de p53 d'assurer indirectement le bon fonctionnement de la respiration mitochondriale. En effet, en condition basale, il a été démontré que p53 est nécessaire à la transactivation du gène codant AIF, une protéine de l'espace intermembranaire mitochondrial, centrale à la formation et la stabilité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Pospisilik et al. 2007; Vahsen et al. 2004).

En résumé, p53 favorise un métabolisme cellulaire reposant sur la respiration mitochondriale hors condition de stress cellulaire. Son altération dans les cellules tumorales entraîne une modification de l'expression de nombreuses protéines à tropisme mitochondrial et une déstabilisation des complexes protéiques de la chaîne de transport d'électrons, ce qui *in fine* promeut la glycolyse anaérobie.

#### 5.3.1.2 Impact sur la maintenance de l'ADN mitochondrial

En condition physiologique, seule une petite proportion des protéines p53 dans une cellule est localisée dans la mitochondrie (D. Chen et al. 2006). Son implication dans les mécanismes de maintenance de l'ADN mitochondrial a été suspectée précocement par l'établissement d'un lien entre un syndrome associant des cas d'encéphalopathie chez l'homme et la mutation du gène *RRM2B* (Lim et al. 1993). L'altération de ce gène entraînant une déplétion de l'ADN mitochondrial sous contrôle transcriptionnel direct de la protéine p53 (Bourdon et al. 2007). Par la suite, à l'aide de modèle murin *TP53<sup>-/-</sup>*, il a été démontré que p53 participe à la réparation de l'ADN mitochondrial par excision de base (de Souza-Pinto, Harris, et Bohr 2004). Notamment, p53 interagit directement avec l'ADN polymérase- $\gamma$  et favorise son activité d'exonucléase et de polymérase (Achanta et al. 2005). Ensuite, p53 contrôle TFAM, protéine « histone-like » dont le rôle est crucial pour l'organisation spatiale de l'ADN mitochondrial. Plus précisément, l'analyse de la séquence du gène *TFAM* a montré l'existence de séquences de réponse à p53 et des expériences d'immunoprécipitation de chromatine adaptées à l'ADN mitochondrial ont confirmé l'existence d'une interaction directe (J.-Y. Park et al. 2009). De plus, plusieurs travaux soutiennent l'existence d'un lien direct entre p53 et TFAM (Yoshida et al. 2003). Cette interaction se fait entre les groupes HMG-box de p53 et les domaines TAD1 et TAD2 de TFAM (Wong et al. 2009, 5). Sur le plan fonctionnel, l'interaction entre ces deux protéines favorise l'accès à l'ADN mitochondrial pour les enzymes de réparation par excision de base comme OGG1 (Canugovi et al. 2010).

À la lumière de ces travaux, on peut affirmer que la protéine p53 participe à la maintenance de l'ADN mitochondrial de manière indirecte *via* son activité de régulation transcriptionnelle mais aussi *via* une interaction directe avec TFAM (J.-H. Park et al. 2016).

#### 5.3.1.3 Rôle direct dans l'apoptose intrinsèque

Les fonctions pro-apoptotiques de la protéine p53 sont désormais bien caractérisées et sont au centre de ses capacités oncosuppressives. En cas de stress cellulaire, la protéine p53 va être stabilisée du fait d'une inhibition de l'activité de l'E3 ubiquitine ligase MDM2 entraînant un défaut d'adressage de p53 vers le protéasome. Deux niveaux de régulation de l'apoptose intrinsèque par p53 sont alors décrits (Aubrey et al. 2018).

Premièrement, la forme homotétramérique de p53 exerce un contrôle transcriptionnel sur un grand nombre de gènes impliqués dans ce processus (séquences de reconnaissance spécifiques situées dans les régions régulatrices) (Galluzzi et al. 2011, 53). On peut citer la régulation de l'expression de Apaf-1, de nombreux membres de la famille Bcl-2, ou encore les gènes codant les protéines pro-apoptotiques PUMA et NOXA (Yakovlev et al. 2004). Par ailleurs, p53 inhibe aussi la transcription de gène codant des régulateurs négatifs de l'apoptose, tels que BCL-XL, MCL-1 ou Survivin (Sugars et al. 2001, 53; Pietrzak et Puzianowska-Kuznicka 2008; Hoffman et al. 2002, 53).

Par ailleurs, il est désormais reconnu que la protéine p53 est capable d'interagir directement avec les membres de la famille BCL-2 au niveau de la mitochondrie, afin de faciliter la perméabilisation de la membrane mitochondriale, point de non-retour de la signalisation apoptotique. Précisément, l'interaction directe avec les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 tels que BAX ou BCL-XL inhibe leur fonction et favorise la formation du pore de transition mitochondrial (Chipuk et al. 2005, 53; 2004). Des études actuellement débattues suggèrent aussi que p53 interagit directement avec différents composants du pore de transition mitochondrial et active sa formation (Wolff et al. 2008).

À ce jour, la part distincte de ces deux niveaux de régulation de l'apoptose intrinsèque par p53 (dépendant ou indépendant de son activité transcriptionnelle) est toujours source de débats dans la communauté scientifique.

#### 5.3.2 Exemple de ING1

Les premiers indices d'une localisation mitochondriale des protéines de la famille ING viennent des études de criblage sur modèles de levures. En effet, les orthologues des protéines ING dans la levure (YNG1, YNG2 ou Pho23) interagissent avec plus de 60 protéines mitochondriales selon les données

d'interactome (Krogan et al. 2006). Pour plusieurs de ces « hits », la correspondance avec les protéines humaines est établie. De plus, une étude a aussi démontré l'incapacité de levures déficientes pour Pho23 (orthologue de ING1 et ING2) de croître dans un milieu riche en substrats non fermentables, suggérant un rôle pour les protéines ING1 et ING2 dans le bon fonctionnement du métabolisme mitochondrial (Steinmetz et al. 2002).

À ce jour, seuls les travaux de l'équipe de K.Rabiowol ont démontré l'existence d'une localisation mitochondriale concernant l'un des membres de la famille ING (Bose et al. 2013). En effet, ils ont observé une translocation mitochondriale de la protéine ING1 en réponse à un traitement par UV ou radiations ionisantes dans plusieurs modèles de lignées tumorales humaines. De manière intéressante, la sensibilité des lignées aux stress génotoxiques était corrélée positivement à la quantité de protéines ING1 transférée dans la mitochondrie. Du fait de ce phénotype, les auteurs ont formulé l'hypothèse d'un potentiel rôle pro-apoptotique de la protéine ING1 dans le compartiment mitochondrial. Celle-ci a été étayée par la description non seulement d'un domaine BH-3 "like" sur la séquence protéique d'ING1, mais également une potentielle interaction entre la protéine ING1 et la protéine pro-apoptotique Bax.

Ainsi, en plus d'un contrôle transcriptionnel au niveau nucléaire des gènes impliqués dans la réponse apoptotique, les auteurs suggèrent l'existence d'une participation directe de la protéine ING1 dans la signalisation moléculaire aboutissant à l'apoptose médiée au sein de la mitochondrie. Il s'agit de la première étude mettant en évidence un rôle direct d'une protéine de la famille ING dans le compartiment mitochondrial.

# OBJECTIFS

Les connaissances sur la famille de gènes suppresseurs de tumeur *ING* progressent rapidement depuis leur découverte à la fin des années 1990. Leur expression principalement nucléaire a axé les recherches initiales sur leurs fonctions en lien avec le génome et l'épigénome. Cependant, des fonctions extra-nucléaires aux protéines INGs sont de plus en plus rapportées dans la littérature. Ma thèse a eu pour objectif principal de mieux caractériser les fonctions de deux membres de cette famille de gènes : ING2 et ING3.

### Axe 1

À la lumière de la découverte d'une localisation mitochondriale de la protéine ING1, nous avons dans un premier temps essayé de confirmer que la protéine ING2 était aussi importée dans le compartiment mitochondrial. À la suite de cette découverte, nous avons cherché à explorer les mécanismes biologiques permettant cette translocation puis nous avons exploré plusieurs hypothèses concernant sa fonction dans cet organe. Enfin, nous avons proposé un modèle faisant le lien entre la fonction de la protéine ING2 dans le compartiment mitochondrial et son rôle suppresseur de tumeur.

### Axe 2

Pour la deuxième partie de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact de la localisation intracellulaire de la protéine ING2 dans les cellules tumorales. À l'aide d'une cohorte de tumeurs bronchiques humaines, nous avons dans un premier temps décrit l'expression compartimentale de notre protéine d'intérêt. Secondairement, nous avons exploré une hypothèse de vulnérabilité thérapeutique dépendante de cette expression dans plusieurs lignées de cancers bronchiques. À la suite de ces travaux nous avons proposé un modèle caractérisant pour la première fois l'un des membres de la famille de gènes *ING* comme un potentiel biomarqueur thérapeutique.

### Axe 3

Enfin, dans le cadre d'une collaboration internationale, la dernière partie de mon travail de thèse a concerné la protéine ING3 et l'impact phénotypique de son expression dans un modèle préclinique original de cancer de la prostate. De manière inattendue, nous avons pu démontrer pour la première fois un rôle oncogénique de la protéine ING3. De plus, nous avons pu relier ces observations à la spécificité du tissu prostatique, notamment par un contrôle transcriptionnel des gènes de réponse aux androgènes.

# RÉSULTATS



1 **ARTICLE N°1**

**La protéine suppressive de tumeur ING2 est importée dans la mitochondrie et participe à l'homéostasie métabolique cellulaire.**

---

**ING2 tumor suppressive protein translocates into mitochondria and is involved in cellular metabolism homeostasis**

Charles Ricordel, Laura Chaillot, Florence Jouan, Audrey Mouche, Marie Tiercin, Agnès Burel, Hervé Lena, Benoît Desrues, Thierry Guillaudeux, Rémy Pedoux

Article publié dans la Revue *Oncogene*

## Résumé des résultats principaux

Le premier objectif de ma thèse a été de confirmer la présence de la protéine ING2 dans la mitochondrie à l'aide de plusieurs modèles de lignées cellulaires humaines. En effet, l'équipe du Pr Riabowol a rapporté dans une étude récente, la translocation de la protéine ING1 dans les mitochondries de lignées tumorales humaines en condition de stress génotoxique. Dans la mesure où les protéines ING1 et ING2 présentent une forte homologie de séquence, nous avons voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle ING2 pouvait aussi présenter des fonctions suppressives de tumeur par sa présence dans le compartiment mitochondrial.

- 1- La protéine ING2 est importée dans la fraction interne mitochondriale via le système d'import par relais de ponts disulfures.

À l'aide d'approches expérimentales complémentaires reposant sur du fractionnement cellulaire, de l'immunofluorescence par microscopie confocale et de la microscopie électronique, nous avons pu mettre en évidence la présence de la protéine ING2 dans la mitochondrie, en situation basale, dans plusieurs modèles de lignées cellulaires. De manière plus précise, les analyses de sous-fractionnement nous ont permis de localiser ING2 dans la fraction interne mitochondriale (comprenant la matrice et la membrane interne). Dans la mesure où ING2 ne présente pas de séquence canonique de transport mitochondrial (MTS), nous avons formulé l'hypothèse que l'import mitochondrial de la protéine ING2 était dépendant du système d'import par ponts disulfures. En effet, une analyse *in silico* (logiciel DIANNA) a confirmé l'existence de ponts disulfures intramoléculaires avec une forte probabilité. L'exposition des cellules à un stress oxydatif génère une diminution de protéine ING2 dans le compartiment mitochondrial, sans impacter son expression cellulaire globale. De plus, l'inhibition spécifique de ce système d'import par le Mito-Block6 (inhibiteur d'ALR), entraîne une diminution de la protéine ING2 dans le compartiment mitochondrial. Ces résultats confortent donc l'hypothèse proposée. De manière intéressante, l'import mitochondrial de la protéine ING2 est dépendant de l'expression de la protéine cargo 14-3-3 $\eta$  (permettant sa translocation nucléaire), suggérant un niveau de régulation dépendant du pool cytoplasmique de protéines ING2 disponible dans le cytoplasme.

- 2- L'expression de la protéine ING2 est nécessaire au maintien de l'intégrité structurelle mitochondriale.

Afin de mieux caractériser l'impact fonctionnel physiopathologique de la protéine ING2 dans le compartiment mitochondrial, nous avons choisi une approche expérimentale basée sur la modulation de l'expression d'ING2 par approche d'ARN interférence ou d'édition génétique par la technologie CRISPR-Cas9 dans plusieurs modèles cellulaires. En effet, nous souhaitons reproduire expérimentalement la perte d'expression d'ING2 observée dans les cancers humains. Nous avons montré que la perte de l'expression de la protéine ING2 entraîne une modification significative du réseau mitochondrial, plus particulièrement de la longueur des mitochondries par cluster (analyse *in silico* d'image d'immunofluorescence). Cette modification n'est pas expliquée par une variation de la biomasse, de la polarisation ou du contenu en ADN mitochondrial. À l'aide de la microscopie électronique conventionnelle, nous avons pu observer une forte modification de l'ultrastructure des mitochondries en cas de diminution expérimentale de l'expression de ING2 : augmentation du volume de la matrice et diminution du nombre de crêtes mitochondriales individualisables par mitochondrie.

### 3- La protéine ING2 se lie constitutivement à l'ADN mitochondrial et la protéine TFAM de manière indirecte.

En se basant sur des données de criblage de partenaires protéiques de Pho23 (orthologue de *ING2*) dans un modèle de levure, nous avons formulé l'hypothèse que la protéine ING2 puisse avoir un rôle de protéine « scaffold » en lien avec les fonctions de l'ADN mitochondrial. Par approche d'immunoprécipitation de la protéine recombinante FLAG-ING2 sur lysats cellulaires totaux, nous avons pu démontrer l'existence d'une interaction avec la protéine TFAM. Cette interaction est indirecte comme en témoigne la négativité de notre expérience de pull-down *in vitro* des protéines recombinantes GST-TFAM et ING2. TFAM étant en contact direct avec l'ADN mitochondrial, nous avons recherché une interaction entre ING2 et l'ADN mitochondrial en adaptant une technique de ChIP pour l'ADN mitochondrial selon une méthodologie déjà rapportée. Nos résultats démontrent l'existence d'un enrichissement de la protéine ING2 sur toute la séquence de l'ADN mitochondrial suggérant un mécanisme d'interaction séquence-indépendant. Cette observation conforte la médiation de cette interaction par la protéine TFAM, qui elle-même se lie majoritairement et de façon indépendante de la séquence nucléotidique à l'ADN mitochondrial. Enfin, nous avons démontré l'existence d'un lien entre l'expression de la protéine ING2 et le fonctionnement de la phosphorylation oxydative en condition basale. En effet, la diminution expérimentale de l'expression du gène *ING2* entraîne une diminution de l'activité OXPHOS dans plusieurs modèles cellulaires, estimée par la fluorescence émise lors de l'oxydation du marqueur MitoSox Red par la chaîne respiratoire mitochondriale. Pour résumé, ces données démontrent l'existence d'une connexion entre ING2 et la régulation de la respiration

mitochondriale, possiblement du fait d'une proximité avec l'ADN mitochondrial permise par interaction indirecte avec TFAM.

#### 4- L'expression d'ING2 influence la sensibilité aux inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale

La connexion entre l'expression de la protéine ING2 et la respiration mitochondriale était déjà suggérée par des données de criblages génomiques sur modèles de levure. Nous avons pu reproduire l'observation d'un défaut de croissance des levures porteuses d'une délétion du gène *Pho23* sur milieu de culture composé de substrats non-fermentables en comparaison aux levures sauvages. Ces données nous ont amenés à explorer la relation entre ING2 et le métabolisme cellulaire. Par l'utilisation d'un analyseur Seahorse®, nous avons observé une diminution significative de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules dont l'expression de ING2 a été préalablement inhibée par approche d'ARN interférence en confrontation à la condition contrôle. Les performances aérobies (production d'ATP, respiration basale et maximale) sont globalement diminuées en cas de perte d'expression de ING2. De manière cohérente avec ces résultats, les différents clones CRISPR-ING2 présentent une sensibilité diminuée aux inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale (metformine, 2-DésoxyGlucose), évaluée par test de formation de colonie.

À la lumière de ces données, nous proposons un modèle selon lequel la perte d'expression de la protéine ING2 conférerait un avantage sélectif aux changements métaboliques auxquels fait face une cellule tumorale. Il s'agirait de la première description d'une nouvelle fonction suppressive de tumeur pour les protéines ING impliquant la reprogrammation métabolique.



# ING2 tumor suppressive protein translocates into mitochondria and is involved in cellular metabolism homeostasis

Charles Ricordel<sup>1,2</sup> · Laura Chaillot<sup>1</sup> · Alice Blondel<sup>1</sup> · Jérôme Archambeau<sup>1</sup> · Florence Jouan<sup>1</sup> · Audrey Mouche<sup>1</sup> · Marie Tiercin<sup>3</sup> · Agnès Burel<sup>4</sup> · Hervé Lena<sup>1,2</sup> · Benoît Desrues<sup>1,2</sup> · Thierry Guillaudoux<sup>1,4</sup> · Rémy Pedeux<sup>1</sup> 

Received: 12 August 2020 / Revised: 25 April 2021 / Accepted: 5 May 2021 / Published online: 20 May 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2021

## Abstract

ING2 (Inhibitor of Growth 2) is a tumor suppressor gene that has been implicated in critical biological functions (cell-cycle regulation, replicative senescence, DNA repair and DNA replication), most of which are recognized hallmarks of tumorigenesis occurring in the cell nucleus. As its close homolog ING1 has been recently observed in the mitochondrial compartment, we hypothesized that ING2 could also translocate into the mitochondria and be involved in new biological functions. In the present study, we demonstrate that ING2 is imported in the inner mitochondrial fraction in a redox-sensitive manner in human cells and that this mechanism is modulated by 14-3-3 $\eta$  protein expression. Remarkably, ING2 is necessary to maintain mitochondrial ultrastructure integrity without interfering with mitochondrial networks or polarization. We observed an interaction between ING2 and mtDNA under basal conditions. This interaction appears to be mediated by TFAM, a critical regulator of mtDNA integrity. The loss of mitochondrial ING2 does not impair mtDNA repair, replication or transcription but leads to a decrease in mitochondrial ROS production, suggesting a detrimental impact on OXPHOS activity. We finally show using multiple models that ING2 is involved in mitochondrial respiration and that its loss confers a protection against mitochondrial respiratory chain inhibition *in vitro*. Consequently, we propose a new tumor suppressor role for ING2 protein in the mitochondria as a metabolic shift gatekeeper during tumorigenesis.

## Introduction

Mitochondria are important cellular organelles involved in numerous cellular processes such as energy conversion, calcium homeostasis, regulation of apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production. Many studies have

highlighted the role of altered mitochondrial function in tumorigenesis, including mitochondrial biogenesis, apoptosis, oxidative stress regulation and metabolism [1–3]. Metabolic reprogramming is recognized as a hallmark of cancer as tumor cells need to generate biomass to sustain proliferation but also to adapt to a new microenvironment low in nutrients [4]. Even if low level of ROS production has been associated with enhanced tumorigenesis [5], some studies suggest that tumor cells need to prevent ROS-mediated cell-toxicity in order to maintain their proliferation [6, 7]. Interestingly, the tumor suppressive ability of p53 is due, in part, to its repressive effect on ROS production [8]. In addition to p53, multiple tumor suppressor proteins have been recently described as important actor in the mitochondrial compartment (e.g., VHL or RB1), even if their precise biological roles are less clear [9, 10].

ING (INhibitor of Growth) gene family encompasses 5 members (ING1-5) that have been extensively involved in tumor suppressive functions over the last decades [11]. The two first members of this family, ING1 and ING2 proteins share a very high sequence homology and are constitutive members of the deacetylase complex Sin3A/HDAC1-2 [12].

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01832-3>.

✉ Rémy Pedeux  
remy.pedeux@univ-rennes1.fr

<sup>1</sup> INSERM U1242, Chemistry Oncogenesis Stress and Signaling, Université de Rennes 1, CLCC Eugène Marquis, Rennes, France

<sup>2</sup> Department of Pulmonary Medicine, CHU Pontchaillou, Université de Rennes 1, Rennes, France

<sup>3</sup> Department of Pulmonary Medicine, Hopital de Saint-Malo, Saint-Malo, France

<sup>4</sup> UMS 3480, BIOSIT, MRic, Université de Rennes 1, Rennes, France

To date, many studies support ING1 and ING2 gatekeeper functions as critical regulators of the cell cycle [13], senescence and apoptosis in a p53-dependent manner [14]. More recent studies also describe ING2 caretakers functions, mostly in relation with nuclear DNA repair or replication regulation [15, 16]. Consequently, ING1 and ING2 are mainly nuclear proteins but there are accumulating evidences recognizing their cytosolic functions [17]. A study from Bose et al. reported for the first time a stress-induced mitochondrial translocation of ING1 in epithelial human cells [18]. Remarkably, in yeast *S. cerevisiae*, *Pho23* (ING1/ING2 ortholog) was identified in a genome-wide screen as a gene involved in mitochondrial metabolism [19]. Moreover, a recent study shows that ING2 expression is dependent on glucose level in human renal tubular cells, even if the underlying mechanism remains unclear [20]. In light with these findings, we aimed to investigate the role of ING2 protein in relation with the mitochondrial compartment.

Herein, we demonstrate that ING2 protein translocates into the mitochondria in a redox-sensitive manner. We revealed an interaction between ING2 and the mitochondrial DNA (mtDNA) in the mitochondrial matrix, which is mediated at least in part, by the mitochondrial transcription factor A (TFAM). Moreover, ING2 loss disrupts mitochondrial ultrastructure without any significant detrimental effect on mitochondrial network dynamic or membrane polarization. A decrease in mitochondrial ROS-production and an impairment of mitochondrial respiration was observed in multiple models of ING2 down-regulation. Finally, the loss of ING2 was associated with a lower sensitivity to mitochondrial respiration inhibitors.

## Results

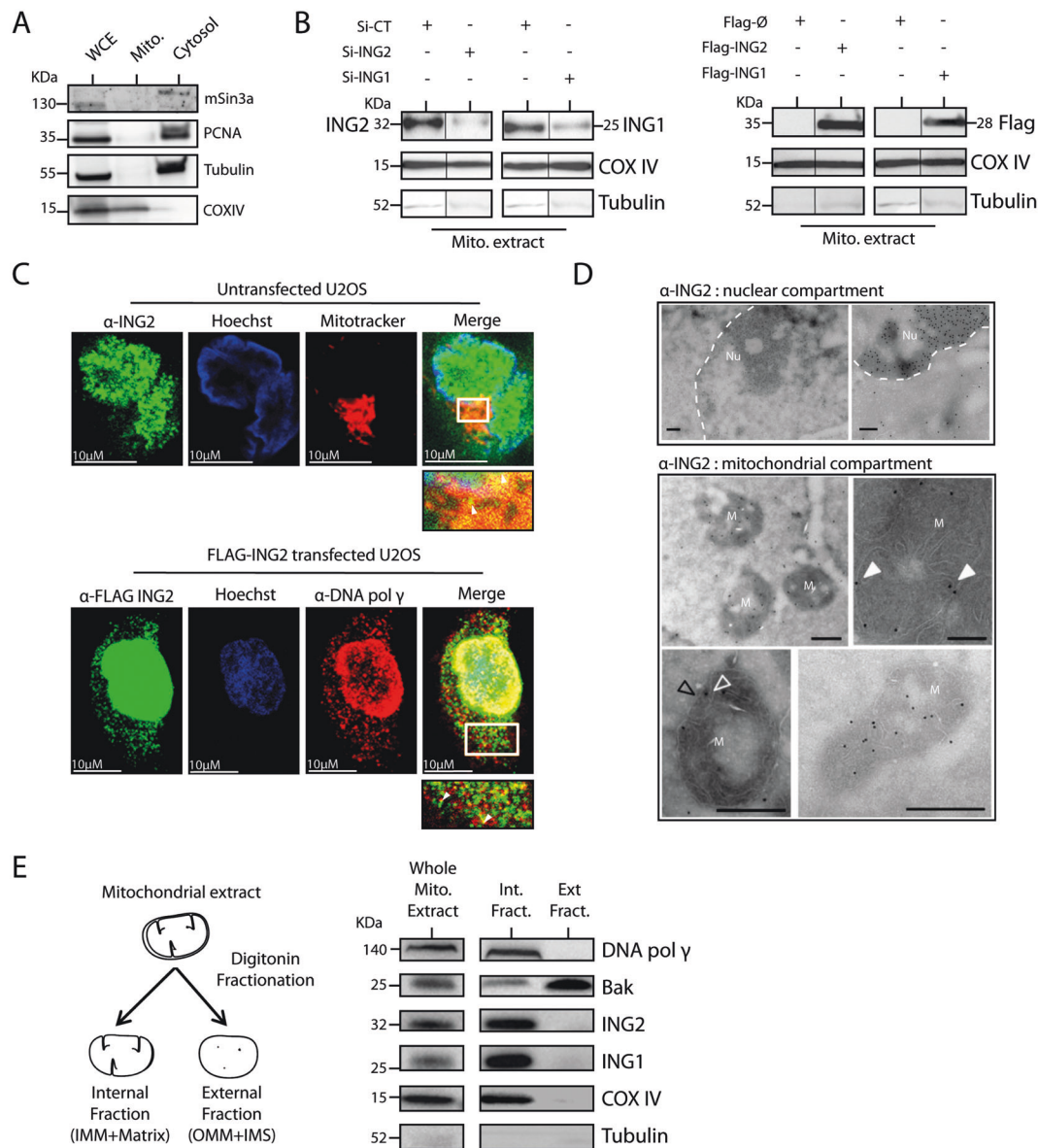
### ING2 protein localizes in the inner mitochondrial compartment

As a previous study reported the mitochondrial localization of ING1 protein in cancer cell lines [18], we initially hypothesized that ING2, sharing a high structural homology with ING1, could also translocate into the mitochondria under basal condition. To validate this hypothesis, we performed mitochondrial fractionation on U2OS cell lines and subjected protein extracts to western blot analysis (purity control in Fig. 1A). ING2 and ING1 were found in the mitochondrial compartment, both in endogenous condition and in exogenous condition (Fig. 1B). Specificity of the western blot labeling was confirmed using siRNA knock-down of ING2 or ING1 expression that shows a decrease of the respective protein in the mitochondrial compartment. To confirm these observations, we performed a confocal immunofluorescence analysis on U2OS cells and observed

the co-localization of ING2 and Mitotracker Red or the mitochondrial protein DNA polymerase  $\gamma$  (Fig. 1C), both in endogenous or exogenous condition of ING2 expression. Moreover, ING2 localization in the mitochondria was also confirmed in A549 (human lung adenocarcinoma cell lines) (Supplementary Fig. 1A) and hTERT-immortalized MRC5 cells (human pulmonary fibroblasts) (Supplementary Fig. 1B, C). To assess the reliability of these results, we performed immunoelectron microscopy on U2OS cells using immunogold labeling of ING2 protein according to the adapted Tokuyasu method [21]. As expected from known nuclear functions of ING2 [15], we observed a clear heterochromatin enrichment of ING2 staining in the nucleus (Fig. 1D). Moreover, almost all of the identified mitochondrial structures show gold beads, labeling ING2 protein (Fig. 1D). Interestingly, ING2 appears to preferentially localize in the mitochondria compared to the cytoplasm (Supplementary Fig. 1D) and more precisely, in the mitochondrial matrix, at the edge of the inner mitochondrial membrane folding (Fig. 1D lower left panel). Coherently, digitonin fractionation of U2OS mitochondria revealed that ING2, similarly to COXIV and DNA polymerase  $\gamma$ , was located in the inner mitochondrial fraction (containing the inner mitochondrial membrane and the mitochondrial matrix) (Fig. 1E). As expected, Bak protein, known to be bound to the outer mitochondrial membrane, was found predominantly in the external mitochondrial fraction. Altogether, these results provide the first evidence of mitochondrial localization of ING2 under basal culture condition, in human cell lines.

### ING2 translocation into the mitochondrial compartment is redox-dependent and involves the mitochondrial disulfide relay system

We next wanted to identify the mechanism implicated in the ING2 mitochondrial import. Of note, according to an *in silico* sequence analysis, ING2 does not contain any mitochondrial targeting sequence, suggesting that the classical mitochondrial import pathways (receptors Tom20/Tom22 and Tom70) are not involved. However, recent studies uncovered an oxidation-driven protein import into the mitochondria, relying on the disulfide bond relay system of the mitochondrial inter membrane space proteins (e.g., CHCHD4, ALR) [22]. Notably, a fraction of the mitochondrial p53 tumor suppressor protein is imported through this system [23]. As the redox sensitivity is a common feature of proteins imported by this pathway, we first sought to observe if the ING2 mitochondrial import in U2OS cells could be dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated by different concentration of glucose oxidase (GO) in culture. ING2 level drastically decreased in mitochondrial and nuclear extracts of U2OS cells treated with GO compared to untreated cells



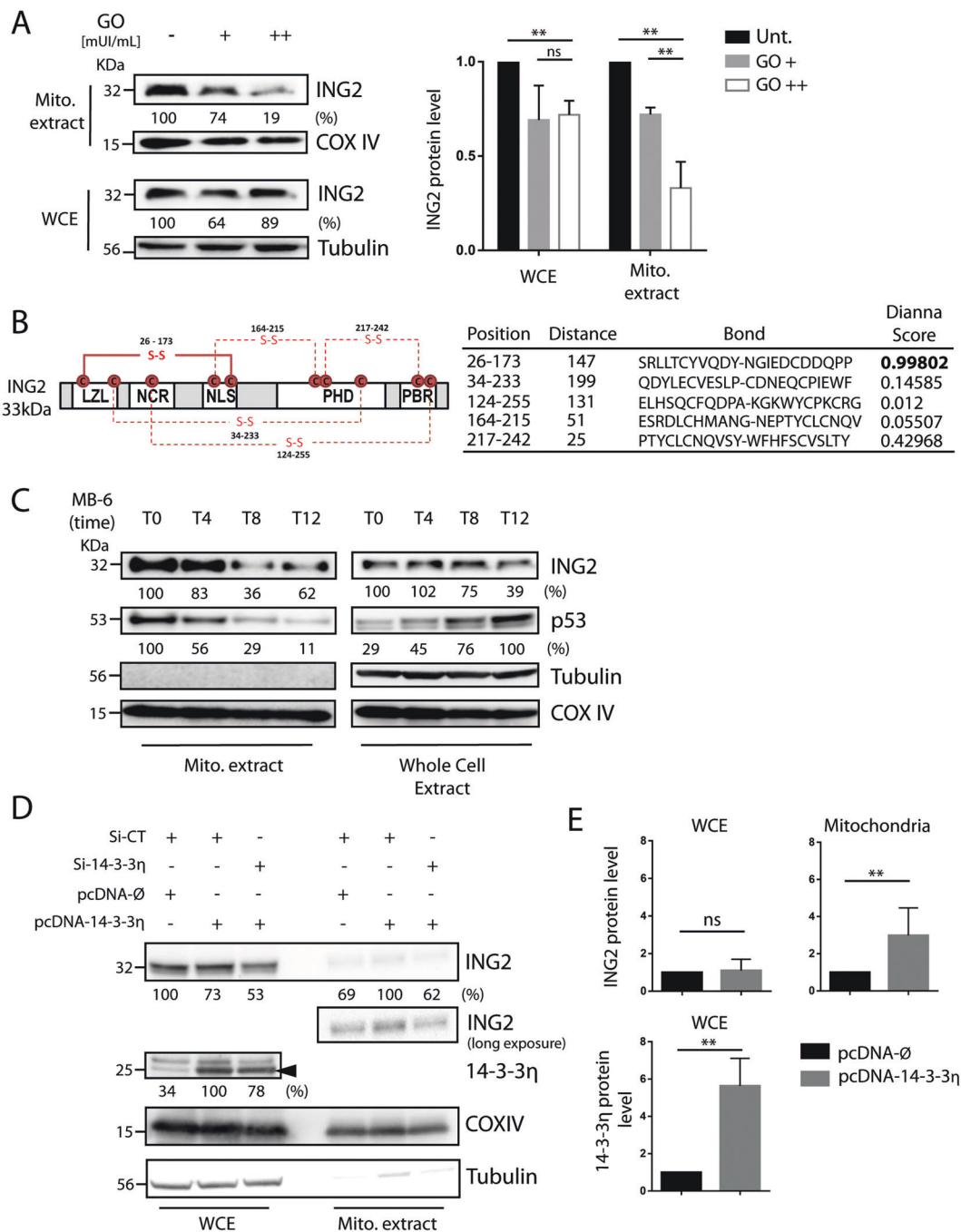
**Fig. 1** ING2 is located in the inner mitochondrial compartment in human cell lines. **A** Western blot analysis of sub-cellular fractionation in U2OS cells. Cytosol, whole cell and mitochondrial extracts were probed with the indicated antibodies. **B** Western blot analysis of mitochondrial extracts from U2OS cells transfected with siCT, siING2 or siING1 and probed with the indicated antibodies (left panel). Western blot analysis of mitochondrial extracts from U2OS cells transfected with FLAG-empty, FLAG-ING2 or FLAG-ING2 vectors and probed with the indicated antibodies (right panel). **C** Immunofluorescence analysis of non-transfected U2OS cells. Cells were probed for ING2, labeled with Hoechst and Mitotracker (top panel). Immunofluorescence analysis of FLAG-ING2 transfected U2OS cells.

Cells were probed for FLAG, DNA polymerase  $\gamma$  and labeled with Hoechst (bottom panel). **D** Representative immuno electron microscopy images from cryosectioned U2OS cells and labeled with ING2 (gold beads). Full white arrows show mitochondrial cristae. Empty white arrow depicts inner mitochondrial membrane and empty black arrow shows outer mitochondrial membrane (Nu: Nucleus; M: mitochondria; black bar; 500 nm). **E** Digitonin sub-fractionation protocol: isolation of internal and external mitochondrial fraction. Western blot analysis of sub-mitochondrial fractionation of U2OS mitochondrial extracts probed with the indicated antibodies. IMM inner-mitochondrial membrane, OMM outer-mitochondrial membrane, IMS inter-membrane space.

(Fig. 2A and Supplementary Fig. 2C). Comparatively, total level of ING2 only shows a slight decrease in the whole cell extracts of GO-treated condition, suggesting that GO treatment affect cellular distribution of ING2 protein and not its intrinsic stability. Of note, the mitochondrial disulfide relay system operates with low molecular weight

proteins (<35 kDa) able to form intra-molecular disulfide bonds [24]. Even if ING2 amino acid sequence lacks the CX3C or CX9C canonical motifs, many proteins identified in yeast mitochondrial inter membrane space do not share the usual cysteine motifs [25]. ING2 protein is able to form multiple intra-molecular disulfide bonds, especially with a





**Fig. 2 Mitochondrial import of ING2 is redox-sensitive and is impaired upon inhibition of mitochondrial disulfide relay system.** **A** Western blot analysis of whole cell extracts (WCE) and mitochondrial extracts from U2OS cells treated with increasing glucose oxidase during 24h, and probed with the indicated antibodies (–vehicule; +50 mUI/ml; ++100 mUI/ml). Histogram showing western blots quantitation of three independent biological replicates. Bars represent mean  $\pm$  SD. (ns: non significant; \*\* $p < 0.01$ ). **B** Scheme of the ING2 amino acid sequence with cysteine residues and subsequent intramolecular disulfide bond predicted by the DIANNA software analysis (right panel). Output table of the DIANNA software

analysis (left panel). **C** Western blot analysis of whole cell and mitochondrial extracts from U2OS cells treated with MB-6 at 50  $\mu$ M during indicated times. Protein extracts were probed with the indicated antibodies. **D** Western blot analysis of whole cell extracts (WCE) and mitochondrial extracts from U2OS cells transfected with Si-CT, Si-14-3-3, pcDNA- $\emptyset$ , or pcDNA14-3-3 as indicated. Protein extracts were probed with the indicated antibodies. Black arrow show 14-3-3 $\eta$  signal. **E** Histogram showing western blots quantitation of three independent experimental replicates. WCE signal was normalized on tubulin and mitochondrial extracts signal was normalized on COX IV. Bars represent mean  $\pm$  SD. (ns: non significant; \*\* $p < 0.01$ ).



high probability score at position C<sup>26</sup>-C<sup>173</sup>, according to in silico Dianna software analysis (Fig. 2B). Interestingly, the cysteine rich-parts of ING2 (LZL domain and PHD domain) are highly conserved through evolution, supporting their important biological role [26]. As we were not able to identify a specific cysteine of the ING2 sequence responsible for its mitochondrial import (Supplementary Fig. 2A), we choose a pharmacological approach using MitoBlock-6 (MB-6), a specific inhibitor of ALR, a protein controlling the redox-driven mitochondrial protein translocation [27]. ING2 mitochondrial level decreased drastically in a time and concentration-dependent manner in MB-6 treated U2OS (Fig. 2C and Supplementary Fig. 2B). As a positive control of the import inhibition, mitochondrial p53 also decreased in the MB-6 treated condition (Fig. 2C). Comparatively, total level of ING2 in the whole cell extracts shows no significant decrease upon MB-6 treatment, except for long term exposure (Supplementary Fig. 2C) or high GO dose condition, whereas the total level of p53 increased significantly. Moreover, recent reports have demonstrated that 14-3-3 proteins can have a biological role in mammalian mitochondria [28]. Notably, ING1 nuclear export is mediated by 14-3-3 $\eta$  cargo protein [29]. Therefore, we wondered if ING2 mitochondrial level was dependent on 14-3-3 $\eta$  expression. We observed that over-expression of 14-3-3 $\eta$  protein in U2OS cells induces an increase of ING2 level in mitochondria (Fig. 2D, E) whereas the whole cell level of ING2 remains stable. This observation suggests a link between 14-3-3 $\eta$  expression and ING2 mitochondrial import and we speculate that it might result from a higher cytoplasm availability of ING2 for mitochondrial targeting that relies, at least in part, on the disulfide relay system.

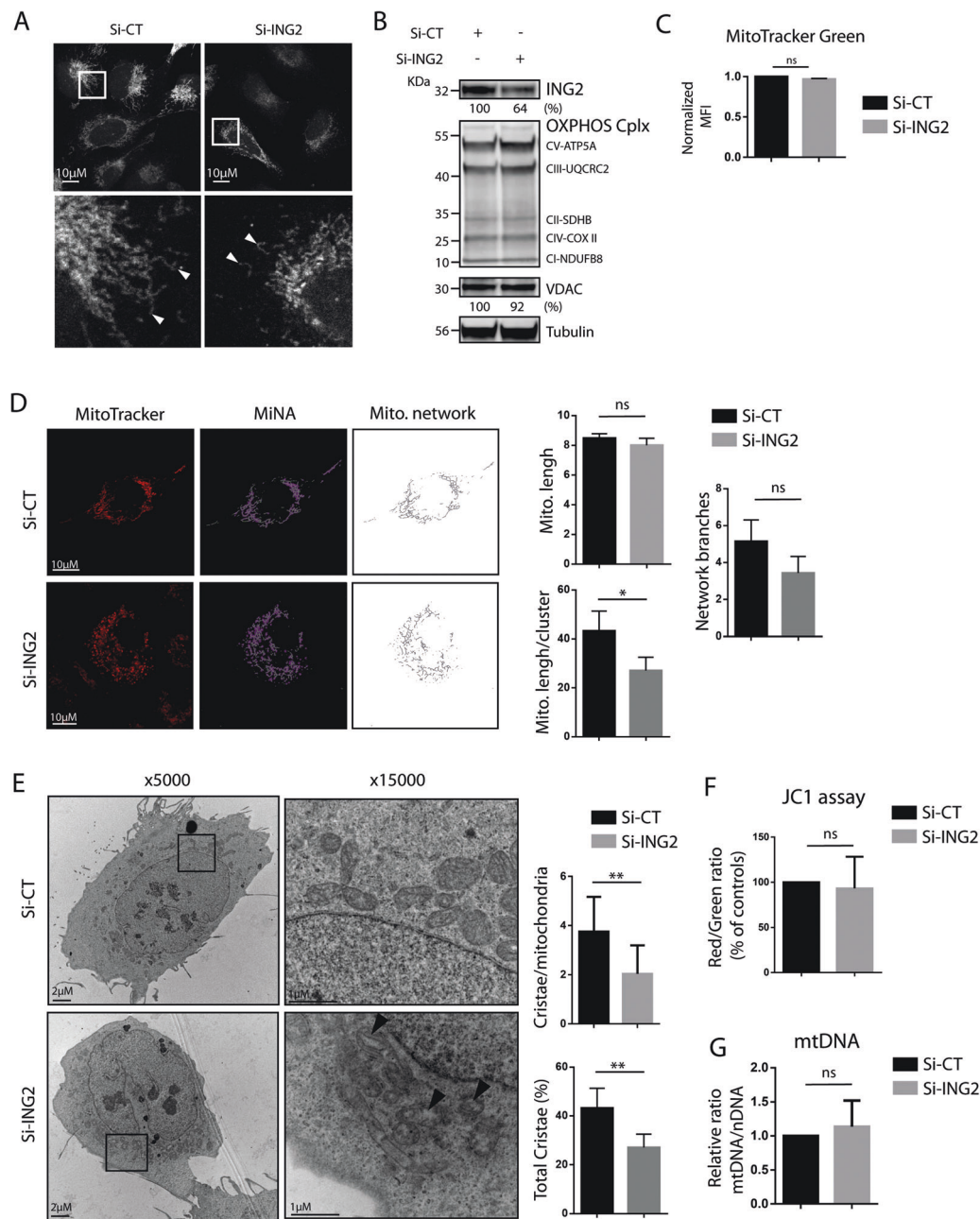
### ING2 down-regulation impairs mitochondrial ultrastructure without interfering with the mitochondrial network

To further emphasize the role of ING2 in mitochondrial biology, we performed down-regulation of ING2 using siRNA approach in U2OS cells (Supplementary Fig. 3A). Although confocal immunofluorescence does not significantly identify difference in mitochondrial shapes (Supplementary Fig. 3B), siRNA targeting ING2 produced a fragmentation of the mitochondrial network (Fig. 3A). These observations were not explained by a variation in mitochondrial biomass, as it remains unchanged compared to control cells (Fig. 3B, C). To assess more reproducibly the mitochondrial network, we used the recently developed MiNa software (Mitochondrial Network Analysis) [30] and observed a significant reduction of mitochondrial length per cluster in si-ING2 treated cells (Fig. 3D). These results were confirmed in CrispR-ING2 A549 cells with even a more dramatic reduction of mitochondrial length compared to

CrispR-CT (Supplementary Fig. 3C). However, the mitochondrial network appears comparable between ING2-deficient and control cells, in both CripsR-Cas9 and siRNA experimental setting (Fig. 3D and Supplementary Fig. 3C), suggesting that mitochondrial fusion and fission processes are not impaired under our experimental condition. Conventional transmission electron microscopy confirmed the clear disruption of mitochondrial matrix structure in ING2 down-regulated cells compared to control. More precisely, ING2 knock-down cells displayed a swollen morphology, a loss of the core structural appearance, a significant reduction of the number of mitochondrial cristae and a dramatic impairment of their integrity (Fig. 3E). Notably, mitochondrial polarization (Fig. 3F), as well as mtDNA/nDNA ratio (Fig. 3G) remained unchanged upon si-ING2 treatment, suggesting that the mitochondrial structural changes were not a consequence of mitochondrial outer membrane permeability or mtDNA defect, as it has been described in previous reports [31, 32]. These results demonstrate that ING2 expression is critical to maintain mitochondrial length and matrix ultrastructure integrity in human cells.

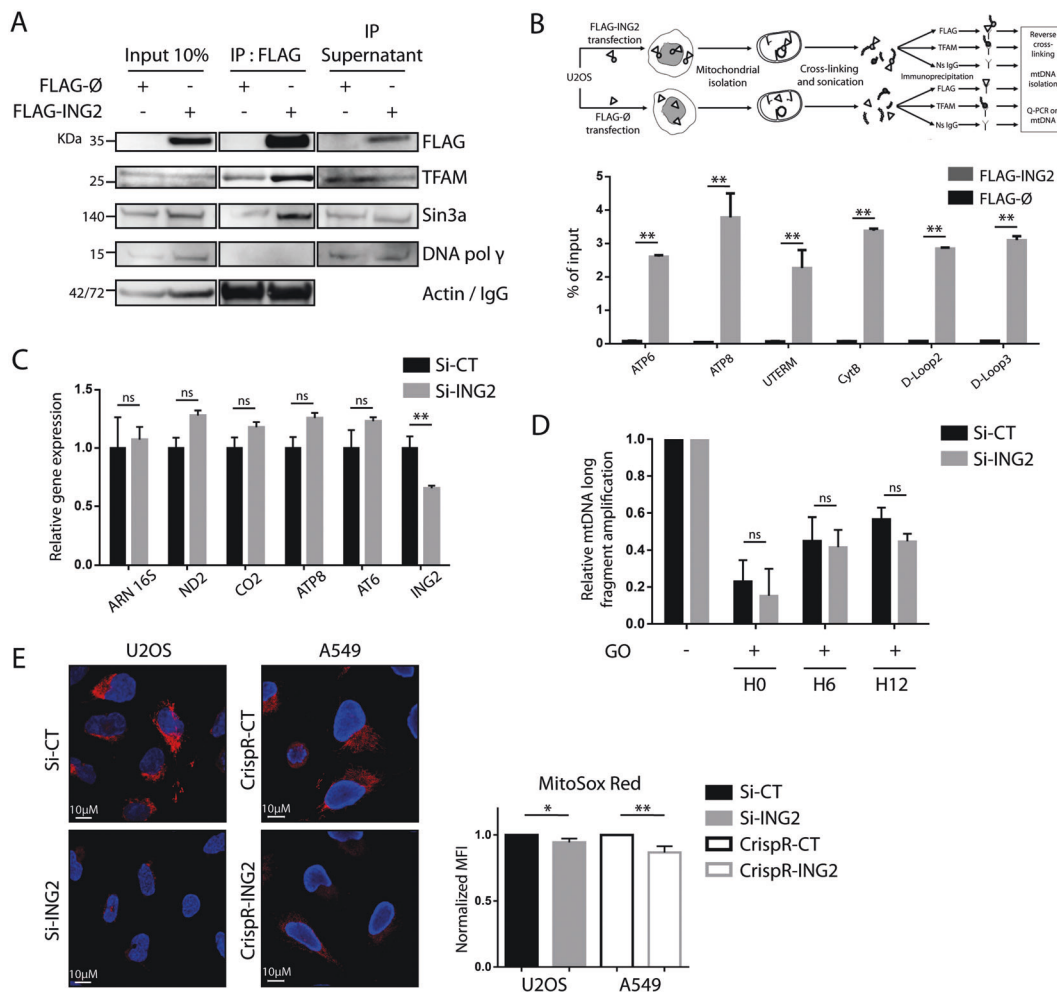
### ING2 protein interacts with TFAM and is involved in the control of mitochondrial ROS production

Previous reports have shown that ING2 acts as a reader of the nuclear chromatin, through a direct interaction with histone H3 in a dependent manner of its methylation status on lysine 4 [33]. Mitochondrial DNA is histone-free, but compacts as nucleoid-like structures through the nuclear-encoded protein TFAM [34]. Interestingly, according to an interactome analysis in yeast, Pho23 (ING1/ING2 ortholog) interact with several mitochondrial proteins involved in mtDNA regulation [18, 35]. Therefore, we hypothesized that ING2 could act as a scaffolding protein in the mitochondria and looked for putative interacting mitochondrial protein based on known ING2 functions in the nucleus. Using immunoprecipitation assay, we observed an enrichment of TFAM in the ING2-FLAG pull-down of U2OS cells (Fig. 4A). As a positive control, mSin3a also immunoprecipitates with FLAG-ING2 in our experimental condition. We did not detect any interaction of ING2 with the main mtDNA polymerase, DNA Poly (Fig. 4A), or the mtDNA helicase, Twinkle (Supplementary Fig. 4A). We assessed if the interaction between TFAM and ING2 was direct using a GST-pulldown in vitro assay with recombinant proteins. As no ING2 was detected when GST-TFAM was pulled-down (Supplementary Fig. 4B), we concluded that the interaction observed in living cells is more likely to be indirect and involves another mitochondrial partner protein. However, as TFAM protein could be found unbound to mtDNA in cytoplasm, we



**Fig. 3** ING2 down-regulation impairs mitochondrial ultra-structure without interfering with the mitochondrial network. **A** Immunofluorescence analysis of Si-CT or Si-ING2 treated U2OS cells. Cells were probed for Mitotracker Red. White arrows show mitochondrial networks. **B** Western blot analysis of whole cell extracts from Si-CT or Si-ING2 treated U2OS cells and probed with the indicated antibodies. **C** Flow cytometry analysis of Si-CT or Si-ING2 treated U2OS cells represented according to their mean fluorescence intensity (MFI) of Mitotracker Green (ns: non-significant). **D** Representative immunofluorescence analysis of Si-CT or Si-ING2 treated U2OS cells processed with MiNa software (left panel). Histogram showing MiNA outcome parameters evaluated on 20 individual cells in each condition. Bars represent mean  $\pm$  SD (right panel; ns: non-significant; \* $p < 0.05$ ). **E** Representative conventional transmission

electron microscopy images of Si-CT or Si-ING2 treated U2OS cells (left panel). Black arrows show swollen mitochondria morphology. Histograms represent number of cristae per mitochondria and percentage of mitochondria with normal cristae appearance per cells, evaluated on 20 individual cells in each condition from two independent biological replicates. Bars represent mean  $\pm$  SD (right panel; ns: non-significant; \*\* $p < 0.01$ ). **F** Histograms showing relative Red/green ratio based on flow cytometry JC1 assay on Si-CT or Si-ING2 treated U2OS cells. Bars represent mean  $\pm$  SD (ns: non-significant). **G** Histograms showing relative nuclear DNA on mtDNA ratio based on qPCR assay on Si-CT or Si-ING2 treated U2OS cells from two independent biological replicates. Bars represent mean  $\pm$  SD (ns: non-significant).



**Fig. 4** ING2 protein interacts with transcription factor A mitochondrial (TFAM) and is involved in the control of mitochondrial ROS production. **A** Immunoprecipitation of exogenous FLAG in FLAG-Ø or FLAG-ING2 transfected U2OS cell. Proteins were detected using the indicated antibodies. Actin and IgG light chain (IgG LC) were used as loading control for the input and the IP respectively. **B** ChIP-qPCR results from FLAG-Ø or FLAG-ING2 transfected U2OS. Percentage of input is given for samples immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. Bars represent mean ± SD (\*\**p* < 0.01). **C** qPCR results from mtDNA-encoded genes in Si-CT or Si-ING2

treated U2OS cells. Bars represent mean ± SD (ns: non-significant; \*\**p* < 0.01). **D** MtDNA recovery upon oxidative DNA damage generated by glucose oxidase treatment. Relative mtDNA long fragment amplification on small mtDNA fragment amplification is given relative to control. Bars represent mean ± SD (ns: non-significant). **E** Representative immunofluorescence analysis of Si-CT or Si-ING2 treated U2OS cells stained with MitoSox Red and Hoechst (left panel). Histogram showing MitoSox Red normalized fluorescence intensity evaluated by flow cytometry from two independent biological replicates. Bars represent mean ± SD (right panel; \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01).

asked whether ING2 protein could interact with the mtDNA-bound form of TFAM. To answer this question, we performed a Mt-DIP assay of ING2 flagged protein, according to previously reported methods [36]. We found multiple regions of mtDNA bound to FLAG-ING2 without any enrichment of a specific sequence of the mtDNA (Fig. 4B and Supplementary Fig. 4C). As TFAM bind to mtDNA in a sequence-specific and nonspecific manner [37], this observation suggests that ING2 interaction with mtDNA is mediated by TFAM. To explore the role of ING2 in relation with mtDNA, we tested the impact of ING2 down-regulation on mtDNA transcription. Si-ING2 treated U2OS cells did not show variation

in mtDNA genes transcription relative to control (Fig. 4C). Moreover, as INGs proteins have recently been involved in nuclear DNA repair pathway [38], we checked if mtDNA repair after oxidative damage could be influenced by ING2 expression (Fig. 4C). We did not detect any difference in mtDNA oxidative damage recovery in ING2 down-regulated cells compared to the control cells. Finally, previous studies have shown that mitochondrial ROS production is linked to mtDNA functional defect, we checked if MitoSOX fluorescence was dependent on ING2 expression. We observed a decrease in mitochondrial ROS production in two of our models of ING2-deficient cell lines (Fig. 4E), suggesting

a link between ING2 expression and OXPHOS activity. To recapitulate, these results demonstrate that ING2 can associate with mtDNA, likely through a close but indirect interaction with TFAM. Besides, ING2 expression impacts mitochondrial ROS production and therefore OXPHOS activity.

### **ING2 loss impairs mitochondrial oxidative phosphorylation and decreases the cytotoxic effect of mitochondrial respiratory chain inhibitors**

As OXPHOS activity is impaired in the absence of ING2, we speculate that ING2 may be implicated in cellular energy metabolism. Interestingly, a genome-wide screen identified *Pho23* (gene ortholog for *ING1* and *ING2* in yeast) as a gene involved in mitochondrial respiration in yeast [19]. Indeed, we were able to confirm this finding, as we observed a clear defect in growth of *Pho23*-deleted strains compared to wild-type on non-fermentable substrate (Supplementary Fig. 5A). To further investigate this hypothesis in a human cell line model, a Cell Mito Stress assay was used to analyze the metabolic profile of U2OS cells using Seahorse® technology. As demonstrated in Fig. 5A, ING2 down-regulation in U2OS cells inhibits mitochondrial aerobic respiration. Furthermore, basal and maximal respiration as well as ATP production decreased in ING2 down-regulated cells (Fig. 5B). Coherently, ATP production in CrispR-ING2 cells shows a trend toward decrease compared to controls, according to an alternative luminescence assay (Supplementary Fig. 5B). These observations suggest that the decrease in mitochondrial ROS production in ING2-deficient cells is a consequence of the reduction of the mitochondrial respiratory chain activity. In accordance with the known tumor suppressor role of ING2, we investigated if the loss of ING2 could prevent the accumulation of oxidative stress generated by mitochondria in cancer cells and consequently provide a survival advantage. To test this hypothesis, we submitted cancer cells to different mitochondrial-generated oxidative stress and performed clonogenicity assay. The surviving fraction was higher in A549 CrispR-ING2 compared to CrispR-CT cells upon 2-DG or metformin treatment (Fig. 5C). In line with these results, we proposed a new tumor suppressor role for ING2, as its loss in cancer cells could promote a metabolic shift, preventing mitochondrial-induced oxidative damage and therefore providing a survival advantage (Fig. 5D).

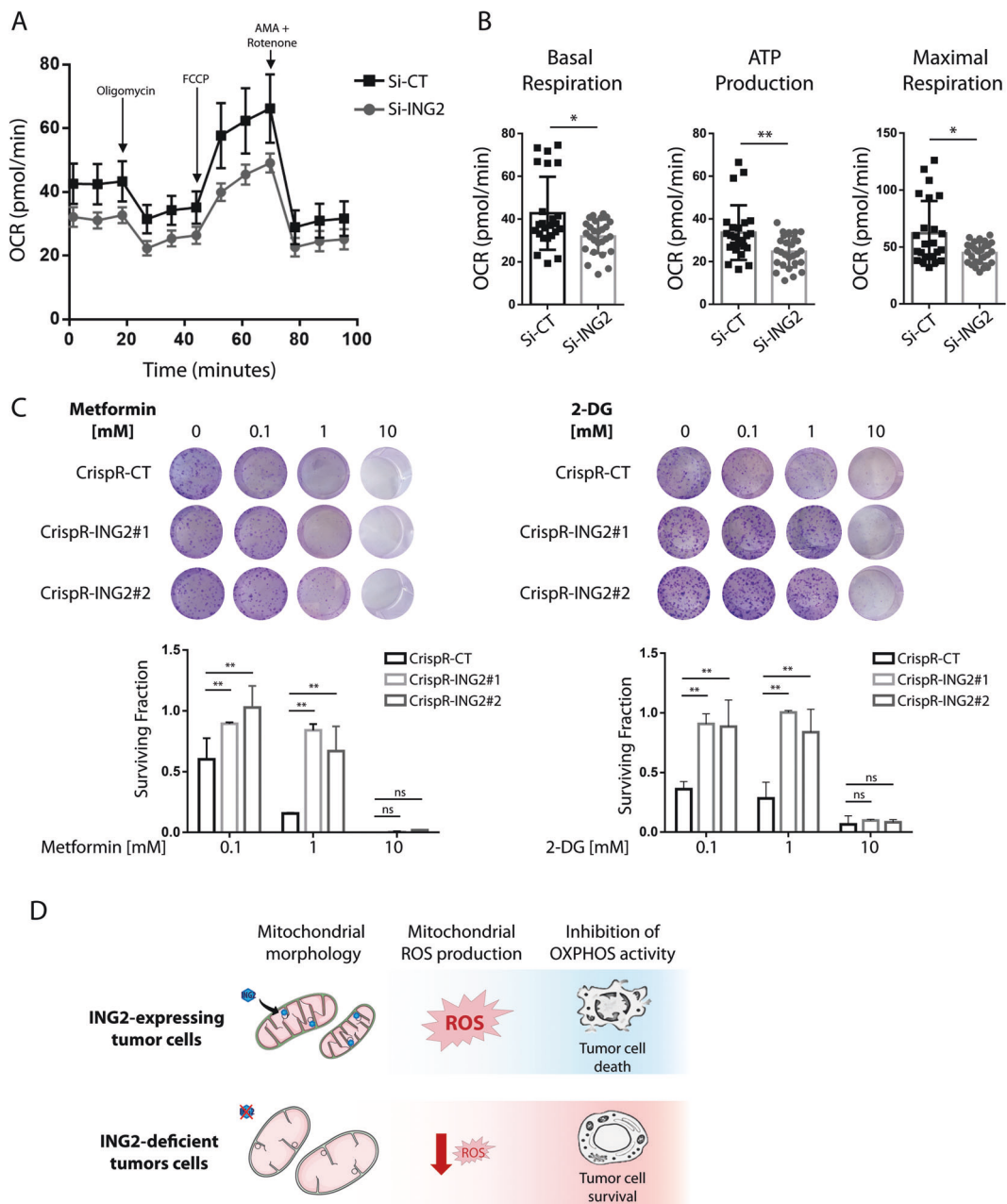
## **Discussion**

Previous studies have mainly focused on the nuclear functions of ING2. As ING1 has been previously mapped in the mitochondrial compartment and involved in the intrinsic

apoptotic pathway [18], we asked whether ING2 protein, sharing a high sequence homology with ING1, could also have a functional role in the mitochondria. Contrary to ING1 mitochondrial translocation, mostly induced by UV stress [18], we observed a mitochondrial localization of ING2 under basal culture condition in both human tumor cells and immortalized fibroblasts. Interestingly, according to in silico amino-acid sequence analysis, BH3-like domain identified in ING1 is not conserved for ING2, suggesting that ING2 is not involved in mitochondrial-mediated apoptosis. Indeed, we were not able to detect significant variation of ING2 mitochondrial level upon different apoptotic stress (data not shown). However, in light with the high sequence homology between ING1 and ING2, potential crosstalks in their respective mitochondrial signaling pathways warrant further evaluation. We demonstrate that ING2 translocation into the mitochondria is mediated, at least in part, by the mitochondrial disulfide relay system and dependent on 14-3-3 $\eta$  protein expression. Even if ING2 does not contain the canonical CX3C and CX9C motifs, recent work has highlighted that the mitochondrial import of many proteins (e.g., Mrp10 or ATP23) are dependent on CHCHD4 through an interaction that does not require a cysteine motif [39, 40]. Nonetheless, the precise underlying mechanism responsible for ING2 transfer from the inter-membrane space to the mitochondrial matrix remains to be further dissected. Redox-sensitivity is an important feature of inner mitochondrial space proteins, as well as their ability to form intra-molecular disulfide bonds [41]. Therefore, in-depth biochemical characterization of ING2 protein in relation with the redox status of the cell remains a very interesting avenue to explore.

As ING2 acts as a reader of the chromatin in the nuclear compartment, we hypothesized that it might interact with mtDNA. Immunoelectron microscopy mainly localizes ING2 protein at the edge of the inner mitochondrial membrane folding, also known to be the preferential nucleoid position in the mitochondrial matrix [42]. Consistently, we observed a clear enrichment of mtDNA sequences upon FLAG-ING2 immunoprecipitation. Moreover, mitochondrial reticulum disruptions have been reported in cells lacking mtDNA (*Rho0* cells) [31]. However, mtDNA/nDNA ratio remains unchanged upon ING2 down-regulation. Our results demonstrate that ING2 expression is critical to maintain mitochondrial ultrastructure without interfering with the mitochondrial mass or mtDNA quantity. Interestingly, ING2 has been described as a nuclear phosphatidylinositol receptor [43]. Phosphatidylinositols are found in the mitochondrial membranes, but little is known regarding their respective role in that organelle [44]. Determining if ING2 interacts with phosphatidylinositol in the mitochondria could provide rationale to support a scaffolding role for ING2. We identified TFAM as a binding





**Fig. 5** ING2 loss impairs mitochondrial oxidative phosphorylation and decreases the cytotoxic effect of mitochondrial respiratory chain inhibitors. **A** Glycolysis in Si-CT or Si-ING2 treated U2OS cells measured using a XF-96 extracellular flux analyzer shown as oxygen consumption rate (OCR) means  $\pm$  SD of experimental triplicates. **B** Histograms showing the effect of ING2 down-regulation on basal respiration, ATP production and maximal respiration on U2OS cells. OCR values  $\pm$  SD from experimental triplicates. Bar graphs represent mean  $\pm$  SD (ns: non-significant; \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01).

**C** Colony formation assay performed on CrispR-CT and CrispR-ING2 A549 clones treated with respiratory complex chain inhibitors: metformin and 2-DG at indicated concentration (left panel). Graph shows the number of colony formation; three independent experiments were performed. Bar graphs represent mean  $\pm$  SD (ns: non-significant; \*\* $p$  < 0.01). **D** Comprehensive summary of the main results. ING2 loss in cancer cells induces a change in mitochondrial morphology, a decrease in ROS production and promotes survival upon inhibition of OXPHOS activity.

partner of ING2 in the mitochondrial compartment. Even if this protein-protein interaction was indirect and also found in whole cell lysates, TFAM is mainly a mitochondrial protein and we speculate that it most likely occurs within the mitochondria. Even though down-regulation of ING2

does not impact mtDNA repair, transcription or replication, a clear impact has been shown on OXPHOS activity. We confirmed this hypothesis using a real-time live cell metabolomics analysis and reveal that ING2-deficient tumor cells acquire a more glycolytic profile. Interestingly, this

metabolic adaptation has been previously linked to chemosensitivity in human cancer cell lines [45] and recent work from our team have highlighted the increased chemosensitivity of ING2-deficient models (data not published). In which proportion ING2-dependent chemosensitivity is mediated by its mitochondrial or nuclear DNA caretaker's functions remains to be elucidated. Of note, cancer cells exploit cellular metabolism to adapt and survive through metabolic plasticity [46]. Our results indicate that ING2 loss modifies the metabolic profile of tumor cells, as surviving fraction increases relative to control upon OXPHOS inhibition in ING2-deficient cells, using glucose deprivation or a pharmacological approach. Interestingly, oxidative stress is known to induce senescence in human cells and ING2 expression has been linked to p53-dependent senescence [14]. The metabolic shift we observed upon ING2 down-regulation might advantage tumor cells by increasing tolerance to oxidative injuries and prevent the induction of senescence. As senescence escape is a hallmark of tumor development, this represents an important opportunity to consider for future research.

A relationship between ING2 epigenetic regulation and cellular metabolic response has not been ruled out in our experimental setting. Notably, a study identify SIN3 deacetylase complex as repressor of genes encoding mitochondrial proteins in *Drosophila* [47]. However, previous work from our team didn't identify any gene involved in cellular metabolic homeostasis or mitochondrial morphology, transcriptionally regulated by ING2 expression in the U2OS model [48]. This observation suggests that the impact on the mitochondrial morphology and metabolic phenotype observed in mammalian cells is mediated by a direct effect of ING2 protein in the mitochondrial compartment. In the context of tumorigenesis, cytosolic translocation has been described as a mechanism for tumor cells to escape tumor suppressive properties of many ING proteins [49–52]. Whether this phenomenon could impact ING2 mitochondrial functions and cellular metabolic homeostasis is an unanswered question. However, a decrease of ING2 protein expression is the main phenotype described in cancer cells and cytosolic translocation appears to be a very rare event in tumor tissues [53]. Consequently we believe that our experimental setting recapitulates more closely the physiology occurring in tumor cells.

We brought to light for the first time a mitochondrial localization of ING2 tumor suppressor protein in human cell lines. We linked ING2 expression and the control of cellular metabolism through a mechanism that could involve an interaction with mtDNA. Finally, our results suggest that the loss of ING2 in tumor cells might improve metabolic plasticity, therefore highlighting a new role for ING2 as a metabolic shift gatekeeper during tumorigenesis.

## Materials and methods

### Cell culture and drug treatments

U2OS human osteosarcoma cell lines and MRC5-hTERT human lung fibroblast were cultured in McCoy medium (Thermo Scientific; MS, USA) supplemented with 10% of decomplexed fetal bovine serum and antibiotics (penicillin/streptomycin, Thermo Scientific). A549 adenocarcinoma cells were cultured in DMEM medium (Thermo Scientific, MS, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (penicillin/streptomycin, Thermo Scientific). Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere, 5% CO<sub>2</sub>. Glucose oxidase treatment (Merck Millipore, MS, USA), resulting into accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in culture, was used to induce oxidative stress or oxidative mtDNA damage in U2OS cells (concentration ranging from 25 to 100 mUI/mL). MitoBlock-6 (Merck Millipore, MS, USA) was used to inhibit the mitochondrial protein import disulfide relay system in U2OS cells (concentration ranging from 5 to 100 μM during indicated time).

### siRNAs and plasmids transfection

Plasmids were transfected in U2OS cells with Lipofectamine LTX in combination with Plus reagent (#15338-100, Invitrogen) or Lipofectamine 2000 (#11668027, ThermoFisher, MS, USA) according to the manufacturer's instructions. Of note, FLAG-tag was added on the N-terminal region of the ING2 protein in order to avoid steric interference with its PHD domain. A previously validated custom stealth siRNA (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) was used for the ING2 down-regulations [13]. Stealth siRNA (Invitrogen) sequence targeting the coding region of ING2 mRNA (si-ING2) is: 5'-CAA-AUG-GAG-UUA-CAC-UCA-CAG-UGU-U-3'. For the control (si-CT), the universal stealth siRNA negative control (#12935110, Invitrogen) was used. SiRNA (sc-43581) obtained from SantaCruz® was used for 14-3-3η down-regulation. Transfections were performed on 30% confluent U2OS, with 40 nM siRNA duplexes using lipofectamine RNAimax (Invitrogen) and according to the manufacturer's instructions. All experiments on siRNA-treated cells were performed 48 h after transfection.

### Mitochondrial isolation and digitonin fractionation

Mitochondrial and cytosolic fractions from U2OS cells were obtained by using the Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (#89874, ThermoFisher, MS, USA) according manufacturer's instructions. All steps were carried out at 4 °C. Briefly, culture cells were lysed in hypotonic buffer and centrifuged at 700 × g for 10 min. The supernatant was further centrifuged at 12,000 × g for 15 min to remove mitochondria from cytosolic fraction. The crude mitochondrial fraction was

washed and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 5 min. The pellets were collected as the mitochondrial fraction and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until further use. Submitochondrial fractions were prepared as described previously [54]. All steps were carried out at  $4^\circ\text{C}$ . Mitochondrial extracts were freshly suspended in a lysis buffer (Sucrose 0.25 M, Tris-HCL pH7.4 0.1 M, EGTA 1 mM, PIC 1X) and water-soluble digitonin (Merck Millipore, MS, USA) was added on ice at a final concentration 0.1 mg of digitonin per milligram of mitochondrial protein. After 15 min incubation, extracts are centrifuged at  $9000 \times g$  for 10 min. The pellet containing inner mitochondrial fraction (inner mitochondrial membrane and matrix) and the supernatant containing external mitochondrial fraction (outer mitochondrial membrane and intermembrane space) were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until further use.

### Immunofluorescence staining

Cells were grown on coverslips in 12-well plates and stained with Mitotracker Red CMXRos (ThermoFisher, MS, USA), according manufacturer's protocol. Cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde during 20 min and then treated with Triton 0.1% during 10 min at room temperature. After a blocking step with 10% chicken serum, cells were washed in 1X PBS and probed for primary antibodies (incubated for 1 h each at room temperature) and secondary antibody (incubated for 1 h at room temperature with Hoechst 1/5000). Images were acquired with a confocal SP8 TCS Leica microscope.

### Intra-molecular disulfide bond in silico analysis

The existence of disulfide-bonds in ING2 protein was examined through an online tool DIANNA v1.1 based on a neural system prediction method [55]. The ING2 reference sequence used was NCBI NP\_001555.1 using FASTA format as an input.

### Mitochondrial structure and network analysis

Mitotracker Red CMXRos (ThermoFisher, MS, USA) was used for the mitochondrial network analysis as it reliably identifies mitochondria and is not affected by fixation procedure. Mitochondrial morphology was analyzed using the Mitochondrial Network Analysis tool (MiNA) [30], a macro tool developed for use with ImageJ software. Briefly, fluorescence images of individual cells (20 cells per conditions) were loaded into the program in tiff format. Images were prepared for analysis through the application of mask to sharpen the image and a median filter using a 2-pixel radius to remove spurious features. The image was then skeletonized using the Analyse Skeleton plugin included in the FIJI software. Outcome parameters values were

mitochondrial length, mitochondrial length per cluster and network branches for each experimental condition.

### Flow cytometry analysis

Detection of mitochondrial biomass and ROS production using flow cytometer in U2OS or A549 cells was performed according published protocol [56]. Briefly, living cells were treated with MitoSox Red (ThermoFisher, MS, USA) or Mitotracker Green (ThermoFisher, MS, USA) according to manufacturer's instructions. The cells were collected in glass tubes, PBS washed, and centrifuged at  $750 \times g$  for 7 min. Finally, propidium iodide was added to the samples (5 min incubation at room temperature) before analyzing them by flow cytometry in a BD FACSCanto II (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ, USA). Mitochondrial membrane permeability was assessed using JC-1 Assay kit (#M34152, ThermoFisher, MS, USA) in siRNA-treated U2OS cells, according manufacturer's instructions. Detection of the fluorescence signal of 488-nm-excited at 525/50 nm (green) and 585/42 nm (red) was performed using a BD FACSCanto II (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ, USA) flow cytometer. Results are expressed as fluorescence intensity ratio red/green relative to control.

### Electron microscopy

Conventional electron microscopy and immunoelectron microscopy were performed on U2OS cells, as previously described (see supplemental information for detailed protocol) [57, 58].

### Mitochondrial D-Loop immunoprecipitation (mtDIP) assay

We realized an adapted ChIP assay in order to detect the possible interaction between ING2 and mtDNA, as previously done for p53 (see supplemental information for details) [36]. Data are represented as percentage of input fold change ( $\% \text{ input} = 100 \times 2^{(\text{CT}_{\text{input}} - \text{CT}_{\text{mtDIP}})}$ ) in each experimental condition; CT refers to cycle threshold.

### Quantification of mitochondrial DNA (mtDNA) damage by long-range PCR

The estimation of DNA damage after oxidative stress was performed as previously described with few modifications (see supplementary information for details) [59, 60].

### Seahorse mitochondrial stress test analysis

Oxygen consumption rate (OCR) were measured in U2OS cells transfected with si-CT or si-ING2 in response to  $1 \mu\text{M}$

oligomycin A, 2  $\mu$ M fluoro-carbonyl cyanide phenylhydrazide (FCCP), and 0.5  $\mu$ M antimycin A with the XFe24 analyzer (Agilent Biosciences). Reagents were optimized using the Mito stress kit from Seahorse Bioscience (Agilent Biosciences) using the protocol and algorithm program in the analyzer, Mito Stress Test. U2OS cells were seeded on XFe24-well culture microplates at 70,000 cells per well and analyzed after 24 h.

## Statistical analyses

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 7.0a software (GraphPad software, San Diego, CA, USA) using the Student's unpaired, two-tailed *t* test for quantitative variable. Appropriate nonparametric tests were applied in case of non-normal distribution of the variables (values of  $p < 0.05$  (\*) and  $p < 0.01$  (\*\*)) were considered statistically significant).

**Acknowledgements** We thank S.Manié for his participation and the technical support. We thank the photonic facility of the Microscopy Rennes Imaging Center (MRic-Photonics) of Biosit, Université de Rennes 1. We thank Pr JA MacDonald and his team members as well as Pr K Riabowol (University of Calgary, Canada) for providing lentiviral vectors and technical support for the generation of the CrispR clones. AM was a recipient of a doctoral fellowship from La Ligue Contre le Cancer and Region Bretagne. C. Ricordel was a recipient of FHU Camin (CHU Rennes) doctoral fellowship and Nuovo-Soldati Foundation research grant. RP is supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). The work was supported by La Ligue Contre le Cancer (Grand Ouest), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Fondation pour la Recherche Médicale (FMR, DEQ20180339169), AIS Rennes Métropole, Biosit and Action Incitative Université de Rennes 1.

**Author contributions** CR, LC, AB, and RP conceived and designed the experiments. CR, AM, AB, AJ, LC, FJ, MT, and ABu performed the experiments. CR, LC, MT, and RP analyzed the data. RP, HL, BD, TG approved the manuscript and contributed to the financial support. CR and RP wrote the paper.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## References

- Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:685–98.
- Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell*. 2016;166:555–66.
- Zong W-X, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell*. 2016;61:667–76.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
- Sullivan LB, Chandel NS Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab*. 2014; 2. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17>.
- Satoh H, Moriguchi T, Takai J, Ebina M, Yamamoto M. Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis. *Cancer Res*. 2013;73:4158–68.
- Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, et al. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature*. 2003;424:561–5.
- Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med*. 2005;11:1306–13.
- Shiao YH, Resau JH, Nagashima K, Anderson LM, Ramakrishna G. The von Hippel-Lindau tumor suppressor targets to mitochondria. *Cancer Res*. 2000;60:2816–9.
- Hilgendorf KI, Leshchiner ES, Nedelcu S, Maynard MA, Calo E, Ianari A, et al. The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. *Genes Dev*. 2013;27:1003–15.
- Dantas A, Al Shueili B, Yang Y, Nabbi A, Fink D, Riabowol K Biological functions of the ING proteins. *Cancers*. 2019; 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11111817>.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry A-J, Côté V, Selleck W, et al. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell*. 2006;21:51–64.
- Larrieu D, Ythier D, Brambilla C, Pedoux R. ING2 controls the G1 to S-phase transition by regulating p21 expression. *Cell Cycle Georget Tex*. 2010;9:3984–90.
- Pedoux R, Sengupta S, Shen JC, Demidov ON, Saito S, Onogi H, et al. ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol*. 2005;25:6639–48.
- Archambeau J, Blondel A, Pedoux R Focus-ING on DNA integrity: implication of ING proteins in cell cycle regulation and DNA repair modulation. *Cancers*. 2019; 12. <https://doi.org/10.3390/cancers12010058>.
- Larrieu D, Ythier D, Binet R, Brambilla C, Brambilla E, Sengupta S, et al. ING2 controls the progression of DNA replication forks to maintain genome stability. *EMBO Rep*. 2009;10:1168–74.
- Guérillon C, Larrieu D, Pedoux R. ING1 and ING2: multifaceted tumor suppressor genes. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70:3753–72.
- Bose P, Thakur S, Thalappilly S, Ahn BY, Satpathy S, Feng X, et al. ING1 induces apoptosis through direct effects at the mitochondria. *Cell Death Dis*. 2013;4:e788.
- Steinmetz LM, Scharfe C, Deutschbauer AM, Mokranjac D, Herman ZS, Jones T, et al. Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet*. 2002;31:400–4.
- Ma Y, Yan R, Wan Q, Lv B, Yang Y, Lv T et al. Inhibitor of growth 2 regulates the high glucose-induced cell cycle arrest and epithelial-to-mesenchymal transition in renal proximal tubular cells. *J Physiol Biochem*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s13105-020-00743-3>.
- van Donselaar E, Posthuma G, Zeuschner D, Humbel BM, Slot JW. Immunogold labeling of cryosections from high-pressure frozen cells. *Traffic Cph Den*. 2007;8:471–85.
- Gabriel K, Milenkovic D, Chacinska A, Müller J, Guiard B, Pfanner N, et al. Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J Mol Biol*. 2007;365:612–20.
- Zhuang J, Wang P, Huang X, Chen X, Kang J-G, Hwang PM. Mitochondrial disulfide relay mediates translocation of p53 and partitions its subcellular activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:17356–61.



24. Backes S, Herrmann JM. Protein translocation into the intermembrane space and matrix of mitochondria: mechanisms and driving forces. *Front Mol Biosci.* 2017;4:83.
25. Vögtle F-N, Burkhardt JM, Rao S, Gerbeth C, Hinrichs J, Martinou J-C, et al. Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Mol Cell Proteom MCP.* 2012;11:1840–52.
26. He GHY, Helbing CC, Wagner MJ, Sensen CW, Riabowol K. Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol.* 2005;22:104–16.
27. Dabir DV, Hasson SA, Setoguchi K, Johnson ME, Wongkongkathep P, Douglas CJ, et al. A small molecule inhibitor of redox-regulated protein translocation into mitochondria. *Dev Cell.* 2013;25:81–92.
28. Abdrabou A, Brandwein D, Wang Z Differential subcellular distribution and translocation of seven 14-3-3 isoforms in response to EGF and during the cell cycle. *Int J Mol Sci.* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21010318>.
29. Gong W, Russell M, Suzuki K, Riabowol K. Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression. *Mol Cell Biol.* 2006;26:2947–54.
30. Valente AJ, Maddalena LA, Robb EL, Moradi F, Stuart JA. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. *Acta Histochem.* 2017;119:315–26.
31. Szczepanowska J, Zabłocki K, Duszyński J. Influence of a mitochondrial genetic defect on capacitative calcium entry and mitochondrial organization in the osteosarcoma cells. *FEBS Lett.* 2004;578:316–22.
32. Marusich MF, Robinson BH, Taanman JW, Kim SJ, Schillace R, Smith JL, et al. Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1362:145–59.
33. Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, et al. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature.* 2006;442:96–99.
34. Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JM, Costantino S, Hancock MA, Grutter P, et al. The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell.* 2007;18:3225–36.
35. Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, et al. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 2006;440:637–43.
36. Achanta G, Sasaki R, Feng L, Carew JS, Lu W, Pelicano H, et al. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J.* 2005;24:3482–92.
37. Wang YE, Marinov GK, Wold BJ, Chan DC. Genome-wide analysis reveals coating of the mitochondrial genome by TFAM. *PLoS One.* 2013;8:e74513.
38. Mouche A, Archambeau J, Ricordel C, Chaillot L, Bigot N, Guillaudeux T, et al. ING3 is required for ATM signaling and DNA repair in response to DNA double strand breaks. *Cell Death Differ.* 2019;26:2344–57.
39. Weckbecker D, Longen S, Riemer J, Herrmann JM. Atp23 biogenesis reveals a chaperone-like folding activity of Mia40 in the IMS of mitochondria. *EMBO J.* 2012;31:4348–58.
40. Longen S, Woellhaf MW, Petrungraro C, Riemer J, Herrmann JM. The disulfide relay of the intermembrane space oxidizes the ribosomal subunit mrp10 on its transit into the mitochondrial matrix. *Dev Cell.* 2014;28:30–42.
41. Edwards R, Gerlich S, Tokatlidis K. The biogenesis of mitochondrial intermembrane space proteins. *Biol Chem.* 2020;401:737–47.
42. Lee SR, Han J. Mitochondrial nucleoid: shield and switch of the mitochondrial genome. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:e8060949.
43. Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, et al. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell.* 2003;114:99–111.
44. Rosivatz E, Woscholski R. Removal or masking of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate from the outer mitochondrial membrane causes mitochondrial fragmentation. *Cell Signal.* 2011;23:478–86.
45. Dar S, Chhina J, Mert I, Chitale D, Buekers T, Kaur H, et al. Bioenergetic adaptations in chemoresistant ovarian cancer cells. *Sci Rep.* 2017;7:8760.
46. Lehuédé C, Dupuy F, Rabinovitch R, Jones RG, Siegel PM. Metabolic plasticity as a determinant of tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2016;76:5201–8.
47. Pile LA, Spellman PT, Katzenberger RJ, Wassarman DA. The SIN3 deacetylase complex represses genes encoding mitochondrial proteins: implications for the regulation of energy metabolism. *J Biol Chem.* 2003;278:37840–8.
48. Ythier D, Larrieu D, Binet R, Binda O, Brambilla C, Gazzeri S, et al. Sumoylation of ING2 regulates the transcription mediated by Sin3A. *Oncogene.* 2010;29:5946–56.
49. Zhang J-T, Wang D-W, Li Q-X, Zhu Z-L, Wang M-W, Cui D-S, et al. Nuclear to cytoplasmic shift of p33(ING1b) protein from normal oral mucosa to oral squamous cell carcinoma in relation to clinicopathological variables. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134:421–6.
50. Zhu Z-L, Yan B-Y, Zhang Y, Yang Y-H, Wang Z-M, Zhang H-Z, et al. Cytoplasmic expression of p33(ING1b) is correlated with tumorigenesis and progression of human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2013;5:161–6.
51. Wang Y, Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of nuclear ING3 expression in human cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13:4111–6.
52. Li X, Nishida T, Noguchi A, Zheng Y, Takahashi H, Yang X, et al. Decreased nuclear expression and increased cytoplasmic expression of ING5 may be linked to tumorigenesis and progression in human head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136:1573–83.
53. Guérillon C, Bigot N, Pedoux R The ING tumor suppressor genes: Status in human tumors. *Cancer Lett.* 2013. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.016>.
54. Pallotti F, Lenaz G. Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines. *Methods Cell Biol.* 2007;80:3–44.
55. Ferrè F, Clote P. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:W182–W185.
56. Puleston D. Detection of mitochondrial mass, damage, and reactive oxygen species by flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015;2015:pdb.prot086298.
57. Tokuyasu KT. A technique for ultracytometry of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol.* 1973;57:551–65.
58. Nicolle O, Burel A, Griffiths G, Michaux G, Kolotuev I. Adaptation of cryo-sectioning for IEM labeling of asymmetric samples: a study using *Caenorhabditis elegans*. *Traffic Cph Den.* 2015;16:893–905.
59. Quispe-Tintaya W, White RR, Popov VN, Vijg J, Maslov AY. Fast mitochondrial DNA isolation from mammalian cells for next-generation sequencing. *BioTechniques.* 2013;55:133–6.
60. Furda A, Santos JH, Meyer JN, Van Houten B. Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. *Methods Mol Biol.* 2014;1105:419–37.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### Supplementary material and methods

#### **pcDNA3.1 vectors coding ING2 truncated-mutant**

We used pcDNA3.1 vector coding different ING2 truncated proteins previously generated in our lab:  $\Delta$ 140,  $\Delta$ 204 and  $\Delta$ 147 (Ythier D et al, Oncogene 2010). We generated ING2  $\Delta$ NLR,  $\Delta$ REASP and  $\Delta$ NCR from pcDNA 3.1-ING2 using sites specific primers and subcloning into the pcDNA3.1 vector between XbaI (ING2 $\Delta$ NLS,  $\Delta$ REASP) or ClaI ( $\Delta$ NCR) restriction site. Every ING2 constructs was verified by nucleotide sequencing.

#### **CRISPR-Cas9 generation.**

The CrispR-Cas9 plasmid lentiCRISPRv2 (ZhangLab) was provided by Dr. JA MacDonald (University of Calgary, Canada). The gRNAs against specific sequences in the ING2 gene were manually designed based on ING2 gene reference sequence (NCBI NC\_000004.12) : 5'-CAC-CGG-CAG-CAG-CAA-CTG-TAC-TCG-T-3'(sens) and 5'-AAA-CAC-GAG-TAC-AGT-TGC-TGC-TGC-C-3' (anti-sens). Oligonucleotides were annealed and ligated into the plasmid lentiCRISPRv2. As a control, a non-modified lentiCRISPRv2 (no gRNA inserted) was used for next steps. HEK293T cells were cotransfected with lentiCRISPRv2 (7.5 ug), pCMV-VSVG (2.6 ug) and psPAX2 (4.9 ug) with PolyJet Reagent (SigmaGen Laboratories) to generate lentivirus according to the manufacturer's protocol. After 48 hours, medium supernatant was collected, filtered and immediately stored at -80°C. Lentiviral suspension was added in the culture medium of A549 cells, then the culture medium was changed after 24h. Puromycin (5  $\mu$ g/mL) (Sigma Aldrich) was added 3 days after transduction to apply antibiotic selection. Several clones devoid of ING2 and a control clone with an unaltered expression of ING2 were acquired. We confirmed ING2 expression in two A549 CrispR-ING2 cell clones (#1 and #2) and one CrispR-CT control clone by western blotting (Supplemental Fig.3A).

#### **Western blot**

Whole cell protein extracts were prepared for immunoblotting by cell lysis with RIPA buffer (#9806, Cell Signaling, MA, USA) in combination with a protease inhibitor cocktail (#5871, Cell Signaling, MA, USA). Protein samples were subjected to electrophoresis using the NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gels Electrophoresis system (# NP0329BOX, Invitrogen). Mitochondrial extracts were lysed in TBS-CHAPS 2% (#28299, Sigma Aldrich) in

combination with a protease inhibitor cocktail (#5871, Cell Signaling, MA, USA). For the immunoprecipitation assays, FLAG-ING2 or FLAG-Ø transfected U2OS cells were lysed in Pierce IP lysis buffer (#87787, ThermoScientific) with a protease inhibitor cocktail (#5871, Cell Signaling, MA, USA), on ice for 5 minutes with periodic mixing. Then protein extracts were incubated with Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (#8823, Merck Millipore, MS, USA), according manufacturer's instructions. Supernatant was recovered and stored at -20°C for further analysis. After this, Anti-FLAG M2 Magnetic beads were first washed with IP lysis buffer and three times in 1XPBS + 0,01% Tween 20, then incubated at room temperature for 20 min with gentle rotation at 4°C. Finally, the beads were eluted and subjected to electrophoresis. See supplemental information for antibodies used in this study. Western blots pictures were obtained with a Gbox imager (Syngene, UK) and were quantified using ImageJ software. Results display the amount of protein of interest normalized on loading control. Data are represented as percentages.

#### **List of antibodies for western blot**

The antibodies used in this study were: COX IV (#4850), p53 (#2524) from Cell Signaling; mtSSB (ab74710), VDAC (ab15895), total OXPHOS human antibody Cocktail (ab110411) from Abcam; mSin3A (sc-5299),  $\alpha$ -Tubulin (sc-5286), Bak (sc-517390), DNA polymerase  $\gamma$  (sc-390634), TFAM (sc-376672), 14-3-3 $\eta$  (sc-17286) from SantaCruz;  $\beta$ -actin (A5441) and anti-FLAG (F3165) from Sigma Aldrich. The anti-ING1 mouse antibody (mix cab) is a kind gift from K.Riabowol's lab (University of Calgary, Canada). The anti-ING2 antibody used in this study is a rat monoclonal antibody (clone 14H3D2) (Larrieu D. et al, Cell Cycle. 2010) provided by O. Gozani (University of Stanford, USA).

#### ***In vitro* GST Pull-Down assay**

GST Pull-Down experiment was performed with the MagneGST™ Pull-Down System (#V8870, Promega ; Madison, WI, USA). ING2 protein was translated in vitro using the TnT® T7 Quick Master Mix using unlabeled Methionine. MagneGST™ Glutathione particles were resuspended in Binding/Wash Buffer and washed 4 times. MagneGST™ Glutathione was incubated with 2  $\mu$ g of GST control or recombinant protein GST-TFAM (#H00007019-P01, Abnova ; Taipei, Taiwan) in Binding/Wash Buffer for 30 min at room temperature with gentle mixing. After 5 washes, 20  $\mu$ L of ING2 translated product was incubated with GST-TFAM and MagneGST™ Glutathione in Binding/Wash Buffer for 1 hour at room temperature with gentle mixing. MagneGST™ Glutathione was washed five

times in Binding/Wash Buffer, SDS sample buffer was added and lysates were boiled before loading on western blot gel.

### **Mitochondrial morphology**

Immunofluorescence images of si-RNA treated U2OS labeled with Mitotracker Red CMXRos (ThermoFisher, MS, USA) were analyzed for mitochondrial shape according to previously established classification (Ahmad T et al, Cell Death Dis 2013). A mitochondrial shape was considered predominant in a cell if more than 50% of the labeled mitochondria show a typical tubular, donut or blob appearance. At least 100 individual cells were considered per experimental condition.

### **Electron microscopy**

For conventional electron microscopy, U2OS cells were rinsed with 0.15 M sodium cacodylate and fixed by adding 2.5% glutaraldehyde for 1h. After fixation, the cells were rinsed several times with 0.15 M sodium cacodylate and post-fixed with 1.5% osmium tetroxide for 1h. After further rinsing, the samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol (50, 70, 90 and 100% v/v) and then gradually infiltrated with increasing concentrations of epoxy resin (30, 50,70% v/v in ethanol). The samples were incubated overnight in pure epoxy resin before polymerization *en bloc* at 60°C for 48h. Ultra-thin sections of 80 nm were then cut from the blocks using a UCT ultramicrotome (Leica), placed on grids, and post-stained with uranyl acetate and with lead citrate. For immunoelectron microscopy, cells were centrifuged for 5 min at 800xg, recovered and rapidly fixed in 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 4h, as previously described. The cells were rinsed in PB and suspended in gelatin at 37°C for 10 min. After solidification on ice, the cell blocks were cut and immersed in 2.3 M sucrose at 4°C overnight. The blocks were then mounted on a pin holder and placed in a UC7 cryoultramicrotome (Leica). Rapid trimming was performed using a 90°C trim tool (DTB20, Diatome AG) at -80°C to determine a region of interest. Ultrathin cryosections (70-90 nm) were cut at -120°C using a dry diamond knife (DCIMM 3520, Diatome AG), picked up with a mixture (1:1 v/v) of 2.3 M sucrose and 2% wt/vol methylcellulose and transferred to formvar-coated copper or nickel grids. The grids were subjected to standard immunolabeling procedures (Nicolle O, et al. Traffic Cph Den 2015), before a final contrast on ice with a mix of 2% methylcellulose and 4% uranyl acetate in a ratio of 8:2. The primary and secondary antibodies used are respectively rat monoclonal anti-ING2 (14H3D2 clone) antibody and

protein A Gold (10nm) (CMC, Netherlands). The grids used for electron microscopy were examined at 120 kV with a JEOL 1400 transmission electron microscope equipped with an SC 1000 camera (Gatan Orius). The images obtained were loaded in the ImageJ software for further analysis.

### **List of primers**

The primers used in this study were : U6-Fwd: CTC-GCT-TCG-GCA-GCA-CA; U6-Rev: AAC-GCT-TCA-CGA-ATT-TGC-GT; ARN16S-Fwd: ACC-TAA-CAA-ACC-CAC-AGG-TCC; ARN16S-Rev: ACA-TCG-AGG-TCT-AAA-CCC-T; ND2-Fwd: AAA-CCA-AAC-CCA-GCT-ACG-CA; ND2-Rev: GGA-GAG-GAG-GGT-GGA-TGG-AA; COII-Fwd: ACC-TTT-CAT-GAT-CAC-GCC-CT; COII-Rev: GAG-GGA-TCG-TTG-ACC-TCG-TC; ATP6-Fwd: ATG-AGC-GGG-CAC-AGT-GAT-TA; ATP6-Rev: ATA-TTG-CTA-GGG-TGG-CGC-TT; ATP8-Fow: ATG-GCC-CAC-CAT-AAT-TAC-CCC; ATP8-Rev: GGC-AAT-GAA-TGA-AGC-GAA-CAG; ING2-Fwd: CGT-GCC-CTC-TCG-AGC-GGC-TGC-GGG-GTC; ING2-Rev: CAA-AGT-ACA-ACA-ACT-TTT-AAT-ACA-CC; ShortF-Fwd: TGT-CTG-CAC-AGC-CAC-TTT-CCA; ShortF-Rev: GAA-CGG-GGA-TGC-TTG-CAT-GT; LongF-Rev : GAT-ATT-GCT-AGG-GTG-GCG-CT; UTERM-Fwd: AAG-CGC-CTT-CCC-CCG-TAA-AT; UTERM-Rev: CCA-TTG-CGA-TTA-GAA-TGG-GTA-CAA; Dloop2-Fwd: CAA-GTA-CAG-CAA-TCA-ACC-CTC; Dloop2-Rev: GAC-GAG-AAG-GGA-TTT-GAC-TGT; Dloop3-Fwd: ; CCA-CCA-TCC-TCC-GTG-AAA-TC; Dloop3-Rev: GAC-CCT-GAA-GTA-GGA-ACC-AG; ARN12S-Fwd: GAA-CAA-GCA-TCA-AGC-ACG-CA; ARN12S-Rev: TGG-GGA-GGG-GGT-GAT-CTA-AA.

### **Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)**

Total RNA was isolated from U2OS cells by NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, UK) and then reversely transcribed into cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). cDNA was analyzed with B-R SYBR Green SuperMix (Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA) in StepOnePlus™ system (Applied Biosystems) (see supplemental information for qPCR primers sequence). Relative quantification in qPCR was performed using  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (threshold cycle value) for calculation of fold change with U6 as control. Quantification of mitochondrial DNA was assessed by the expression of mtDNA copy number relative to nuclear DNA using the qPCR method as described by Pfaffl (Pfaffl MW. Nucleic Acids Res 2001). Results were expressed as a ratio of mtDNA/gDNA relative to the experimental control condition.

### **Quantification of mitochondrial DNA (mtDNA) damage by long-range PCR**

First, mtDNA was extracted using miniprep kit (GeneJET PCR Purification Kit; Thermo Scientific, MS, USA) from mitochondrial extracts from si-RNA treated U2OS cells. MtDNA integrity was measured by the relative amplification efficiency of a 6.141-kb mtDNA fragment compared to a 454 bp mtDNA fragment, using dedicated. PCR products were separated in 2% agarose gel, and visualized with SYBR Safe (Thermo Scientific, MS, USA) staining. Quantitation was performed with ImageJ software.

### **Mitochondrial D-Loop Immunoprecipitation (mtDIP) assay**

Mitochondria were isolated from FLAG-ING2 or FLAG-Ø transfected U2OS cells and incubated with 1% formaldehyde for 30 min and then the crosslinking reaction was stopped by addition of 125 mM glycine. After a washing step, samples were sonicated (3cycles : 30sec on/30sec off), incubated in an ice-bath for 3 min. One-tenth of the samples were used as input and the remaining supernatant were diluted in IP buffer (1:4; 20 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% NP-40, 0.5% Triton X-100 with protease cocktail inhibitors). Diluted samples were incubated at 45°C for 30 min, and incubated with FLAG-M2 antibody (2 µg), TFAM antibody (2µg) or nonspecific IgG on a rotating shaker at 4°C overnight. Protein G-conjugated agarose beads were added and incubated on a rotating shaker at 4°C for 1 h. The beads were pulled down, and washed sequentially with the following buffers: buffer I (20 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100), buffer II (buffer I containing 500 mM NaCl), buffer III (10 mM Tris, pH 8.0, 0.25 M LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% deoxycholate), and buffer IV (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). Both the input control samples and the immunoprecipitated samples were incubated with elution buffer (1% SDS, 0.1 M sodium bicarbonate) at 65°C for 15 min, centrifuged at 2000 g for 5 min. The crosslinking was reversed by incubation of the samples with 20 µl of 5 M NaCl at 65°C during 6h. The samples treated with proteinase K (2 mg/ml) at 45°C for 1 h and DNA was extracted using a phenol–chloroform–isoamyl alcohol, followed by ethanol precipitation. The purified DNA was dissolved in water and used for qPCR to detect the presence of mtDNA, using primers specific for mtDNA (see list above).

### **Colony formation assay**

CrispR-CT, CrispR-ING2#1 and CrispR-ING2#2 A549 clones were exposed to Metformin (vehicule, 0.1 mM, 1 mM, 10 mM) and 2-DG (vehicule, 0.1 mM, 1 mM, 10 mM) for 7 days under culture basal condition (37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>) to allow colony formation. Then, cells were fixed with PFA 2% for 10 minutes then exposed to Cristal Violet

for 15 minutes to allow colony count (colonies with 50 cells or more were considered for counting). Plating efficiency calculation for each cell lines was used to normalize the surviving fraction, as previously described (Franken NAP, et al. Nat Protoc 2006).

### **ATP production in culture cells**

CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega) was used to estimate ATP production in A549 CrispR-CT and A549 CrispR-ING2#1 cells, according manufacturers instruction. Cells were seeded in 96-well plates under basal culture condition. CellTiter-Glo reagent was added in each well (1:1 v/v). Then, plates were mixed for 2 minutes on an orbital shaker and incubated at room temperature for 10 minutes. Luminescence was measured using an Infinite200Pro analyzer (Tecan, Männedorf, Switzerland).

### **Yeast strains culture**

Wild-type and PHO23 deleted strains used in this study are in the BY4741 background and were obtained from the EUROSCARF collection (Frankfurt, Germany). Culture of yeast on fermentable (YPD medium contain glucose) and non-fermentable (YPG medium contain glycerol) substrate was assessed by drop test. In the YPG condition, yeasts require effective oxidative phosphorylation in mitochondria to generate energy. Five-fold serial dilutions of exponentially growing cultures of the indicated strains were prepared in a sterile 96-well plate with the highest concentration being  $5 \times 10^6$  cells/ml. Cells were then spotted on either YPD or YPG media. All plates were then incubated at 30°C for two days on YPD medium or 5 days on YPG medium, and photographed.

### **IEM quantification**

Counting of nanogold beads was performed by an investigator blinded for the different experimental condition. At least 10 independent areas, defined as 80x80 pixels square, applied respectively on cytoplasm, mitochondrial and nuclear structure identified on IEM images (x15000) were used for quantification. Results were represented with box and whiskers plot.

### **Nuclear protein extraction from cultured cells**

Nuclear protein extraction was performed on U2OS cells after treatment with increasing concentration of glucose oxidase or vehicle for 24h, using NE-PER kit (Thermo Scientific; MS, USA) and according manufacturer recommendation.

**Supplementary Figure Legends:****Supplemental Figure 1:**

(A) Western blot analysis of whole cell and mitochondrial extracts from untransfected A549 cells and probed with the indicated antibodies.

(B) Immunofluorescence analysis of hTERT-immortalized MRC5 cells. Cells were probed for ING2, labelled with Hoechst and DNA polymerase  $\gamma$ .

(C) Immunofluorescence analysis of U2OS cells transfected with an increasing amount of FLAG-ING2. Cells were probed as indicated for ING2, FLAG tag and labelled with Hoechst and Mitotracker.

(D) Representative immuno electron microscopy images from cryosectioned U2OS cells and labelled with ING2 (left panel). Quantification of beads relative to the area of interest in the ING2 and DNA-polymerase  $\gamma$  experimental condition of immuno electron microscopy images (Nu: Nucleus; M: mitochondria; black bar; 500nm)

**Supplemental Figure 2:**

(A) Schematic representation of ING2 wild-type and ING2-truncated mutant sequences (left panel). Western blot analysis of mitochondrial extracts from U2OS cells transfected with respective vectors: FLAG-ING2, FLAG-ING2 $\Delta$ 140, FLAG-ING2 $\Delta$ 204, FLAG-ING2 $\Delta$ 147, FLAG-ING2 $\Delta$ NLS, FLAG-ING2 $\Delta$ REASP and ING2 $\Delta$ NCR; then probed with the indicated antibodies (right panel).

(B) Western blot analysis of nuclear extracts from U2OS cells treated with indicated concentrations of glucose oxidase during 24 hours and probed with the indicated antibodies (- : vehicule; + : 50 mUI/ml ; ++ : 100 mUI/ml ).

(C) Western blot analysis of whole cell and mitochondrial extracts from U2OS cells treated with MB-6 using increasing concentrations for 24 hours. Protein extracts were probed with the indicated antibodies.

**Supplemental Figure 3:**



(A) Western blot analysis of whole cell extracts from Si-CT or Si-ING2 treated U2OS cells and probed with the indicated antibodies (left panel). Western blot analysis of whole cell extracts from CrispR-CT, CrispR-ING2#1 and CrispR-ING2#2 generated clones (right panel). Protein extracts were probed with the indicated antibodies.

(B) Histograms showing percentage of predominant mitochondrial shape in 100 individual si-CT or si-ING2 treated U2OS cells based on mitotracker green immunofluorescence analysis from three independent biological replicates (right panel ; ns: non-significant).

(C) Representative immunofluorescence analysis of CrispR-CT or CrispR-ING2 A549 clones processed with MiNa software (left panel). Histogram showing MiNA outcome parameters evaluated on 20 individual cells in each condition. Bars represent mean $\pm$ SD (right panel ; ns: non-significant; \*\*:p<0,01).

#### **Supplemental Figure 4:**

(A) Immunoprecipitation of exogenous HA tag in FLAG-ING2 and/or HA-Twinkle transfected U2OS cells. Proteins were detected using the indicated antibodies. Actin and IgG light chain (IgG LC) were used as loading control for the input and the IP respectively. (mtSSB: mitochondrial stranded DNA-binding protein)

(B) Western blot analysis of GST-pulldown *in vitro* assay with TFAM and ING2 GST-tagged recombinant proteins. Proteins were detected using the indicated antibodies.

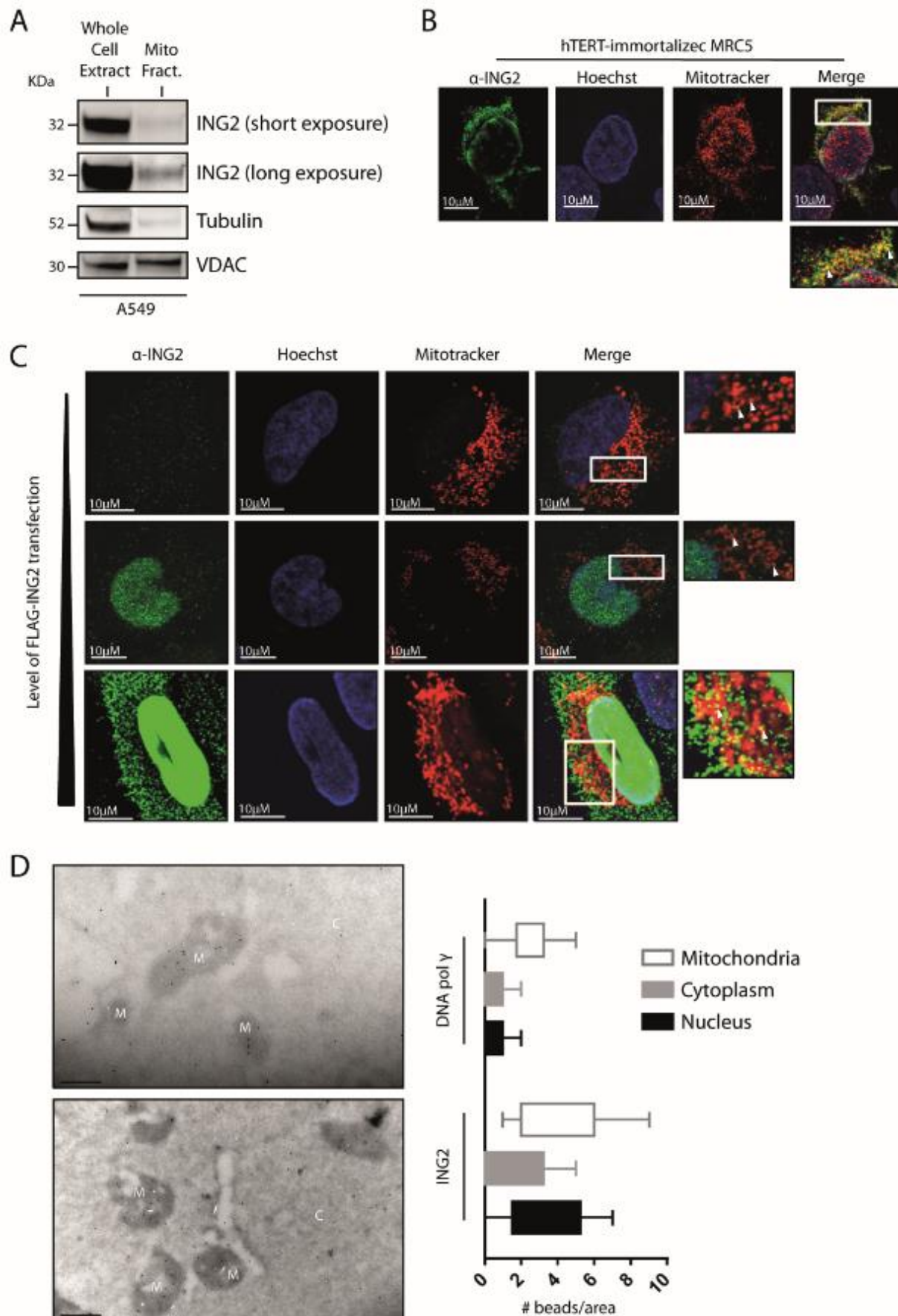
(C) Agarose gels showing representative example of mtDNA amplicons resulting for mtDIP assay (DLoop2 in the picture). The signal in the TFAM lane represents the positive control and Ns-IgG the negative control of the immunoprecipitation step.

#### **Supplemental Figure 5:**

(A) Wild type (WT) and mutant strains deleted for PHO23 ( $\Delta$ pho23) were culture in YPD (fermentable substrate) or YPG medium (non-fermentable substrate) for respectively two and five days. Figure shows representative plates of three independent replicates.

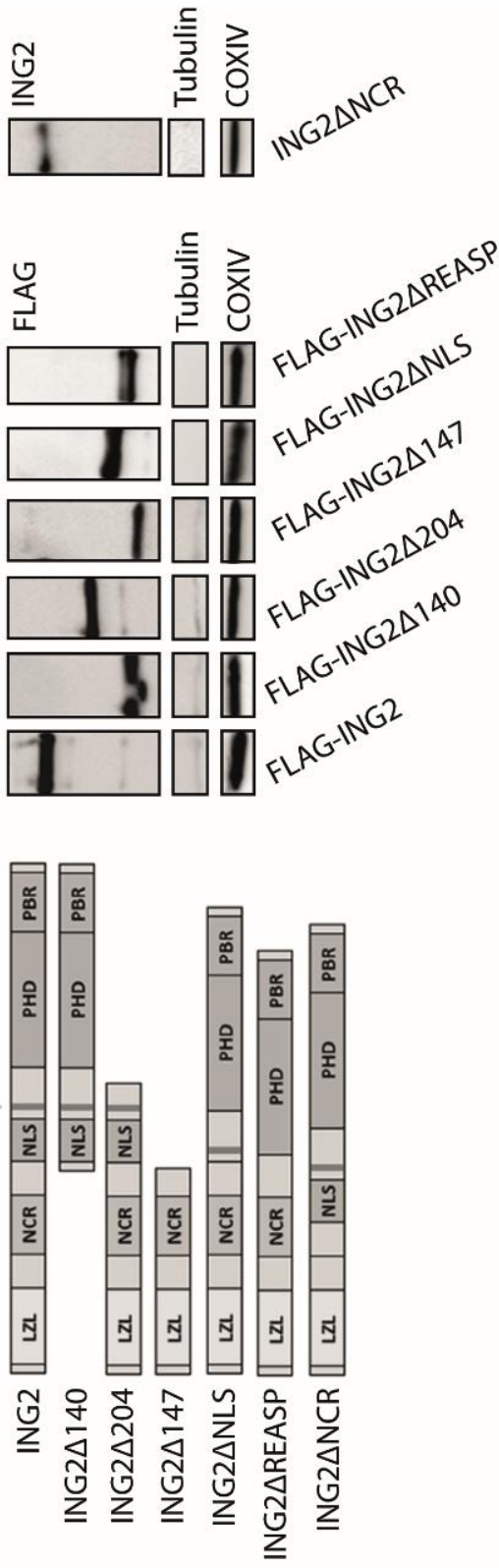
(B) Histograms showing relative luminescence of CrispR-CT and CrispR-ING2 A549 clones after 48h under standard culture condition from three independent replicates. Bars represent mean $\pm$ SD (ns : non-significant).

Supplemental Figure 1

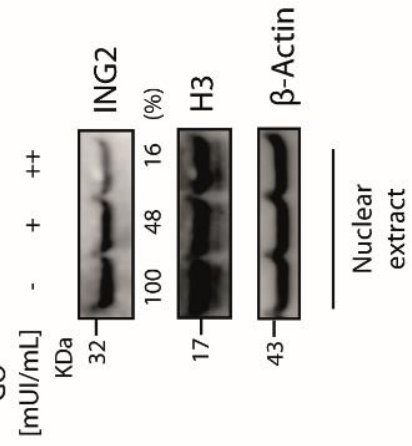


# Supplemental figure 2

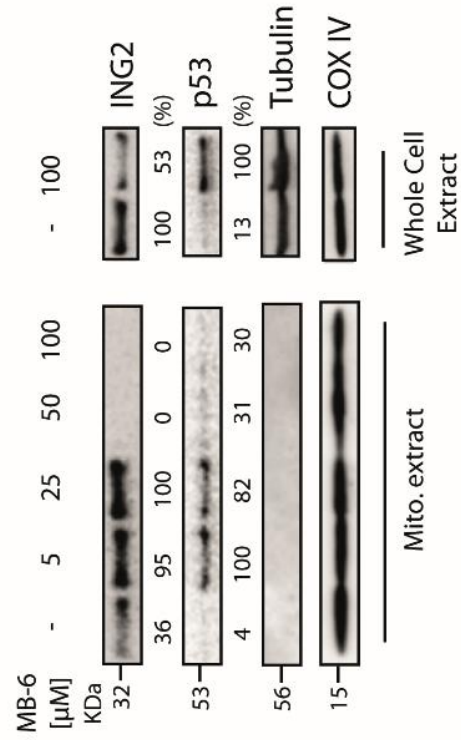
A



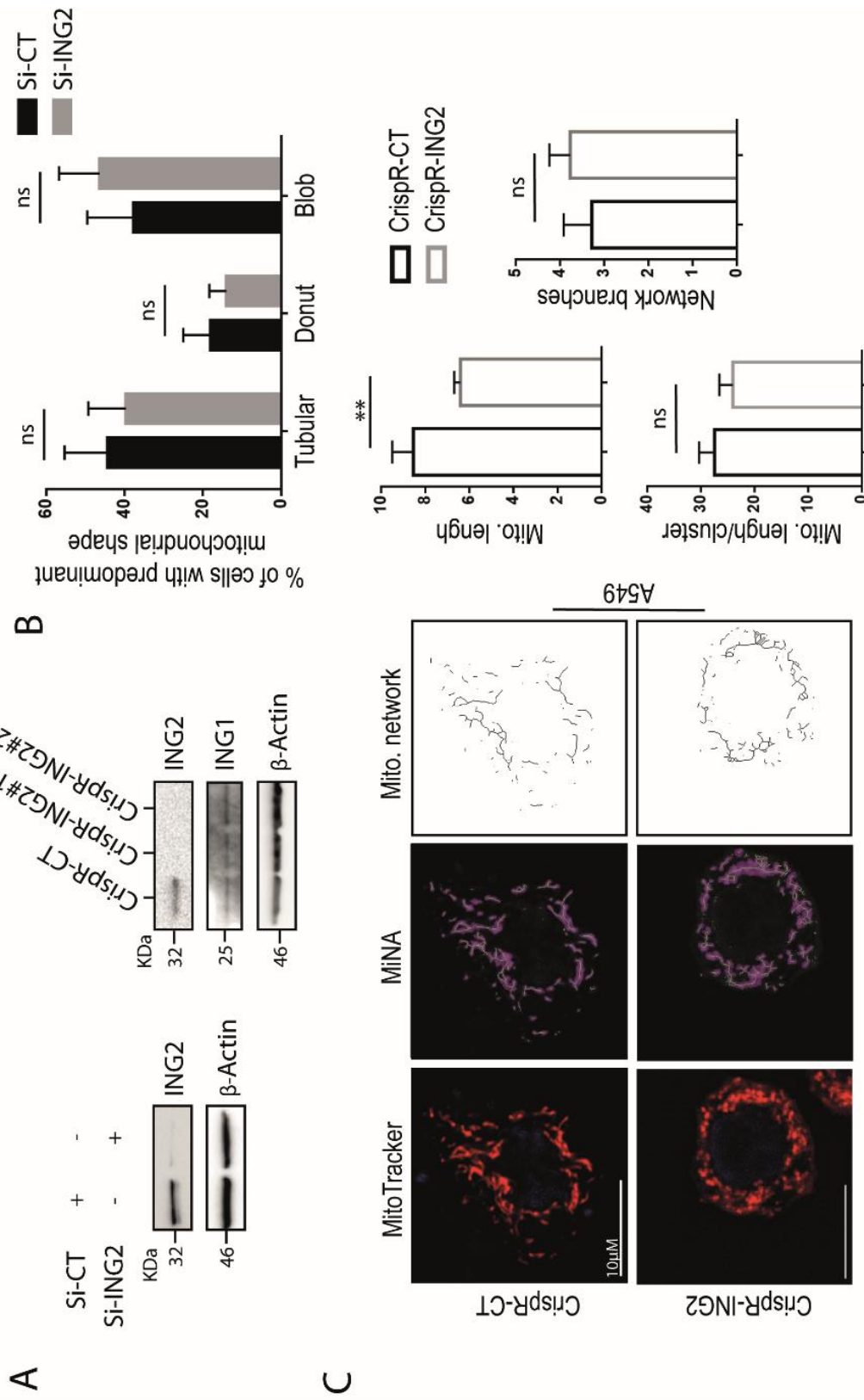
B



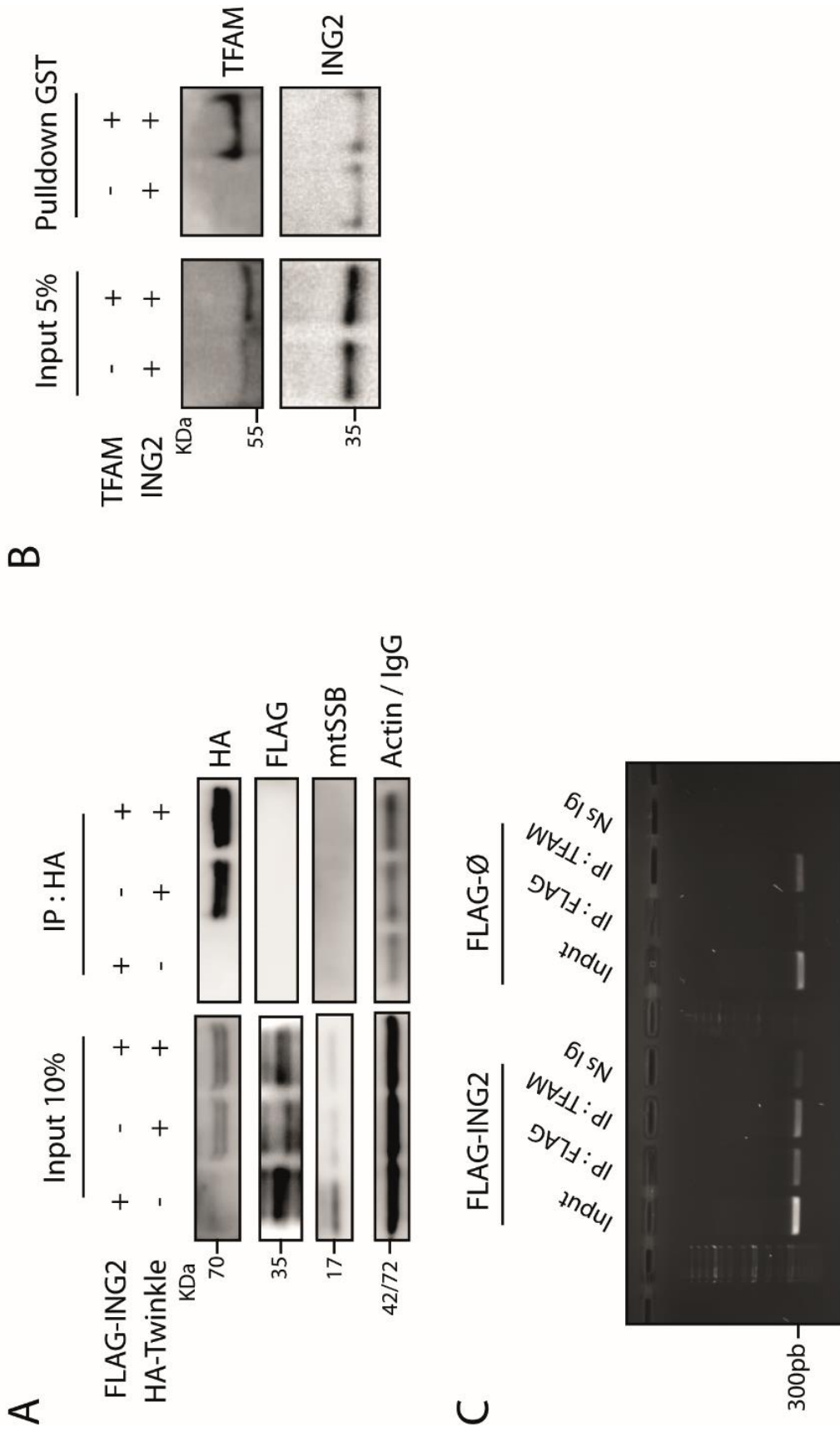
C



Supplemental Figure 3

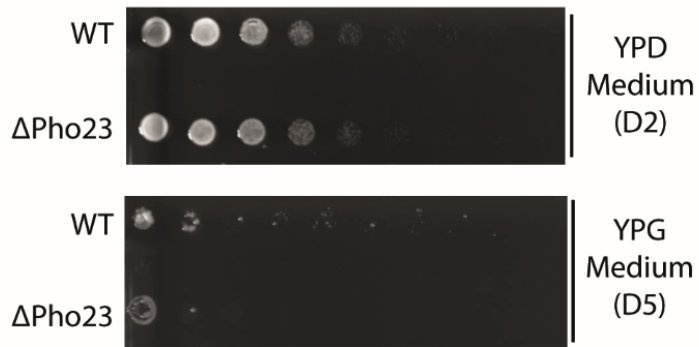


# Supplemental Figure 4

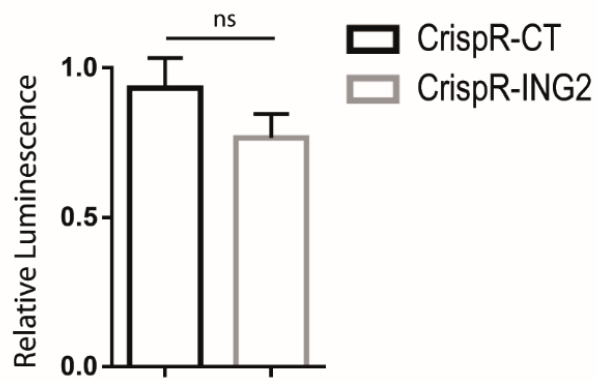


## Supplemental Figure 5

**A**



**B**



## 2 ARTICLE N°2

**Expression de la protéine ING2 dans les différents compartiments cellulaires et identification de nouvelles opportunités thérapeutiques dans le cancer bronchique non à petites cellules.**

---

**Subcellular expression of ING2 protein identifies new therapeutic vulnerabilities in non-small cell lung cancer**

Charles Ricordel, Angela Chan, Michelle Dean, Subash Thalappilly, Nancy Nixon, Doha Itani, Jérôme Archambeau, Benoit Desrues, Rémy Pedeux, Gwyn Bebb, Karl Riabowol

**Communication au congrès AACR–RAS-Driven Cancers, San Diego, USA, 2018**

## Résumé des résultats principaux

Le deuxième objectif de ma thèse a porté sur l'analyse de l'expression de la protéine ING2 dans une cohorte de patients porteurs d'un cancer bronchique non à petites cellules. Au cours d'une mobilité internationale dans le laboratoire du Pr Riabowol (University of Calgary, Annie Charbonneau Cancer Institute, Calgary, Canada), j'ai pu coordonner la réalisation d'une analyse quantitative et automatisée de l'expression de la protéine ING2 sur de plus de 400 échantillons. Cette analyse a ensuite servi de point de départ à l'exploration d'une hypothèse de vulnérabilité thérapeutique dépendante de l'expression d'ING2 dans le cancer bronchique non à petites cellules.

1- Le niveau d'expression de la protéine ING2 est hétérogène dans le cancer bronchique non à petite cellules et son rapport nucléo-cytoplasmique est un marqueur pronostique.

À l'aide d'une cohorte rétrospective de 427 patients atteints d'un cancer bronchique primitif traité chirurgicalement entre 2003 et 2010 au Tom Baker Cancer Center de Calgary (Glans-Look lung cancer database), nous avons étudié le niveau d'expression de la protéine ING2. Afin de s'affranchir des biais liés à la quantification immunohistochimique, nous avons choisi de mener une analyse quantitative, automatisée et contrôlée, du niveau d'expression de la protéine ING2 sur TMA (« Tissu-Micro Array »). Cette méthodologie nous a aussi permis de dissocier l'expression stromale ou tumorale, mais aussi nucléaire ou cytoplasmique de notre protéine d'intérêt. Comme attendu, l'expression de la protéine ING2 est à prédominance nucléaire dans les cellules tumorales ou adjacentes. Un signal d'expression cytoplasmique était fréquemment observé et son intensité positivement corrélée au niveau d'expression nucléaire. Une variabilité importante inter-tumorale de l'expression de la protéine ING2 a été constatée. Enfin, nous avons pu définir une valeur seuil du ratio nucléo-cytoplasmique de l'expression de ING2 au sein des cellules tumorales comme facteur pronostique potentiel. En effet, un rapport nucléo-cytoplasmique tumoral de l'expression de ING2 faible était associé à une plus courte survie globale (HR=1,34, p=0.034). La réciproque n'a pas été observée lorsque l'analyse de ce ratio était menée sur les cellules stromales. L'analyse en régression logistique a démontré que le sexe masculin et la survie globale <36 mois étaient significativement associés à un rapport nucléo-cytoplasmique faible de l'expression tumorale de ING2.



2- Le niveau d'expression de la protéine ING2 impacte la sensibilité à l'inhibition de WEE1 dans les lignées de cancers bronchiques.

Le Projet Achille est un criblage de vulnérabilité génétique dans les lignées tumorales humaines mené par le Broad Institute. Une partie de ce travail se base sur une technologie d'ARN interférence à l'échelle du génome entier par l'utilisation des petits ARN « en épingle à cheveux » (shRNA). À l'aide de l'une des bases de données issue de ce projet, nous avons pu identifier le gène *WEE1* comme l'un des gènes impactant significativement la prolifération cellulaire des lignées avec une faible expression d'ING2. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons sélectionné un panel de quatre lignées de cancers bronchiques non à petites cellules (A549, H322, H460 et H23) présentant différents niveaux d'expression d'ING2. L'effet antiprolifératif du MK-1775 (inhibiteur spécifique de l'activité kinase de WEE1) était inversement corrélé à l'expression d'ING2. De plus, par des approches fonctionnelles, nous avons démontré qu'une induction de l'expression d'ING2 diminuait la sensibilité des lignées au MK-1775. Inversement, l'inhibition de l'expression d'ING2 augmentait la sensibilité des lignées au MK-1775, corroborant l'hypothèse initiale.

3- La combinaison d'un inhibiteur de HDAC et d'un inhibiteur de WEE1 a un effet antiprolifératif synergique dans les lignées de cancer bronchiques.

L'inhibiteur d'histone déacetylase SAHA (vorinostat) inhibe l'interaction entre ING2 et les partenaires du complexe mSin3A/HDAC. Pour aller plus loin sur la compréhension du mécanisme par lequel la protéine ING2 module l'impact de l'inhibition de WEE1, nous avons formulé l'hypothèse qu'une inhibition de l'activité épigénétique d'ING2 par le SAHA potentialiserait l'effet antiprolifératif du MK-1775. En effet, nous avons pu observer dans chaque lignée testée un effet synergique entre le traitement par le SAHA et par le MK-1775 (modélisation *in silico* Compusyn). Ces données pharmacologiques suggèrent que l'impact d'une inhibition de WEE1 dépend de l'activité épigénétique de la protéine ING2. Nous avons montré que la combinaison thérapeutique SAHA et MK-1775 induit une augmentation du nombre de cellules en phase G<sub>1</sub> et en phase S ainsi qu'une majoration du nombre de cellules dont le contenu ADN est supérieur à 2n. Enfin, nous avons montré que l'expression du gène *CHEK1*, codant la protéine CHK1, principal activateur de WEE1, était sous le contrôle transcriptionnel d'ING2. L'inhibition pharmacologique de l'activité épigénétique d'ING2 ou la diminution expérimentale de son expression dans les lignées, induit une diminution l'expression protéique de CHK1. Une corrélation entre la transcription du gène *ING2* et *CHEK1* a été confirmée dans les bases de données indépendantes de la *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE).

#### 4- Proposition d'un nouveau modèle de vulnérabilité thérapeutique dépendant de l'expression de ING2

Au final, nous proposons pour la première fois un modèle de vulnérabilité thérapeutique dans des lignées cancéreuses dépendant de l'un des membres de la famille ING. Selon notre hypothèse, l'activité épigénétique d'ING2 régule l'expression du gène *CHEK1* à l'échelle transcriptionnelle. La perte de l'expression d'ING2 ou son inactivation par le SAHA, aboutit à une perte de l'expression de la protéine CHK1. Cela potentialise l'effet antiprolifératif de l'inhibiteur de WEE1 MK-1775. Sur le plan phénotypique, cette double inhibition induit une progression inadaptée des cellules tumorales dans le cycle cellulaire vers la catastrophe mitotique. Nos travaux révèlent donc une opportunité thérapeutique à explorer dans le cancer bronchique primitif, basée sur l'expression de la protéine suppressive de tumeur ING2.

## **Subcellular expression of ING2 protein identifies new therapeutic vulnerabilities in non-small cell lung cancer**

Charles RICORDEL<sup>1,2</sup>, Angela MY CHAN<sup>3</sup>, Michelle L DEAN<sup>3</sup>, Subash THALAPPILLY<sup>4</sup>, Nancy NIXON<sup>5</sup>, Doha ITANI<sup>6</sup>, Jérôme ARCHAMBEAU<sup>2</sup>, Benoit DESRUES<sup>1,2</sup>, Rémy PEDEUX<sup>2</sup>, Gwyn BEBB<sup>4,5</sup>, Karl RIABOWOL<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Department of Pulmonary Medecine, CHU Pontchaillou, Université de Rennes 1, Rennes, France.

<sup>2</sup> INSERM U1242, Chemistry Oncogenesis Stress and Signaling, CLCC Eugène Marquis, Université de Rennes 1, Rennes, France

<sup>3</sup> Precision Oncology Hub, Tom Baker Cancer Center, Calgary, Alberta, Canada.

<sup>4</sup> Arnie Charbonneau Cancer Institute, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada T2N 4N1.

<sup>5</sup> Department of Oncology, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.

<sup>6</sup> Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada

Corresponding author: Charles Ricordel, Service de Pneumologie, Hôpital Pontchaillou

2 Rue Henri Le Guilloux, 35033 RENNES, France

Phone: +33 (0)2 99 28 37 38

Fax: +33 (0)2 99 28 24 80

Mail: charles.ricordel@chu-rennes.fr

ORCID ID: 0000-0001-6160-2732

**ABSTRACT**

A number of studies have reported decreased expression levels of the ING2 epigenetic regulator in non-small cell lung cancer (NSCLC). Since ING2 mRNA levels do not represent protein levels accurately, we screened a large cohort of early resected NSCLC cases using a wide range of expression controls, to quantitate the nuclear and cytoplasmic expression of ING2 protein in all samples. Coherently with prior studies we find that NSCLC patients show a wide range of ING2 protein levels. Samples with high nucleo-cytoplasmic ratio of ING2 expression correlated positively with survival and served as an independent prognostic factor. Interrogation of the Project Achilles database identified the WEE1 protein kinase as an ING2-related genetic vulnerability. Co-inhibition and knockdown experiments in independent NSCLC cell lines confirmed that inhibition of ING2 acted synergistically with inhibition of WEE1 to reduce proliferation of cancer cell, but not primary fibroblast cell growth. ING2 controls CHK1 expression at the transcriptional level and might sensitizes tumors cells to WEE1 inhibition. Altogether, these results support the idea that the tumor suppressor protein ING2 is a potential new prognostic and therapeutic biomarker for NSCLC.

Keywords: ING2, non-small cell lung cancer, WEE1, CHK1, genetic dependencies

## INTRODUCTION

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the leading cause of cancer-related death in occidental countries (1). Despite recent therapeutic breakthroughs such as the approval of targeted therapies and immune checkpoint inhibitors, late stage NSCLC remains a disease with very poor prognosis (2,3). Beyond the inhibition of oncoproteins, recent preclinical studies have uncovered new therapeutic opportunities in NSCLC, based on the expression of tumor suppressor gene. For instance, deficiency in the *SMARCA4* tumor suppressor gene that encodes a mSWI/SNF complex subunit, predicts sensitivity to EZH2 inhibitor in multiple models of NSCLC (4). Similarly, *KEAP1* tumor suppressor gene deficiency has been shown to induce a metabolic dependency on glutaminolysis in *KRAS*-mutated NSCLC that can be targeted by specific inhibitors (5). These two examples emphasize the critical importance of further investigating tumor cell vulnerabilities based on tumor suppressor gene expression in a clinical setting where there is still unmet therapeutic needs.

The *ING* (INhibitor of Growth) gene family is comprised of five members (*ING1-5*) that have been extensively studied regarding their tumor suppressive functions over the last decades (6). The two first members of this family, *ING1* and *ING2* are core members of the mSIN3A/HDAC deacetylase complex and are recognized as chromatin-reader proteins (7). *ING2* has been implicated in type I and type II tumor suppressor functions, for its gatekeeper and caretaker roles in cell biology (8). Initially, *ING2* was reported to control the transcription of genes involved in critical cellular functions such as senescence and apoptosis, through chromatin acetylation remodeling (7,9). Moreover, *ING2* regulates expression of genes involved in cell cycle control (e.g. p21), controls the recruitment of PCNA to the replication fork and is therefore a critical regulator of genome stability (10,11). Several studies have suggested that localization of *ING* protein is important and that its translocation into the cytoplasm promotes tumorigenesis (12–14). As the *ING2* sequence contains the same REASP amino-acid motif that is responsible for *ING1* nucleocytoplasmic translocation (15), we hypothesized that a similar import mechanism could be deregulated in tumor cells. Previous studies have shown that *ING2* expression is mainly lost in cancer, notably in NSCLC (16). However, these studies were often based on less rigorously controlled immunohistochemistry performed on small cohorts. Furthermore, these studies did not explore the subcellular localization of the protein and usually did not restrict the analysis to the tumor cells included in the samples (17,18). Consequently, our first goal was to investigate the levels of *ING2* subcellular localization in a reproducible and unbiased manner using a large cohort of NSCLC

samples. Secondly, we sought to examine the genomic vulnerabilities induced by the variation of ING2 tumor suppressor protein expression in NSCLC, prioritizing clinically actionable biological targets.

Herein, using an automated quantitative immunohistochemistry analysis, we demonstrate that ING2 expression is highly variable in a large cohort of NSCLC samples. A clear impact of ING2 nuclear and cytoplasmic localization was observed on survival. We show that the ING2 nucleocytoplasmic ratio is a prognostic factor in early stage NSCLC. Next, we identified the *WEE1* gene that encodes a protein kinase that regulates the G2/M cell cycle transition, as a candidate gene inducing genetic dependency in cancer cell lines with low ING2 expression. We confirmed, using multiple functional approaches that sensitivity to WEE1 inhibition was modulated by ING2 expression in NSCLC cell lines with various genomic backgrounds. Pharmacological inhibition of ING2 chromatin remodeling abilities using HDAC inhibition promoted sensitivity to the WEE1 kinase inhibitor MK-1775. Mechanistically, we confirmed that ING2 controls the expression of the CHK1 protein, a protein kinase that directly controls WEE1 phosphorylation. This regulation occurs at the transcriptional level. Therefore, we have shown that ING2 down-regulation or its pharmacological inhibition, leads to an early transition into G2/M cell cycle phase, a mitotic defect that ultimately reduces tumor cell proliferation. Altogether, these results support the idea that the tumor suppressor protein ING2 is a potential new prognostic and therapeutic biomarker for NSCLC.

## RESULTS

### NSCLC Samples

A total of 436 patients were identified from the Glans Look database of whom 427 (98%) had sufficient and usable tissue for ING2 expression analysis. The characteristics of the patients are presented in Table 1. The cohort was composed of patients with a median age of 65 years-old, mainly smokers (82.4%) with predominantly adenocarcinoma histology (55.3%) and mostly were at TNM stage I-II disease (84.5%). As expected, a large majority of patients underwent surgical resection of the thoracic malignancy with a curative intent (92.3%). 39.8% and 34.2% of the total cohort, received adjuvant chemotherapy and radiotherapy respectively.

### ING2 expression in the NSCLC cohort

To confirm the specificity of the primary anti-ING2 antibody used in this study, we created FFPE blocks from cells that overexpressed ING2 using a PCI-ING2 plasmid or decreased levels using a stealth siRNA for ING2 in the A549 lung cancer cell line (Supplemental Fig1). We confirmed that ING2 expression in A549 cells decreased with the amount of stealth siING2 transfected and increased with the amount of PCI-ING2 plasmid transfected (Supplemental Fig1A and 1B). ING2 localization in NSCLC samples (Figure 1A) was predominantly nuclear, however, a clear cytoplasmic localization was also detected in the high expressing samples suggesting that when there is high ING2 expression, ING2 levels increased in the entire cell (Figure 1B). Interestingly, a linear correlation between ING2 nuclear and cytoplasmic levels was observed in tumor cells but also in surrounding stromal cells (Supplemental Fig1C), suggesting that subcellular localization in adjacent, but different cell types might be mechanistically linked. This was not an artefact of staining since internal control slides were included in all slides examined. Previous reports have shown that ING1 protein can translocate from the nucleus to the cytoplasm through an interaction with the 14-3-3 $\eta$  protein on its specific REASP motif (19). As this specific motif is conserved in the ING2 amino acid sequence (15), we speculate that the same mechanism could facilitate ING2 nucleocytoplasmic translocation. Mean levels of expression in tumor cells were significantly higher than in stromal cells identified by vimentin staining (Figure1C). Altogether, these results demonstrate that ING2 expression shows a high variability among tumors cells and that nuclear and cytoplasmic localization of ING2 are tightly correlated.

### Prognostic value of ING2 subcellular localization

According to previous studies in NSCLC (17), the overall expression level of ING2 in tumor samples was not associated with prognosis. Consistent with this, Kaplan-Meier analysis shows that the total level of ING2 expression in tumor cells does not correlate with survival in our cohort (Supplemental Fig2A). However, recent studies have identified potential new ING2 cytosolic tumor suppressor functions (8) and we observed a strong cytoplasmic localization of ING2 in the NSCLC samples. Since digital image analysis allows us to reproducibly quantify cytoplasmic and nuclear localization of a protein, we explored the prognostic value of ING2 in relation to its subcellular localization. A low ING2 nucleocytoplasmic ratio was associated with shorter overall survival (HR=1.34; 95% CI [1.02-1.76], p=0.034) (Figure 2A). This result did not translate into a benefit in progression-free-survival (HR=1.18; 95% CI [0.85-1.63]; p=0.32) (Figure 2B). ING2 localization impact on OS was specific to tumor cells, as a low ING2 nucleocytoplasmic ratio in stromal cells was not associated with a shorter survival (HR=1.12, 95% CI [0.85-1.47]; p=0.40) (Supplemental Fig2B). In order to investigate clinical characteristics associated with low ING2 nucleocytoplasmic ratio in our cohort, we performed logistic regression analysis (Table 2). We found a significant association with male gender, tumor size >3cm (T1 according TNM 8<sup>th</sup> edition) and overall survival of <36 months, according to univariate analysis. Male gender (HR=1.60; 95% CI [1.02-2.51], p=0.039) and overall survival <36 months (HR=2.32; 95% IC [1.33-4.04], p=0.002) remains statistically associated with a low ING2 nucleocytoplasmic ratio, in multivariate analysis. Interestingly, other historical prognostic factors associated with poor survival (age, lymph node involvement or relapse) were not associated with low tumoral ING2 nucleocytoplasmic ratio suggesting that ING2 localization may be an independent prognostic variable.

### **ING2 expression modulates sensitivity to WEE1 inhibition in NSCLC cells**

Next, we sought to identify genomic vulnerabilities associated with ING2 expression in tumors. Exploiting the Achilles genome-wide pooled shRNA screen (20), we identified several genes inducing a dependency in cancer cell lines with low ING2 expression (Figure 3A, top panel). Interestingly, among the top ranked genes we found *WEE1* that encodes a critical cell cycle checkpoint kinase (Figure 3A, lower panel). As a protein with kinase activity, WEE1 shows a highly actionable profile and many specific inhibitors have been already tested in early stage clinical trials including in lung cancers (21,22). Our team had previously shown that ING2 is involved in the G1-S phase transition by controlling p21 expression in cancer cell lines (10). In light of these findings, we postulated that ING2



expression could influence sensitivity of NSCLC cell lines to WEE1 inhibitors. Among a panel of lung cancer cell lines, we observed that low ING2 expression was correlated with a higher sensitivity to the WEE1 inhibitor MK1775 (previously known as AZD1775) with increased cell death being observed in the Alamar blue assay (Figure 3B). As expected, colony formation assays confirmed this result (Figure 3C). Plasmid-mediated induction of ING2 expression revealed a protective effect upon WEE1 inhibition (Figure 3D and Supplemental Fig 3A). In contrast, ING2 down-regulation with stealth-RNA tend to sensitize cells to WEE1 inhibitor (Figure 3E and Supplemental Fig3B). To check the robustness of these functional results, we reproduced the experiment using a different proliferation assay and in cell lines with different genomic backgrounds (Supplemental Figure 3C). Of note, p53 expression levels did not influence sensitivity to MK1775 in p53 doxycycline-inducible H1299 cells (Supplemental Fig3D). Taken together, these results demonstrate that lung NSCLC cell line proliferation and clonogenicity on WEE1 inhibition are influenced by the level of ING2 expression, independently of p53.

### **HDAC and WEE1 inhibitions show synergistic anti-proliferative effects in NSCLC cell lines**

To further examine the mechanisms by which ING2 regulates sensitivity to WEE1 inhibition in NSCLC, we used a pharmacological approach with suberoyl anilide hydroxamic acid (SAHA), also known as Vorinostat. This HDAC inhibitor is known to disrupt ING2 interaction with the mSIN3A/HDAC complex, abrogating its chromatin reading abilities and disrupting the specificity of histone deacetylation (23). We hypothesized that if ING2 epigenetic functions were involved, SAHA treatment would synergistically impair cell proliferation when associated with the WEE1 inhibitor. Indeed, we observed a clear decrease of cell proliferation *in vitro* upon HDAC1 and WEE1 dual inhibition in all NSCLC cell lines examined (Figure 4A). Interestingly, this effect was observed at the same magnitude in cell lines expressing high levels of ING2 that previously showed a more resistant phenotype to a WEE1 inhibition used as a single agent. Moreover, combinatory HDAC1 and WEE1 inhibition did not significantly decrease cell proliferation compared to single agent treatment in normal human lung fibroblasts, suggesting that normal lung tissue could be spared from drug-induced toxicities. Compusyn analysis categorized almost all the drug interactions as synergistic upon increasing concentrations of both inhibitors (Figure 4B), confirming our initial hypothesis. As expected from previous publications, HDAC inhibition induced a cell cycle arrest in G1 phase whereas WEE1 inhibition leads to a slippage of cells into G2 phase

(24). However, dual inhibition recapitulating both phenotypes was also associated with an increase in the number of cells with aberrant DNA amount ( $>$  than  $4n$ ) (Supplementary Fig4A). A recent study revealed a link between HDAC1/2 and the activity of the cell cycle kinase CHK1 through the regulation of PP2A phosphatase (24). Therefore, as ING2 is a core component of the mSIN3A/HDAC complex, we next wanted to explore the impact of SAHA treatment and ING2 down-regulation on *CHEK1* gene expression. SAHA treatment induced a decrease of both ING2 and CHK1 protein levels in a concentration-dependent manner (Figure 4C). This phenotype was also observed to an even greater degree upon ING2 down-regulation using stealth-RNA or Gapmer technology (Figure 4D). Interestingly, interrogation of the CCLE database analysis confirms the correlation between *ING2* and *CHEK1* mRNA, especially in lung cancer cell lines (Supplementary Figure 4B). The next step was to assess the relation between ING2 and CHK1 expression. Under our experimental conditions, SAHA treatment or ING2 down-regulation induced a decrease of *CHEK1* mRNA (Figure 4E and Figure 4F, respectively), demonstrating that ING2 controls CHK1 protein expression at the transcriptional level.

Based upon these observations we propose that ING2 down-regulation or its disruption from the mSIN3A/HDAC complex by SAHA, decreases transcription of the *CHEK1* gene in tumor cells and therefore compromises its inhibitory effect on the G2/M cell cycle transition. We speculate that treating ING2-deficient cells with a WEE1 inhibitor induces a double inhibition of the G2/M checkpoint inhibitory pathway leading to early cell cycle progression, mitotic catastrophe and ultimately reduces cell proliferation, in accordance with the model of synthetic lethality presented in Figure 5.

## DISCUSSION

Previous studies, including work from our team, have reported that *ING2* tumor suppressor gene expression is mainly lost in NSCLC (16,25). However, these studies were based on limited numbers of samples, lacked robust immunohistochemistry controls and used subjective visual staining quantification by investigators (17,18). To determine *ING2* levels more accurately, in this study we imbedded a graded series of expression controls in slides examined using fluorescence immunohistochemistry and digital image analysis in a blind experimental protocol to measure *ING2* expression in a NSCLC TMA. This allowed us to objectively and reproducibly quantify protein expression from different tissue and cellular compartments. Using the largest clinical cohort published to date, we report that *ING2* tumor suppressor protein levels are highly variable among NSCLC samples. This recapitulates what we observed *in vitro* with NSCLC cell lines where a high variability of *ING2* protein level was noted. We also demonstrate an association between *ING2* nucleocytoplasmic localization and overall survival (Figure 2A). In multivariate analysis, classical prognosis factors associated with worst survival in early stage NSCLC did not correlate with low *ING2* nucleocytoplasmic ratio, suggesting that the link between *ING2* expression and survival is an independent prognostic factor. These results support the biological importance of subcellular distribution of *ING2* tumor suppressor in NSCLC aggressiveness. Of note, biological mechanisms altering *ING2* expression in cancer remain unknown (26) as genomic alterations of the *ING2* gene are rare events (17).

Many studies have reported deregulation of nucleocytoplasmic translocation of proteins in cancers. For example, the oncogenic transcriptional activator  $\beta$ -catenin illustrates the potential impact of such a disruption in cancer cells (27). In that case the tumor suppressor protein APC represses tumor progression by promoting nuclear export and degradation of  $\beta$ -catenin. In the case of *ING2*, a predominantly nuclear protein, we predict that a phosphorylation-dependent 14-3-3 $\eta$ -mediated mechanism regulates the nuclear:cytoplasmic ratio as it does for *ING1* (19). Supporting this hypothesis, the specific REASP motif necessary for the 14-3-3 $\eta$  chaperone to bind *ING1* is also present in the *ING2* sequence (15). With regards to the nuclear import mechanism, previous studies revealed that karyopherins  $\alpha 2$  and  $\beta 1$  promote nuclear import through this specific region (28). Although *ING2* interaction with karyopherins has not been demonstrated so far, many studies have connected karyopherins and cancer (29) and thus represent a plausible link to investigate. Moreover, the largely linear correlation between *ING2* nuclear and cytoplasmic localization

in tumor cells observed in our work also support the existence of a deregulation of ING2 protein degradation, as the total level of the protein is impacted. This hypothesis was not addressed in this study, as we prioritized our efforts regarding the translational therapeutic applications, and so should be investigated further.

By exploring the publicly available genome-wide shRNA screen from Project Achilles (20), we identified a genomic dependency to *WEE1* gene in cancer cell lines with low ING2 expression. This was validated using functional approaches in multiple NSCLC cell lines with different genomic backgrounds and using complementary experimental procedures with the WEE1 inhibitor MK-1775. We previously reported that inhibition of ING2 expression accelerates the progression of cancer cells from G1/S phase, and is associated with a decrease of p21 expression independently of p53 (10). Moreover, another report showed that replication rate was markedly reduced due to a prolonged S-phase in cancer cells down-regulating ING2 (11). In this publication, endoreplication and increased sister chromatid exchange were proposed to result from replication stress induced by ING2 down-regulation. Consistent with an ING2-WEE1 linkage, a recent study indicated that S-phase functions of p21 contribute to MK-1775 resistance in cells (30). Thus, the role of ING2 in inhibiting the cell cycle by p21 induction might, at least partially, explain WEE1 sensitivity in tumor cells. However, our data also imply a role for ING2 in the G2/M phase transition of the cell cycle, since ING2 regulates transcription of the *CHEK1* gene. Querying of independent databases confirmed the correlation between *ING2* and *CHEK1* gene expression. Linking these observations, a functional ATR-CHEK1-WEE1 pathway was shown to be critical for triggering cell cycle arrest in response to replication stress or DNA damage (31). Lowering cell cycle checkpoint thresholds may allow unrepaired or incompletely replicated DNA to be inappropriately carried forward in replicating cells, eventually leading to mitotic catastrophe and cell death. Consistent with this we find that inhibition of ING2 epigenetic activity with SAHA combined with WEE1 inhibition leads to an increase of cells with a >2N quantity of DNA. Interestingly, this phenotype has also been described *in vivo*, as testis cells from *ING2*<sup>-/-</sup> mice show an increased abnormal DNA content (31).

Sensitivity of cancer cells to WEE1 was reported to be dependent on the expression of the nuclear NAD-dependent deacetylase protein SIRT1 (32) and the p53 tumor suppressor (33). ING2 was also known to interact with SIRT1 and this interaction is critical to counter-balance repression activity of the mSIN3A/HDAC complex on specific target genes (34). Therefore, to investigate if WEE1-sensitivity mediated by ING2 is dependent on its SIRT1

interaction warrants further investigation. We did not observe any difference in sensitivity to MK-1775 in a p53-dependent manner. However, it is worth mentioning that our experimental design did not include cytotoxic agents, in contrast to most previously published studies (35,36) so WEE1-sensitivity modulated by ING2 appears to be independent of p53 in the absence of DNA damaging treatment. Finally, the histone mark H3K36me3 has been reported as a potential predictive biomarker of WEE1 inhibition activity in cancer cells (37). ING2 is known to bind with high affinity to the H3K4me3 histone mark that is classically associated with highly active transcription start sites, and induce a repressive local chromatin state through histone deacetylation mediated by the recruitment of the mSIN3A/HDAC complex (38,39). To date, no genome-wide epigenetic study has been conducted in relation to ING2 expression in tumors cells, and consequently very little is known about the effect of ING2 down-regulation on global histone acetylation or methylation. If the H3K36me3 histone mark is enriched in ING2-deficient tumors, this could help explain the link we have found between ING2 levels and the impact of WEE1 inhibition. Using the HDAC inhibitor SAHA as a pharmacological complementary approach to inhibit ING2 epigenetic activity (23), we were able to reproduce the increased WEE1 inhibition sensitivity obtained in initial knock-down experiments. In addition, the anti-proliferative effects of dual HDAC and WEE1 inhibition was highly synergistic, notably in cells with high ING2 expression that are constitutively resistant to MK-1775. Consistent with this study, the synergistic effect of these two drugs has already been described in various malignancies (40–42) although our work is the first evidence of synergy in NSCLC. Both of these drugs have already been tested in early stage human clinical trials but have shown limited efficacy when used as single agents (21,43).

In summary this study in the largest NSCLC cohort published to date has identified the ING2 tumor suppressor protein as a new independent prognostic biomarker based on its subcellular localization. We also show a functional connection between ING2 expression levels and WEE1 sensitivity in human NSCLC cell lines. Beyond the known role of ING2 in the cell cycle, our data reveal that ING2 influences the ATR-CHEK1-WEE1 pathway through transcriptional regulation of the *CHEK1* gene. Based on these observations we propose the model where WEE1 sensitivity is modulated by ING2 expression and show that this vulnerability could be exploited using HDAC and WEE1 synergistic dual inhibition with already clinically available inhibitors in NSCLC.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **NSCLC patient samples**

This study was approved by the Health Research Ethics Board of Alberta. Resected samples from NSCLC patients diagnosed at the Tom Baker Cancer Centre in Calgary, between 2003-2010 were included (44). Staging, clinical pathological details and follow up data were collected by retrospective chart review, and abstracted into the Glans-Look Research Database. All patients were staged using the 7th edition TNM classifications.

### **Cell culture and drug treatments**

H322, H23, A549 and H460 human non small cell lung cancer cell lines were cultured in DMEM or RPMI medium (Thermo Scientific, MS, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (penicillin/streptomycin, Thermo Scientific), according manufacturers instructions. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere, 5% CO<sub>2</sub>. MK-1775 (#S1525; SelleckChem) and SAHA (#S1047; SelleckChem) treatments were done by applying the drug directly in the culture medium over 3 days (Viability assay) or 5 days (colony formation assay) period, in order to reach final indicated concentration.

### **Reference cell lines and TMA establishment**

Cell lines with a range of ING2 expression levels were created, confirmed by western blotting, then embedded into histogel to serve as immunohistochemistry quantitation controls. A549 human lung carcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and were used within ten passages of the source stock. They were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific), and maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. To knock-down the expression of ING2 in A549 cells, cells were seeded at a starting density of  $5 \times 10^5$  cells/flask in T75 flasks. A previously validated custom stealth siRNA (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) was used for the ING2 downregulations (10). Stealth siRNA (Invitrogen) sequence targeting the coding region of ING2 mRNA (si-ING2) is: 5'-CAA-AUG-GAG-UUA-CAC-UCA-CAG-UGU-U-3'. To induce expression of ING2 in A549 cells, PCI-ING2 plasmids were transfected with Lipofectamine 2000 (#11668027, ThermoFisher, MS, USA) according to the manufacturer's instructions. To produce cell blocks used for immunohistochemistry controls, cells were dissociated from the tissue culture flasks using a

trypsin-EDTA dissociation reagent (Thermo Fisher Scientific), washed twice with phosphate-buffered saline and fixed for 30 minutes in cold formalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The cells were washed again and embedded in molten Histogel (Thermo Fisher Scientific) to a final density of  $1 \times 10^7$  cells/100  $\mu$ l Histogel. The resultant histogel blocks were maintained in 70% ethanol overnight before processing and embedding as formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) blocks.

### **Tissue microarray construction**

Construction of the early-stage NSCLC TMA used was performed as described previously (45). Each patient specimen was represented in triplicate on the TMA. A549 cell lines expressing a range of ING2 levels were created as described above and were similarly built into a mini TMA, with all cell blocks sampled in triplicate. The cell line TMA and patient TMAs were sectioned at 4  $\mu$ m thickness and co-mounted onto the same slide. The co-mounted slides were dewaxed and rehydrated prior to treatment for fluorescence immunohistochemistry. The cell lines not only serve as on-slide controls, but the ING2 expression for each patient was normalized to the cell line TMA standard curve to correct for slight differences in staining across multiple TMAs. The normalization was performed using R (version 3.4.4) with the package dplyr (version 0.8.0.1) and magrittr (version 1.5).

### **Immunofluorescence and immunohistochemistry**

TMA sections were prepared for immunofluorescence analyses as described previously (45). Briefly, heat-induced epitope retrieval was performed by incubating slides in a citrate-based target-retrieval solution (Dako, Mississauga, Canada) and heating to 121°C for six minutes in a decloaking chamber (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Antibodies used were against ING2 (Rabbit monoclonal, clone EPR4597, 1:10000, Abcam, Cambridge, MA, USA); Vimentin (mouse monoclonal, clone V9, 1:5000, DAKO, Mississauga, Canada) and pan-cytokeratin (guinea pig polyclonal, 1:100, Acris, San Diego, CA, USA). Isotype control antibodies were used at concentrations matched to those of the respective primary antibodies. Immunohistochemistry was performed on an Dako Autostainer Link 48; antibodies were diluted with SignalStain protein blocking reagent, and incubated with the tissue samples at room temperature for 30 minutes. Secondary antibodies were anti-rabbit EnVision+ (DAKO), anti-mouse Envision+ (DAKO) and an Alexa 488-conjugated anti-guinea pig antibody (1:200, Thermo Fisher Scientific). ING2 and Vimentin staining were visualized with TSA-Plus Cy3

and TSA-Plus Cy5 signal amplification reagent, respectively (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), and nuclei were visualized with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific). After immunostaining, slides were coverslipped using ProLong Gold anti-fade mounting medium (Thermo Fisher Scientific), and stored at 4°C until they were scanned. For ING2 A549 cells expressing different levels of ING2 previously quantitated by western blotting and normal tissue specimens (lung epithelium, tonsil and placenta) were used to optimize the staining conditions.

### **Quantitative image analyses**

Immunostained slides were digitized using an Aperio ScanScope FL. Identical image acquisition parameters were applied to all stained slides. To determine mean staining intensity of ING2 positive cells, an algorithm was designed within the HALO image analysis software platform (version 2.0.1145.14, Indica Labs). Briefly, a tumor-specific mask was generated to distinguish lung cancer cells from surrounding stromal tissue by thresholding on the pan-cytokeratin images. The stromal tissues were thresholded by vimentin images. Thresholding levels were verified and adjusted, if necessary, by spot-checking a small sample of images to determine an optimal threshold value. All images were then processed using this optimal threshold value and all subsequent image manipulations involved only images of the masked area. Unusable areas such as folded or necrotic tissue were manually cropped out. TMA cores were included in the analysis if 1) at least half of the image was usable and 2) >100 cells per TMA core were present. For calculation of mean staining intensity, the maximum intensity value of cores in control sections stained with an isotype control was subtracted from all results.

### **Querying the Project Achilles Database**

Project Achilles ([www.broadinstitute.org/achilles](http://www.broadinstitute.org/achilles)) is a genome-scale lentivirally-delivered short hairpin RNA (shRNA) screens across ~216 independent cancer cell lines (Achilles 2.20.2). ATARiS gene dependency scores were used to estimate the effect of shRNA-induced gene suppression on cell viability (46) and gene expression from cells lines were obtained from CCLE database (<https://sites.broadinstitute.org/ccle/datasets>). The feature matrix was used as input for PARIS (Probability Analysis by Ranked Information Score), which has been implemented as part of Project Achilles (<https://portals.broadinstitute.org/achilles/resources/paris>). PARIS uses a mutual information-based metric (RNMI score: range -0.1 to 0.1) to rank features (in this case ING2 expression)



which is then used to determine most significant associations with the target profile (in this case cell viability). RNMI score by ranked gene are obtained as an heatmap and were been plotted on a Volcano plot using Graphpad Prism 7.0a software.

### **Colony formation assay**

Transfected or untransfected NSCLC cell lines were exposed to MK-1775 (500nM) for 7 days under culture basal condition (37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>) to allow colony formation. Then, cells were fixed with PFA 2% for 10 minutes then exposed to Cristal Violet for 15 minutes to allow colony count (colonies with 50 cells or more were considered for counting). Plating efficiency calculation for each cell lines was used to normalize the surviving fraction, as previously described (47).

### **Western blot**

Whole cell protein extracts were prepared for immunoblotting by cell lysis with RIPA buffer in combination with a protease inhibitor cocktail (#5871, Cell Signaling, MA, USA). Protein samples were then subjected to electrophoresis. The antibodies used for western blot application in this study were: ING2 (ab244387) and CHK1 (ab40866) from Abcam;  $\alpha$ -Tubulin (sc-5286), p21 (sc-6246) and p53 (sc-393031) from SantaCruz;  $\beta$ -actin (A5441) from Sigma Aldrich.

### **Alamar blue assay**

The Alamar Blue assay (#DAL1025; Invitrogen ) was used to assess proliferation as described previously. Briefly, 10 000 to 1000 cells of each condition were seeded in triplicate wells of 96-well plastic plates in 100  $\mu$ l of culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. After 24h, the plates were incubated for 4 days with indicated concentration of MK-1775 and/or SAHA or vehicule (DMSO 0.1%) at 37°C during 4 days. Alamar Blue was added in a volume of 10  $\mu$ l (10% of total volume) to the cells and incubated with protection from direct light. After 4 hours, the plate was read on a microplate reader (absorbance at 460nm-absorbance at 600nm). Averages of the absorbance values were normalized on controls cells.

### **Compusyn analysis**

MTT assay was used to assess cellular viability. Briefly, 10 000 to 1000 cells of each condition were seeded in triplicate wells of 96-well plastic plates in 100  $\mu$ l of culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. After 24h, the plates were incubated for 4 days

with a decreasing concentration of MK-1775 and/or SAHA or vehicle (DMSO 0.1%) at 37°C during 4 days. The MTT tetrazolium salt was then added to each well (50 µL; Sigma) for 5 h, after which 150 µL of DMSO was added per well and absorbance at 490 nm was assessed via microplate reader. In order to determine the nature of MK-1775 and SAHA drugs interaction (synergy, additivity, or antagonism) for eight various combinations, CompuSyn software was used to calculate combination indexes (CIs) as described elsewhere (48).

## QPCR

Total RNA was isolated from H322 and H460 cells using Trizol according previous publications (49) and then reversely transcribed into cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). cDNA was analyzed with B-R SYBR Green SuperMix (Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA) in StepOnePlus™ system (Applied Biosystems). Relative quantification in qPCR was performed using  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (threshold cycle value) for calculation of fold change with U6 as control. The primers used in this study were : ING2-Fwd: CGT-GCC-CTC-TCG-AGC-GGC-TGC-GGG-GTC; ING2-Rev: CAA-AGT-ACA-ACA-ACT-TTT-AAT-ACA-CC; CHEK1-Fwd: GTG-TCA-GAG-TCT-CCC-AGT-GGA-T; CHEK1-Rev: GTT-CTG-GCT-GAG-AAC-TGG-AGT-AC; U6-Fwd: CTC-GCT-TCG-GCA-GCA-CA; U6-Rev: AAC-GCT-TCA-CGA-ATT-TGC-GT;

## Cell cycle analysis

Cell cycle profiles of A549 cells treated during 28h with indicated concentration of MK-1775 and/or SAHA or vehicle were generated by propidium iodide (PI) and bromodeoxyuridine (BrdU) staining. Briefly, BrdU at final concentration of 30µM was added in the medium of growing cells of each experimental condition for 1h. Cells were washed in PBS and fixed with ethanol 100%. Cells were then permeabilised with 1% Triton X-100 and incubated with 1 µg ml<sup>-1</sup> RNaseA and PI followed by analysis using a BD FACScan, as described previously (50).

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 7.0a software (GraphPad software, San Diego, CA, USA) using the Student's unpaired, two-tailed t test for quantitative variable or Chi<sup>2</sup> unpaired, two-tailed test for variable parameters.

**TABLES**

Table 1: cohort demographics

		<b>Total</b>	<b>Low ING2 N/C ratio</b>	<b>High ING2 ratio</b>	<b>N/C</b>
		n = 427	n=145 (34%)	n=282 (66%)	p
<b>Age</b>	Median	65	65	66	0.79
	(min;max)	(86;33)	(41;86)	(33;85)	
<b>Gender</b>	Female	222 (52%)	65 (44.8%)	157 (55.7%)	0.04
	Male	205 (48%)	80 (55.2%)	125 (44.3%)	
<b>Smoking Status</b>	Ever	352 (82.4%)	129 (88.9%)	223 (79.1%)	0.03
	Never	40 (9.4%)	10 (6.9%)	30 (10.6%)	
	Unknown	35 (8.2%)	6 (4.2%)	29 (10.3%)	
<b>Pack-Years</b>	Median	25	40.5	12.5	0.40
	(min;max)	(4.5;82.5)	(4.5;82.5)	(4.5;37.5)	
<b>Pathology</b>	Adenocarcinoma	236 (55.3%)	80 (55.2%)	156 (55.3%)	0.89
	Squamous cell carcinoma	131 (30.7%)	46 (31.7%)	85 (30.1%)	
	Other	60 (14%)	19 (13.1%)	41 (14.6%)	
<b>TNM Stage</b>	I	243 (56.9%)	77 (53.1%)	166 (58.9%)	0.38
	II	118 (27.6%)	46 (31.7%)	72 (25.5%)	
	III	66 (15.5%)	22(15.2%)	44 (15.6%)	
<b>Recurrence</b>	Yes	173 (40.5%)	58 (40%)	115 (40.8%)	0.91
	No	254 (59.5%)	87 (60%)	167 (59.2%)	
<b>Surgical resection</b>	Yes	394 (92.3%)	130 (89.7%)	264 (93.6%)	0.17
	No	33 (7.7%)	15 (10.3%)	18 (6.4%)	
<b>Radiation therapy</b>	No	281 (65.8%)	92 (63.4%)	189 (67%)	0.51
	Yes	146 (34.2%)	53 (36.6%)	93 (33%)	
<b>Chemotherapy</b>	No	257 (60.2%)	77 (53.1%)	180 (63.8%)	0.03
	Yes	170 (39.8%)	68 (46.9%)	102 (36.2%)	

Table 2: Factors associated with low ING2 nucleocytoplasmic ratio according univariate and multivariate analysis

	Univariate	Multivariate	adjusted OR	95% CI
<b>Gender (Male)</b>	<b>0.034</b>	<b>0.039</b>	1.60	[1.02-2.51]
<b>Age &gt;65</b>	0.88	-	-	-
<b>Ever smoker</b>	0.15	-	-	-
<b>Adenocarcinoma</b>	0.98	-	-	-
<b>&gt;T1 status</b>	<b>0.003</b>	0.076	1.48	[0.96-2.3]
<b>N positive Status</b>	0.86	-	-	-
<b>TNM status</b>	0.25	-	-	-
<b>Relapse</b>	0.87	-	-	-
<b>Survival &lt;36 mois</b>	<b>0.006</b>	<b>0.0027</b>	2.32	[1.33-4.04]

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1: ING2 protein quantitation in NSCLC TMA samples.

(A) Representative examples of endogenous ING2 levels in NSCLC TMA samples: low expression (upper panels), medium expression (middle panels 2), and high expression (lower panels). Primary images are presented in grayscale, whereas merged images are pseudo-colored as follows: DAPI-stained nuclei in blue (first column), PCK-stained epithelial/tumor cells in green (second column), vimentin-stained stroma in red (third column) and ING2 protein expression in white (fourth column). PCK, pan-cytokeratin; DAPI, diamidino-2-phenylindole.

(B) Histograms showing distribution of the mean ING2 pixel intensity according to subcellular localization and nuclear/cytoplasmic ratio in tumor cells (upper panels; n=428) or in stromal cells (lower panels, n=418). Red line shows cut-off value for low/high nucleocytoplasmic ratio.

(C) Level of ING2 expression (mean pixel intensity) in paired tumor cells and stromal cells on TMA samples (n=418). (\*\*\*) :  $p < 0.001$

### Figure 2: Prognostic value of ING2 nucleocytoplasmic ratio in NSCLC.

(A) Kaplan-Meier plot of overall survival in patients with high or low ING2 nucleocytoplasmic ratio in tumors cells (cut-off value: 2.27).

(B) Kaplan-Meier plot of recurrence-free survival in patients with high or low ING2 nucleocytoplasmic ratio in tumors cells

### Figure 3: ING2 expression affects sensitivity to the WEE1 inhibitor MK-1775 in NSCLC cell lines.

(A) Analysis of RNA interference screens from the Project Achilles database. Heat map showing the top 4 genes showing survival dependence on levels of *ING2* gene expression in CCLE cell lines (upper panel). Volcano plot showing statistically significant genes ( $p < 0,01$  and false discovery rate (FDR)  $> 0,25$ ) inducing a dependency according to rescaled

normalized mutual information (RNMI) score low ING2 expressing (blue circle) and high ING2 expressing (red circle) CCLE cell lines.

**(B)** Western blot analysis of whole cell extracts from NSCLC cell lines probed with the indicated antibody (upper panel). Viability of NSCLC cell lines determined by Alamar Blue reduction relative to untreated control. Cells were treated with MK-1775 for 72 hours at the indicated concentrations. Data are presented as mean  $\pm$  SD of experimental triplicate from a representative experiment (n=3).

**(C)** Colony formation assays performed on NSCLC cell lines untreated or treated with MK-1775 at the indicated concentration for 5 days. The graph shows the average surviving fraction from three independent experiments. Bar graphs show the means  $\pm$  SD (n=3).

**(D)** Proliferation of H322 cells transfected with PCI-ING2 or PCI-empty vector, determined by Alamar Blue reduction relative to untreated control. Cells were treated with MK-1775 for 72 hours at the indicated concentrations. Data are presented as mean  $\pm$  SD of experimental triplicates from a representative experiment (n=3) (left and middle panel). Western blot analysis of whole cell extracts from H322 cell lines transfected with PCI-ING2 or PCI-empty vector and probed with the indicated antibodies (right panel). (\*\* : p<0.01)

**(E)** Proliferation of H460 cells transfected with si-ING2 or si-CT stealth-RNA, determined by Alamar Blue reduction relative to untreated control. Cells were treated with MK-1775 for 72 hours at the indicated concentrations. Data are presented as means  $\pm$  SD of experimental triplicates from a representative experiment (n=3) (left and middle panel). Western blot analysis of whole cell extracts from H322 cell lines transfected with PCI-ING2 or PCI-empty vector and probed with the indicated antibodies (right panel). (\*\*p<0.01)

**Figure 4: ING2 expression modulates sensitivity to WEE1 inhibitor MK-1775 in NSCLC cell lines.**

**(A)** Proliferation of NSCLC cell lines and WI38 human fibroblasts as estimated by Alamar Blue reduction relative to untreated control. Cells were treated with SAHA and or MK-1775 for 72 hours at the indicated concentrations. Bar graphs represent means  $\pm$  SD of experimental triplicates from a representative experiment (n=3). (ns=non-significant; \*\*p<0.01)

(B) Compusyn interaction analysis in NSCLC cell lines. Combination indexes  $<1$  represent synergistic effects of the combination treatment.

(C) Western blot analysis of whole cell extracts from A549 cells treated with increasing concentrations of SAHA for 72 hours and probed with the indicated antibodies.

(D) Western blot analysis of whole cell extracts from H322 and H460 cells transfected respectively with si-CT/si-ING2 stealth-RNA or Gapmer-CT/Gapmer-ING2 and probed with the indicated antibodies.

(E) qPCR results of *ING2* and *CHEK1* gene expression in SAHA treated A549 cells. Bars represent mean  $\pm$ SD. (ns=non significant; \*\*\* $p<0.001$ ).

(F) qPCR results of *ING2* and *CHEK1* gene expression in H322 and H460 cells treated with si-ING2 stealth-RNA relative to si-CT treated cells. Bars represent means  $\pm$ SD. (ns=non significant; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ )

**Figure 5: Working model of ING2-induced vulnerability to WEE1 inhibition in NSCLC.**

(A) In basal conditions, ING2 protein promotes the transcription of *CHEK1* and consequently induces an inhibition of the CDK1/CyclinA-B dependent G2/M transition through WEE1 phosphorylation.

(B) Upon SAHA treatment or ING2 down-regulation, *CHEK1* gene transcription decreases, reducing the level of CHK1 protein. Adding MK-1775 reinforces inhibition of WEE1 kinase activity and therefore promotes cell transition to M phase through the release of the inhibition of CDK1/CyclinA-B. This early progression into G2/M leads to mitotic catastrophe and ultimately to tumor cell death.

**SUPPLEMENTARY INFORMATION****Supplemental Figure Legends**

**Supplemental Figure 1:** (A) Western blot analysis of whole cell extracts from A549 cells, 24h after transfection of PCI-ING2 vector (+ = 5ug, ++ = 10ug) or 48h after transfection of si-ING2 (+ = 10nM, ++ = 20nM). Nitrocellulose membrane was probed with the indicated antibodies. (B) Control of the ING2 expression (mean pixel intensity scores) in A549 cells modified from samples (A) on TMA samples. The linear regression curve and Pearson correlation coefficient ( $R^2$ ) are shown. (C) Levels of ING2 expression (mean pixel intensity scores) in the nucleus and cytoplasm for each TMA sample. Linear regression curves (in red) and Pearson correlation coefficients ( $R^2$ ) are shown.

**Supplemental Figure 2:** (A) Kaplan-Meier plot of overall survival according to high or low ING2 tumor cell pixel intensity scores (cytoplasm + nucleus signal). (B) Kaplan-Meier plot of overall survival according to high or low ING2 nucleocytoplasmic ratio in stromal cells (cut-off value : 2.27).

**Supplemental Figure 3:** (A) Colony formation assays performed on H23 cells transfected with PCI-ING2 or PCI-empty vector and treated with MK-1775 at the indicated concentration for 5 days (left panel). Graph shows the average surviving fraction of three independent experiments performed. Bar graphs represent means  $\pm$  SD (n=3). (B) Colony formation assays performed on H460 cells treated with Stealth-RNA CT or ING2 and treated with MK-1775 at the indicated concentration for 5 days (left panel). Graph shows the average surviving fraction in three independent experiments. Bar graphs represent mean  $\pm$  SD (n=3). (C) The left graph shows proliferation of U2OS cells transfected with si-ING2 or si-CT stealth-RNA estimated by Alamar Blue reduction relative to untreated controls. Cells were treated with MK-1775 for 72 hours at the indicated concentration. Data are presented as mean  $\pm$  SD of experimental triplicates from a representative experiment (n=3). The right graph shows proliferation of H1975 cells transfected with PCI-ING2 or PCI-empty vector as estimated by Alamar Blue reduction relative to untreated controls. Cells were treated with MK-1775 for 72 hours at the indicated concentration. Data are presented as means  $\pm$  SD of experimental triplicates from a representative experiment (n=3). (D) The left graph shows proliferation of p53-inducible H1299 cells estimated by Alamar Blue reduction relative to untreated controls. Cells were treated with doxycycline and or MK-1775 for 72 hours at the indicated concentrations with bar graphs representing means  $\pm$  SD of experimental triplicates from a representative



experiment (n=3). Western blots of whole cell extracts from p53-inducible H1299 cells treated with doxycycline at the indicated concentration and probed with the indicated antibodies.

**Supplemental Figure 4:** (A) A549 cells were treated with SAHA and/or MK-1775 for 28h at the indicated concentrations. Cells were stained with BrDU and PI and then analysed using flow cytometry. The bar graph shows cell cycle distribution derived from the representative histograms of flow cytometry. (B) CCLE database analysis. Expression (normalized gene-centric RMA) of the *CHEK1* gene and *ING2* gene in all CCLE cell lines (left panel) and restricted to lung cancer cell lines (right panel).

**BIBLIOGRAPHY**

1. Didkowska J, Wojciechowska U, Mańczuk M, Łobaszewski J. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med.* avr 2016;4(8):150.
2. Howlander N, Forjaz G, Mooradian MJ, Meza R, Kong CY, Cronin KA, et al. The Effect of Advances in Lung-Cancer Treatment on Population Mortality. *N Engl J Med.* 13 2020;383(7):640-9.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
4. Kim KH, Kim W, Howard TP, Vazquez F, Tsherniak A, Wu JN, et al. SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat Med.* déc 2015;21(12):1491-6.
5. Romero R, Sayin VI, Davidson SM, Bauer MR, Singh SX, LeBoeuf SE, et al. Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. *Nat Med.* nov 2017;23(11):1362-8.
6. Dantas A, Al Shueili B, Yang Y, Nabbi A, Fink D, Riabowol K. Biological Functions of the ING Proteins. *Cancers.* 19 nov 2019;11(11).
7. Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry A-J, Côté V, Selleck W, et al. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell.* 6 janv 2006;21(1):51-64.
8. Guérillon C, Larrieu D, Pedoux R. ING1 and ING2: multifaceted tumor suppressor genes. *Cell Mol Life Sci CMLS.* oct 2013;70(20):3753-72.
9. Ythier D, Larrieu D, Binet R, Binda O, Brambilla C, Gazzeri S, et al. Sumoylation of ING2 regulates the transcription mediated by Sin3A. *Oncogene.* 4 nov 2010;29(44):5946-56.
10. Larrieu D, Ythier D, Brambilla C, Pedoux R. ING2 controls the G1 to S-phase transition by regulating p21 expression. *Cell Cycle Georget Tex.* 1 oct 2010;9(19):3984-90.
11. Larrieu D, Ythier D, Binet R, Brambilla C, Brambilla E, Sengupta S, et al. ING2 controls the progression of DNA replication forks to maintain genome stability. *EMBO Rep.* oct 2009;10(10):1168-74.
12. Nouman GS, Anderson JJ, Crosier S, Shrimankar J, Lunec J, Angus B. Downregulation of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol.* juill 2003;56(7):507-11.
13. Chen L, Matsubara N, Yoshino T, Nagasaka T, Hoshizima N, Shirakawa Y, et al. Genetic alterations of candidate tumor suppressor ING1 in human esophageal squamous cell cancer. *Cancer Res.* 1 juin 2001;61(11):4345-9.

14. Nouman GS, Anderson JJ, Wood KM, Lunec J, Hall AG, Reid MM, et al. Loss of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol.* août 2002;55(8):596-601.
15. He GHY, Helbing CC, Wagner MJ, Sensen CW, Riabowol K. Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol.* janv 2005;22(1):104-16.
16. Guérillon C, Bigot N, Pedoux R. The ING tumor suppressor genes: Status in human tumors. *Cancer Lett.* 11 déc 2013;
17. Ythier D, Brambilla E, Binet R, Nissou D, Vesin A, de Fraipont F, et al. Expression of candidate tumor suppressor gene ING2 is lost in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer Amst Neth.* août 2010;69(2):180-6.
18. Pan YQ, Zhang X, Xu DP, Bao WG, Lin AF, Xu HH, et al. Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in Chinese NSCLC patients. *Neoplasma.* 2014;61(4):468-75.
19. Gong W, Russell M, Suzuki K, Riabowol K. Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression. *Mol Cell Biol.* avr 2006;26(8):2947-54.
20. Tsherniak A, Vazquez F, Montgomery PG, Weir BA, Kryukov G, Cowley GS, et al. Defining a Cancer Dependency Map. *Cell.* 27 juill 2017;170(3):564-576.e16.
21. Do K, Wilsker D, Ji J, Zlott J, Freshwater T, Kinders RJ, et al. Phase I Study of Single-Agent AZD1775 (MK-1775), a Wee1 Kinase Inhibitor, in Patients With Refractory Solid Tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 oct 2015;33(30):3409-15.
22. Leijen S, van Geel RMJM, Pavlick AC, Tibes R, Rosen L, Razak ARA, et al. Phase I Study Evaluating WEE1 Inhibitor AZD1775 As Monotherapy and in Combination With Gemcitabine, Cisplatin, or Carboplatin in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 2016;34(36):4371-80.
23. Smith KT, Martin-Brown SA, Florens L, Washburn MP, Workman JL. Deacetylase inhibitors dissociate the histone-targeting ING2 subunit from the Sin3 complex. *Chem Biol.* 29 janv 2010;17(1):65-74.
24. Göder A, Emmerich C, Nikolova T, Kiweler N, Schreiber M, Köhl T, et al. HDAC1 and HDAC2 integrate checkpoint kinase phosphorylation and cell fate through the phosphatase-2A subunit PR130. *Nat Commun.* 22 2018;9(1):764.
25. Blondel A, Benberghout A, Pedoux R, Ricordel C. Exploiting ING2 Epigenetic Modulation as a Therapeutic Opportunity for Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers.* 21 oct 2019;11(10).
26. Gournay M, Paineau M, Archambeau J, Pedoux R. Regulat-INGs in tumors and diseases: Focus on ncRNAs. *Cancer Lett.* 10 avr 2019;447:66-74.
27. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates  $\beta$ -catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol.* sept 2000;2(9):653-60.

28. Russell MW, Soliman MA, Schriemer D, Riabowol K. ING1 protein targeting to the nucleus by karyopherins is necessary for activation of p21. *Biochem Biophys Res Commun.* 26 sept 2008;374(3):490-5.
29. Cagatay T, Chook YM. Karyopherins in Cancer. *Curr Opin Cell Biol.* juin 2018;52:30-42.
30. Hauge S, Macurek L, Syljuåsen RG. p21 limits S phase DNA damage caused by the Wee1 inhibitor MK1775. *Cell Cycle Georget Tex.* 2019;18(8):834-47.
31. Beck H, Nähse V, Larsen MSY, Groth P, Clancy T, Lees M, et al. Regulators of cyclin-dependent kinases are crucial for maintaining genome integrity in S phase. *J Cell Biol.* 8 mars 2010;188(5):629-38.
32. Chen G, Zhang B, Xu H, Sun Y, Shi Y, Luo Y, et al. Suppression of Sirt1 sensitizes lung cancer cells to WEE1 inhibitor MK-1775-induced DNA damage and apoptosis. *Oncogene.* 14 2017;36(50):6863-72.
33. Rajeshkumar NV, De Oliveira E, Ottenhof N, Watters J, Brooks D, Demuth T, et al. MK-1775, a potent Wee1 inhibitor, synergizes with gemcitabine to achieve tumor regressions, selectively in p53-deficient pancreatic cancer xenografts. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 mai 2011;17(9):2799-806.
34. Binda O, Nassif C, Branton PE. SIRT1 negatively regulates HDAC1-dependent transcriptional repression by the RBP1 family of proteins. *Oncogene.* 29 mai 2008;27(24):3384-92.
35. Hirai H, Iwasawa Y, Okada M, Arai T, Nishibata T, Kobayashi M, et al. Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Mol Cancer Ther.* nov 2009;8(11):2992-3000.
36. Leijen S, Beijnen JH, Schellens JHM. Abrogation of the G2 checkpoint by inhibition of Wee-1 kinase results in sensitization of p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Curr Clin Pharmacol.* août 2010;5(3):186-91.
37. Pfister SX, Markkanen E, Jiang Y, Sarkar S, Woodcock M, Orlando G, et al. Inhibiting WEE1 Selectively Kills Histone H3K36me3-Deficient Cancers by dNTP Starvation. *Cancer Cell.* 9 nov 2015;28(5):557-68.
38. Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, et al. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature.* 6 juill 2006;442(7098):96-9.
39. Peña PV, Davrazou F, Shi X, Walter KL, Verkhusha VV, Gozani O, et al. Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature.* 6 juill 2006;442(7098):100-3.
40. Tanaka N, Patel AA, Tang L, Silver NL, Lindemann A, Takahashi H, et al. Replication Stress Leading to Apoptosis within the S-phase Contributes to Synergism between Vorinostat and AZD1775 in HNSCC Harboring High-Risk TP53 Mutation. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 nov 2017;23(21):6541-54.

41. Zhou L, Zhang Y, Chen S, Kmiecik M, Leng Y, Lin H, et al. A regimen combining the Wee1 inhibitor AZD1775 with HDAC inhibitors targets human acute myeloid leukemia cells harboring various genetic mutations. *Leukemia*. avr 2015;29(4):807-18.
42. Hanmod SS, Wang G, Edwards H, Buck SA, Ge Y, Taub JW, et al. Targeting histone deacetylases (HDACs) and Wee1 for treating high-risk neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. janv 2015;62(1):52-9.
43. Reguart N, Rosell R, Cardenal F, Cardona AF, Isla D, Palmero R, et al. Phase I/II trial of vorinostat (SAHA) and erlotinib for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations after erlotinib progression. *Lung Cancer Amst Neth*. mai 2014;84(2):161-7.
44. Petersen LF, Klimowicz AC, Otsuka S, Elegbede AA, Petrillo SK, Williamson T, et al. Loss of tumour-specific ATM protein expression is an independent prognostic factor in early resected NSCLC. *Oncotarget*. 13 juin 2017;8(24):38326-36.
45. Thakur S, Nabbi A, Klimowicz A, Riabowol K. Stromal ING1 expression induces a secretory phenotype and correlates with breast cancer patient survival. *Mol Cancer*. 27 août 2015;14:164.
46. Shao DD, Tsherniak A, Gopal S, Weir BA, Tamayo P, Stransky N, et al. ATARiS: computational quantification of gene suppression phenotypes from multisample RNAi screens. *Genome Res*. avr 2013;23(4):665-78.
47. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-9.
48. Bijnsdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ. Analysis of Drug Interactions. In: Cree IA, éditeur. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [cité 20 août 2021]. p. 421-34. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_34](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_34)
49. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. juin 2010;2010(6):pdb.prot5439.
50. Logan IR, McNeill HV, Cook S, Lu X, Meek DW, Fuller-Pace FV, et al. Heat shock factor-1 modulates p53 activity in the transcriptional response to DNA damage. *Nucleic Acids Res*. mai 2009;37(9):2962-73.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

C. Ricordel is a recipient of FHU Camin (CHU Rennes) and obtained international scholarship grants from the Nuovo-Soldati Foundation and CORECT mobilité (CHU Rennes). RP is supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), KR is supported by the CRS (Cancer Research Society) and CIHR (Canadian Institutes for Health Research). The work was also supported by La Ligue Contre le Cancer (Grand Ouest). The Glans-Look lung cancer database is a Alberta Canada based repository of comprehensive medical information on all lung cancer patients supported by donor-fund through GB.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflict of interest.

**AUTHOR CONTRIBUTION**

CR, AC, NN, BD, RP, GB and KR conceived and designed the experiments. CR, AC and JA performed the experiments. ST provided technical supports for experiments. CR, AC and MD were responsible for statistical analysis. GB established the GLD. All the authors contributed to manuscript writing. CR, AC, RP, GB and KR analyzed the data and were responsible for designing figures. All the authors approved the final manuscript.

Figure 1

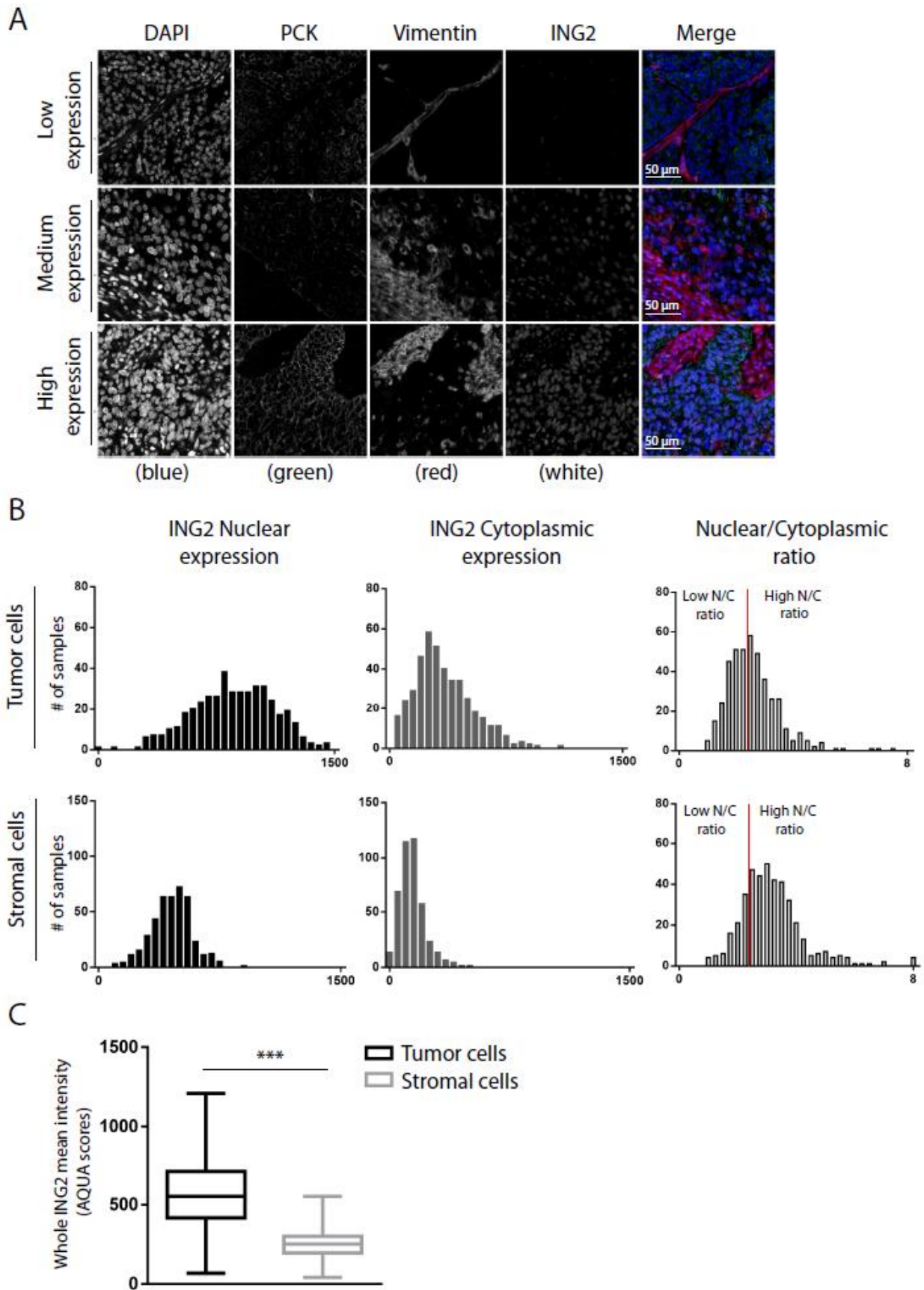


Figure 2

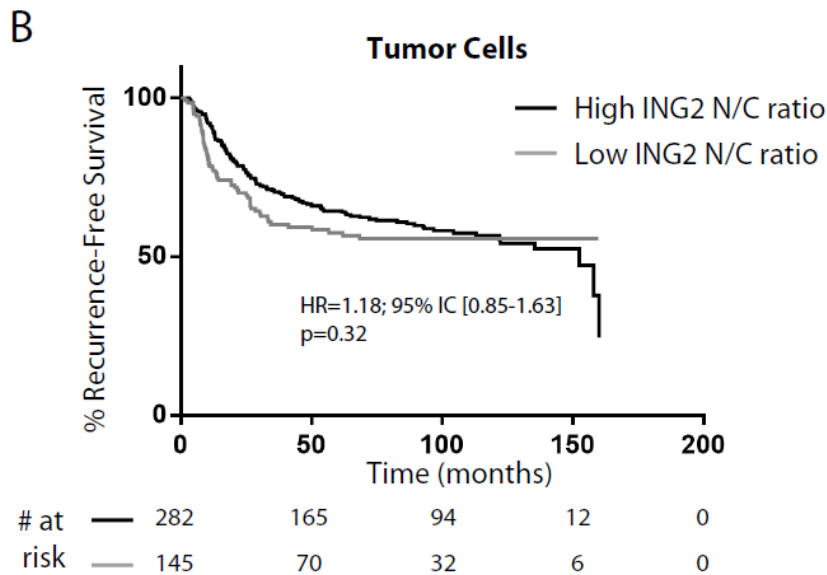
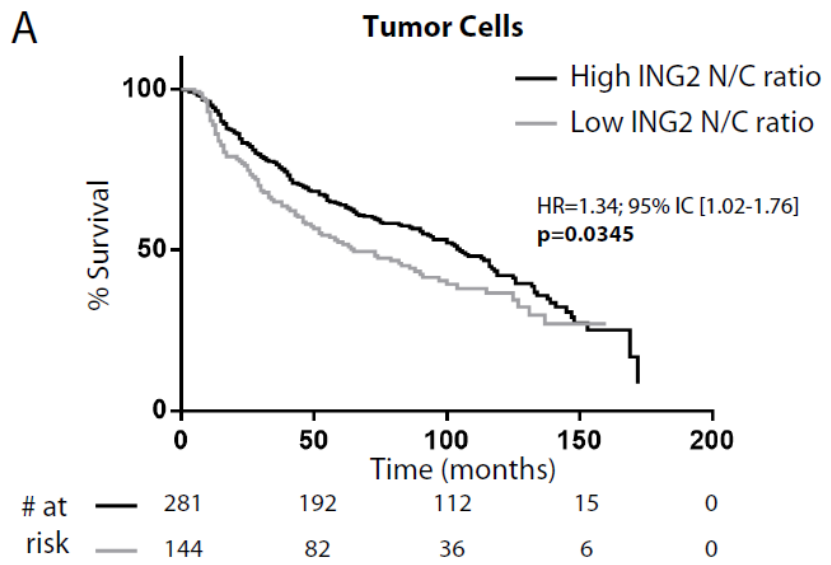




Figure 3

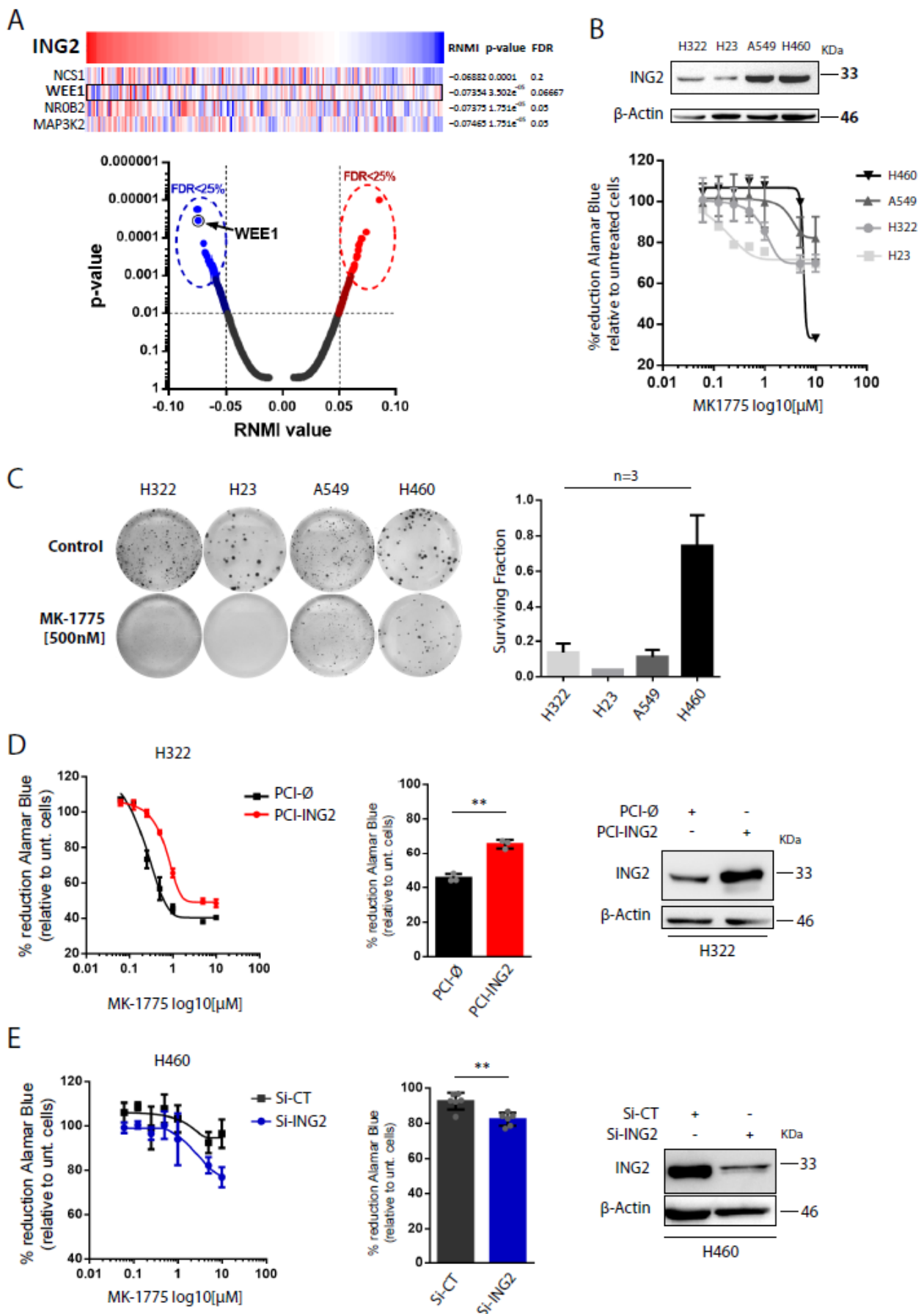


Figure 4

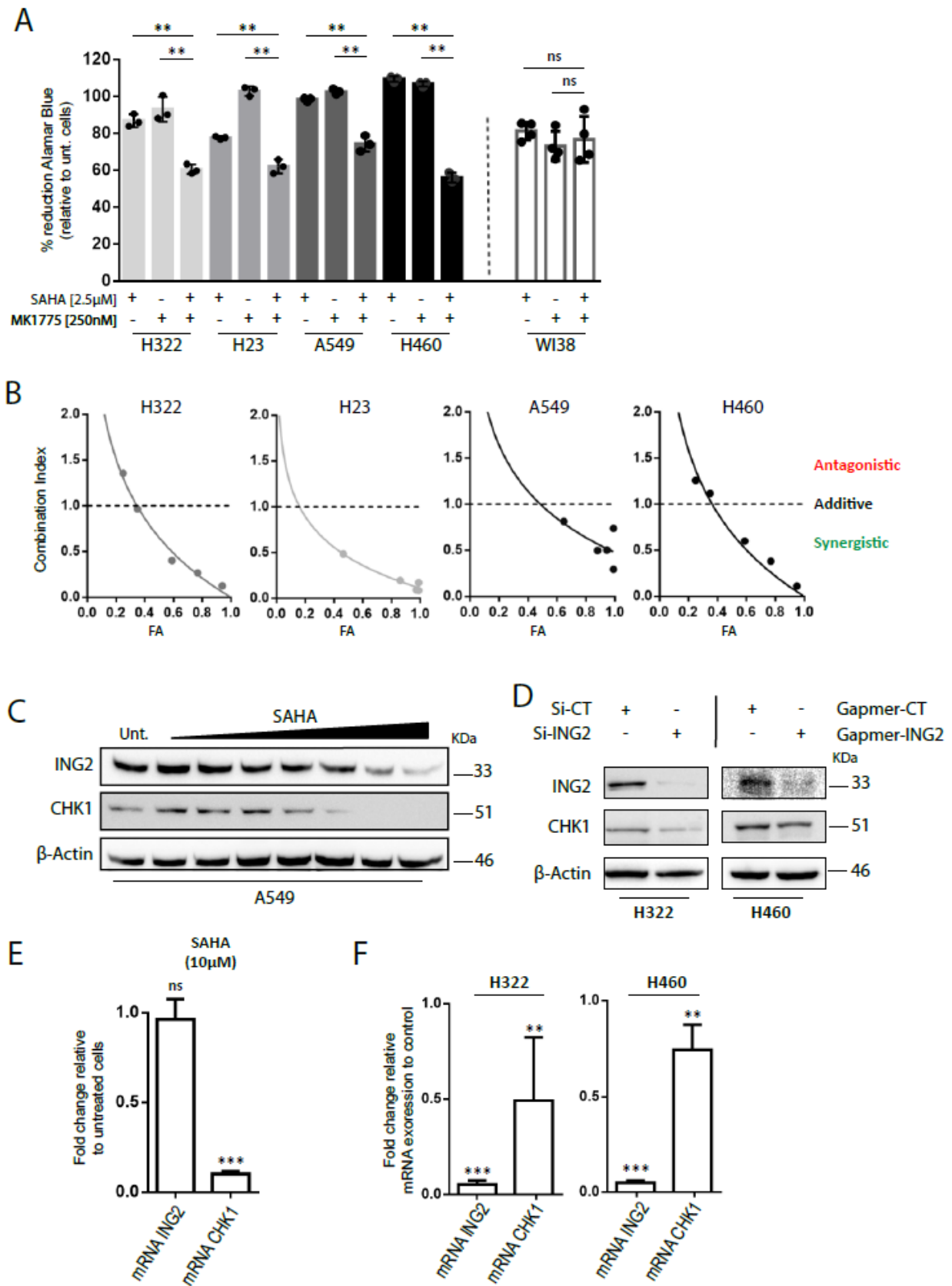
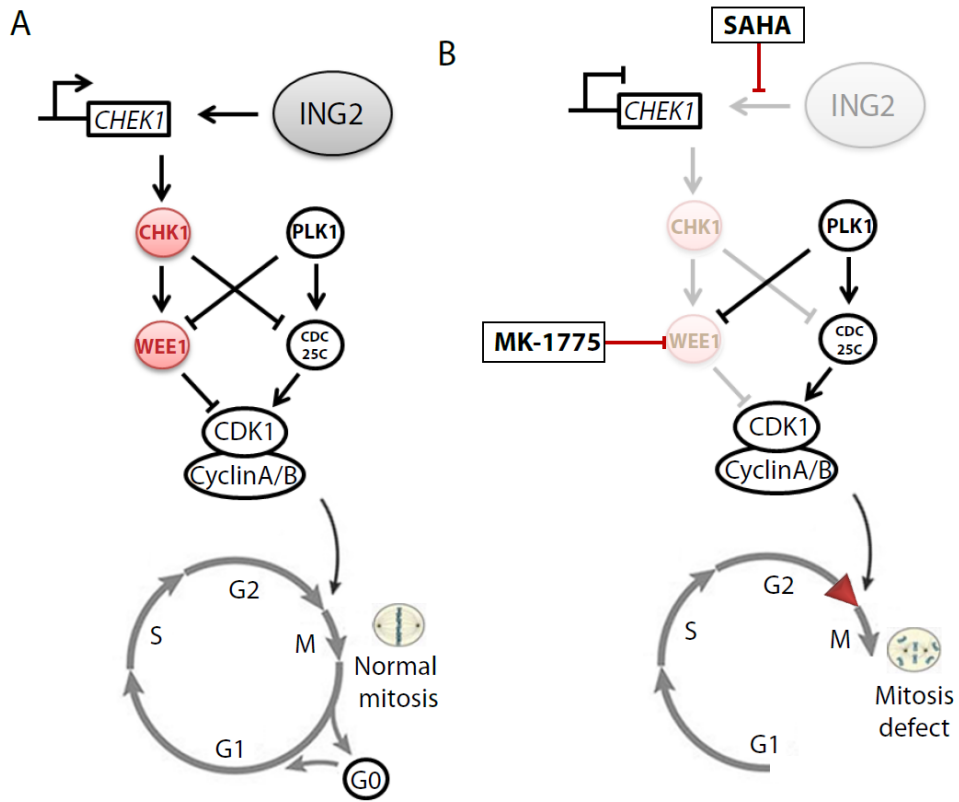


Figure 5



## TABLES

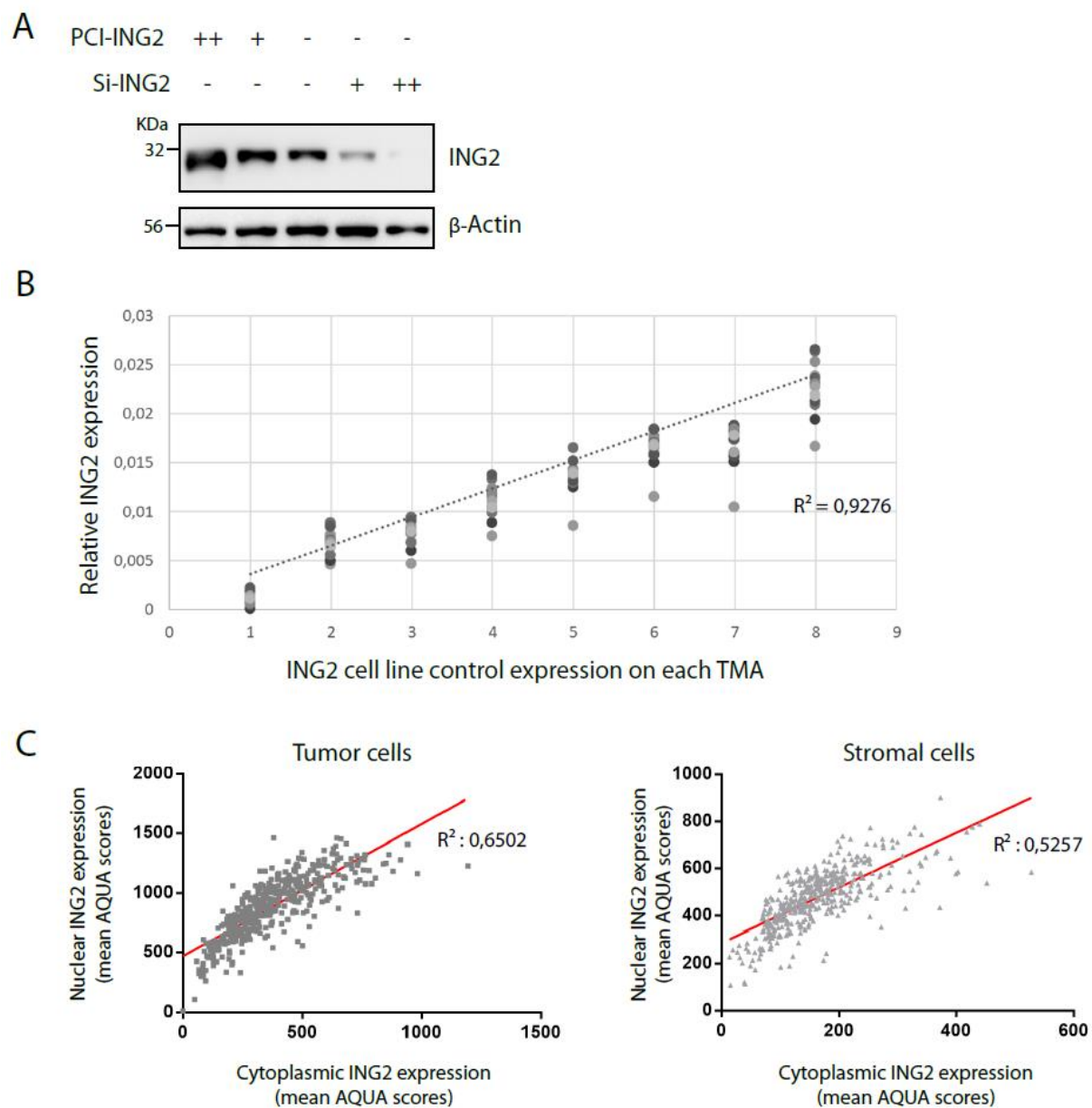
Table 1: cohort demographics

		Total	Low ING2 N/C ratio	High ING2 ratio	N/C
		n = 427	n=145 (34%)	n=282 (66%)	p
<b>Age</b>	Median	65	65	66	0.79
	(min;max)	(86;33)	(41;86)	(33;85)	
<b>Gender</b>	Female	222 (52%)	65 (44.8%)	157 (55.7%)	0.04
	Male	205 (48%)	80 (55.2%)	125 (44.3%)	
<b>Smoking Status</b>	Ever	352 (82.4%)	129 (88.9%)	223 (79.1%)	0.03
	Never	40 (9.4%)	10 (6.9%)	30 (10.6%)	
	Unknown	35 (8.2%)	6 (4.2%)	29 (10.3%)	
<b>Pack-Years</b>	Median	25	40.5	12.5	0.40
	(min;max)	(4.5;82.5)	(4.5;82.5)	(4.5;37.5)	
<b>Pathology</b>	Adenocarcinoma	236 (55.3%)	80 (55.2%)	156 (55.3%)	0.89
	Squamous cell carcinoma	131 (30.7%)	46 (31.7%)	85 (30.1%)	
	Other	60 (14%)	19 (13.1%)	41 (14.6%)	
<b>TNM Stage</b>	I	243 (56.9%)	77 (53.1%)	166 (58.9%)	0.38
	II	118 (27.6%)	46 (31.7%)	72 (25.5%)	
	III	66 (15.5%)	22(15.2%)	44 (15.6%)	
<b>Recurrence</b>	Yes	173 (40.5%)	58 (40%)	115 (40.8%)	0.91
	No	254 (59.5%)	87 (60%)	167 (59.2%)	
<b>Surgical resection</b>	Yes	394 (92.3%)	130 (89.7%)	264 (93.6%)	0.17
	No	33 (7.7%)	15 (10.3%)	18 (6.4%)	
<b>Radiation therapy</b>	No	281 (65.8%)	92 (63.4%)	189 (67%)	0.51
	Yes	146 (34.2%)	53 (36.6%)	93 (33%)	
<b>Chemotherapy</b>	No	257 (60.2%)	77 (53.1%)	180 (63.8%)	0.03
	Yes	170 (39.8%)	68 (46.9%)	102 (36.2%)	

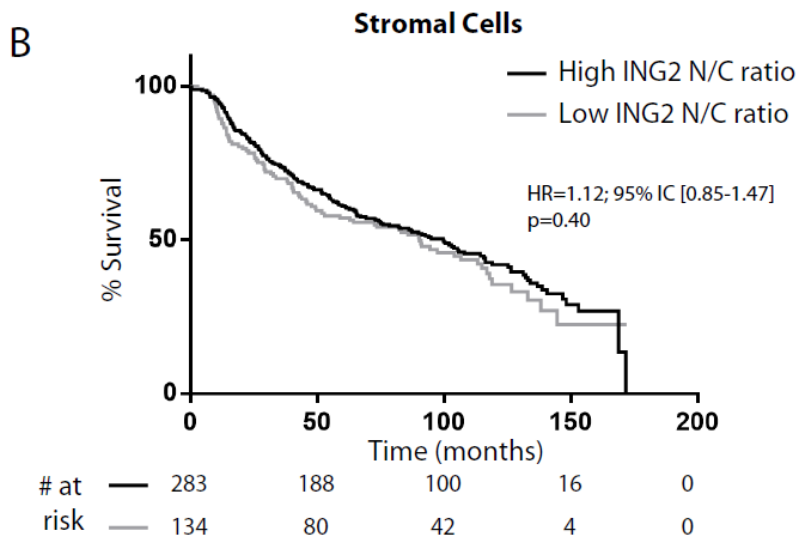
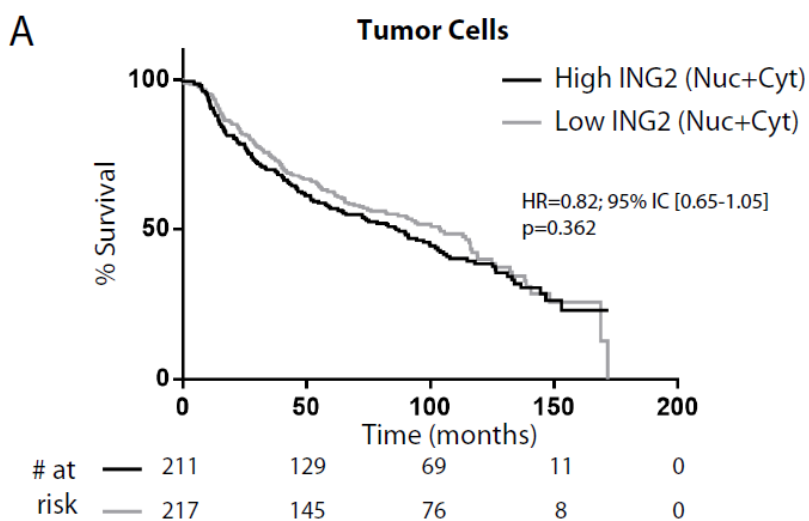
Table 2: Factors associated with low ING2 nucleocytoplasmic ratio according univariate and multivariate analysis

	Univariate	Multivariate	adjusted OR	95% CI
<b>Gender (Male)</b>	<b>0.034</b>	<b>0.039</b>	1.60	[1.02-2.51]
<b>Age &gt;65</b>	0.88	-	-	-
<b>Ever smoker</b>	0.15	-	-	-
<b>Adenocarcinoma</b>	0.98	-	-	-
<b>&gt;T1 status</b>	<b>0.003</b>	0.076	1.48	[0.96-2.3]
<b>N positive Status</b>	0.86	-	-	-
<b>TNM status</b>	0.25	-	-	-
<b>Relapse</b>	0.87	-	-	-
<b>Survival &lt;36 mois</b>	<b>0.006</b>	<b>0.0027</b>	2.32	[1.33-4.04]

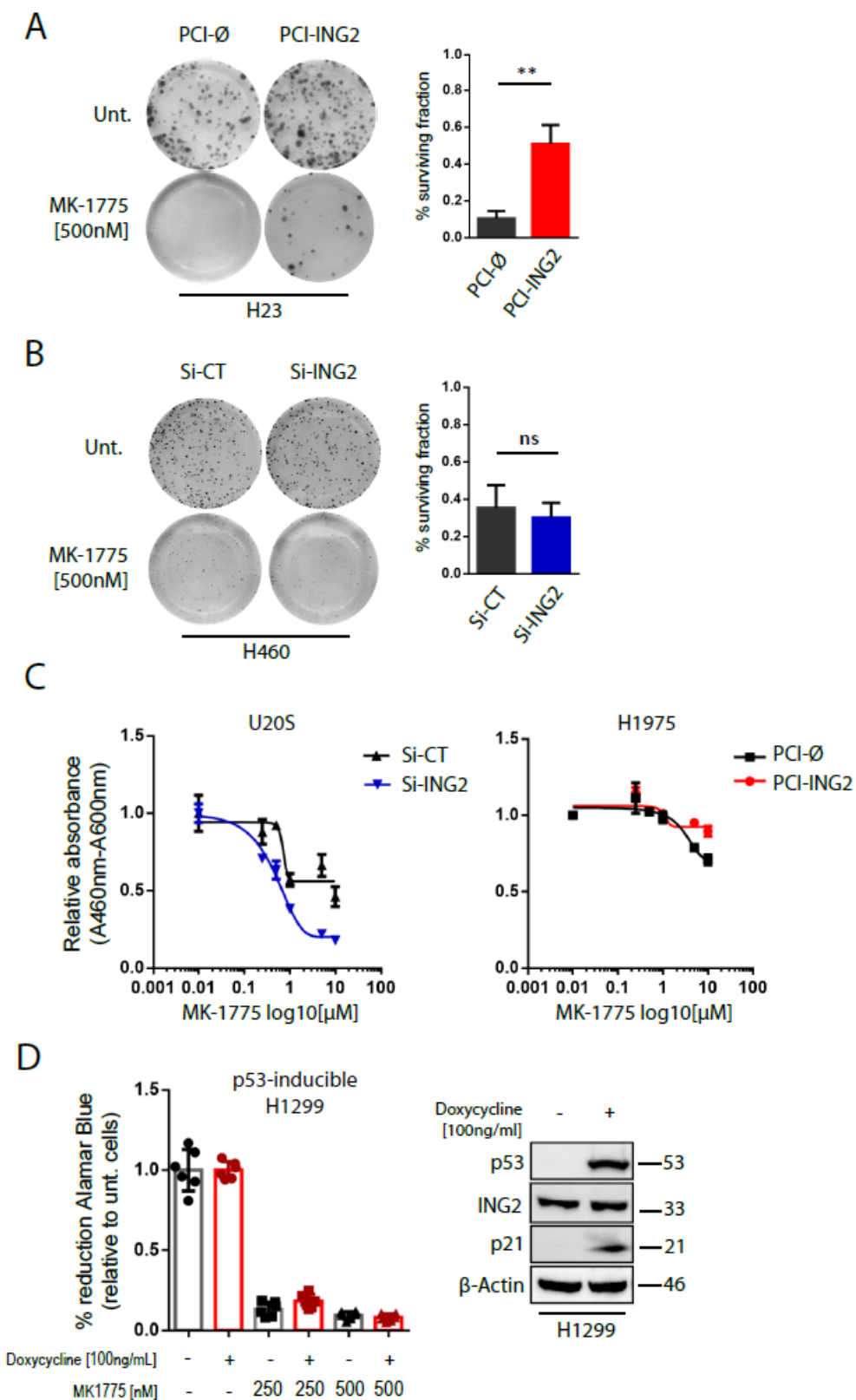
## Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2

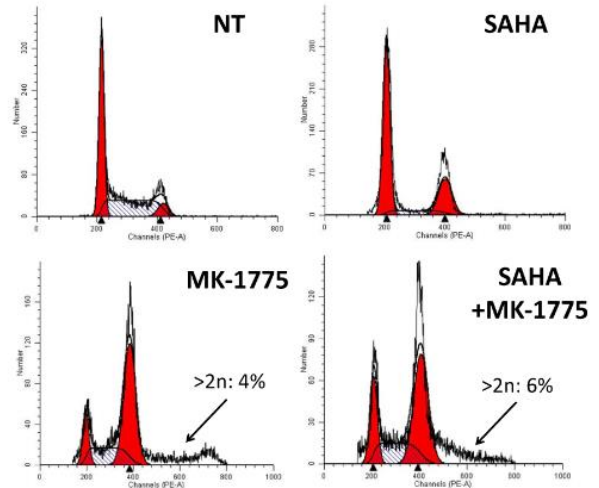
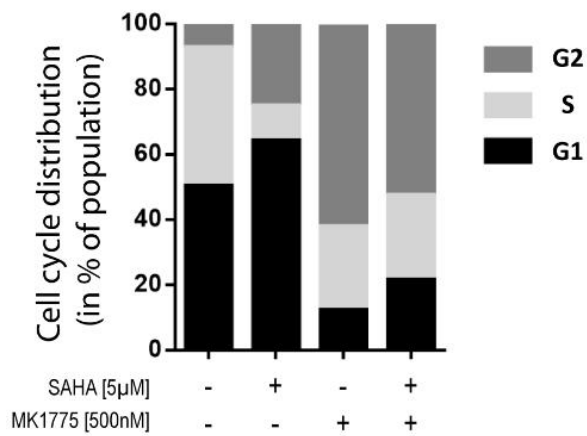


### Supplementary Figure 3

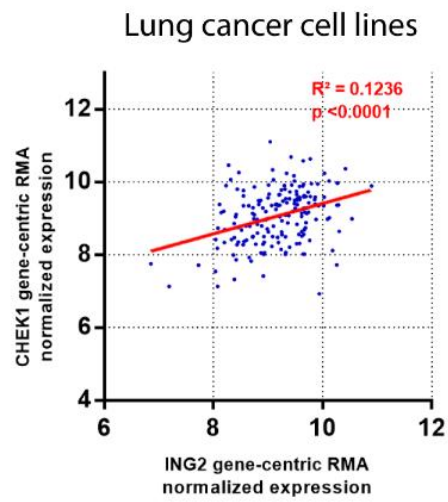
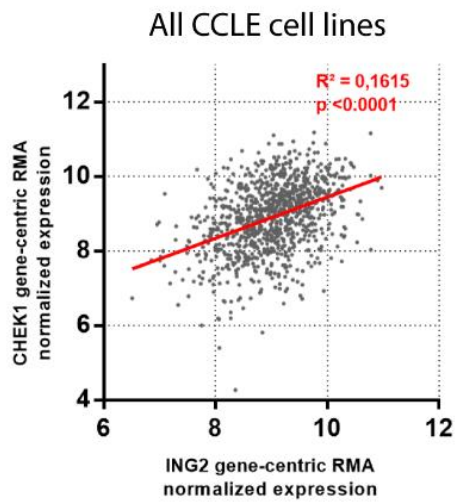




A



B



### 3 ARTICLE N°3

## **Identification des fonctions oncogéniques de la protéine ING3 à l'aide d'un modèle de culture *ex vivo* de tissu prostatique.**

---

### **Human *ex vivo* prostate tissue model system identifies ING3 as an oncoprotein**

Urszula L McClurg\*, Arash Nabbi\*, **Charles Ricordel\***, Svitlana Korolchuk, Stuart McCracken, Rakesh Heer, Laura Wilson, Lisa M Butler, Bronwyn Kate Irving-Hooper, Rémy Pedeux, Craig N Robson, Karl T Riabowol and Olivier Binda

\* These authors contributed equally to this work.

**Article publié dans la revue *British Journal of Cancer***

## Résumé des résultats principaux

Le dernier objectif de ma thèse a été d'identifier de nouvelles fonctions pour la protéine ING3. Antérieurement décrite comme un partenaire constitutif du complexe hNuA4/TIP60, notre équipe s'est intéressée à l'impact de l'expression de la protéine ING3 sur la transcription du génome dans les cancers solides. Par le biais d'une collaboration internationale, en partant de l'observation que la fonction acetyl-transférase de TIP60 favorisait l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux androgènes, nous avons étudié l'impact de l'expression du gène *ING3* dans les cancers solides et plus particulièrement dans le contexte spécifique du cancer de la prostate.

### 1- Identification des propriétés oncogéniques de la protéine ING3.

À l'aide d'un modèle de culture *ex vivo* d'échantillons prostatiques et un vecteur lentiviral permettant l'expression inductible de ING3, nous avons pu démontrer que l'expression exogène de la protéine FLAG-ING3 était associée à une augmentation significative du marquage P-H3S10 (témoin de l'activité mitotique) en comparaison aux conditions contrôles. De manière cohérente, nous avons montré que l'expression exogène de la protéine ING3 dans des fibroblastes humains et murins favorise la croissance et la formation de colonies en conditions de culture cellulaire standards.

### 2- L'expression tumorale de ING3 est un marqueur de mauvais pronostic.

Nous avons ensuite évalué le niveau d'expression de la protéine ING3 en immunohistochimie sur 81 échantillons de cancers prostatiques comparés à 41 échantillons d'hypertrophies bénignes de prostate. Nous avons alors observé une augmentation de l'expression de la protéine ING3 dans les tissus tumoraux prostatiques, et de manière plus marquée dans les tumeurs hormono-résistantes. Enfin, un score immunohistochimique élevé pour ING3 était statistiquement associé à une survie globale plus courte qu'un score immunohistochimique faible.

### 3- Impact de l'expression de la protéine ING3 sur l'activité transcriptionnelle et le cycle cellulaire.

Dans un premier temps, par le biais d'une analyse transcriptionnelle par technique microarray, nous avons pu identifier des variations de l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et la voie de signalisation EGFR dans un modèle de lignée humaine de cancer de prostate dont l'expression d'ING3 avait été réduite par approche si-ARN. Les gènes identifiés ont été validés par une

analyse indépendante qPCR. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'impact de la perte d'expression d'ING3 dans un panel de lignées tumorales humaines. De manière cohérente avec les résultats précédents, celle-ci était associée à une diminution de la prolifération cellulaire. L'analyse complémentaire du cycle cellulaire par cytométrie de flux a démontré l'existence d'une augmentation de la proportion de cellules en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> et du ratio G<sub>1</sub>/S dans différentes lignées tumorales (origine prostatique, mammaire et ovarienne) dont l'expression d'ING3 a été diminuée expérimentalement.

#### 4- ING3 régule l'expression de gène sensible aux androgènes et de gène de réponse à p53.

L'analyse par microarray a aussi permis d'identifier 15 gènes décrits comme sensibles aux androgènes et dont l'expression variait selon le niveau d'expression de la protéine ING3 dans notre modèle expérimental. La variation d'expression de ces gènes a été validée de manière indépendante. De plus, selon le même processus, l'expression de 20 gènes impliqués dans la réponse à p53 était influencée par le niveau d'expression de la protéine ING3 (validation indépendante par approche qPCR). Parmi ces gènes, on notera l'augmentation de l'expression du gène *BAX* ou encore la diminution de l'expression de *CDKN1A*.

#### 5- Le domaine PHD de ING3 est essentiel à l'interaction avec l'histone H3K4.

Afin de décrire précisément les mécanismes moléculaires par lesquels ING3 contrôle la transcription génique, nous avons créé des vecteurs codant des protéines ING3 porteuses de mutations concernant les acides aminés situés dans le domaine PHD (W385 et Y362) prédits pour interagir avec les histones selon une analyse *in silico*. En utilisant ces vecteurs, et par le biais de plusieurs méthodes d'immunoprécipitation protéique, nous avons pu montrer que l'acide aminé W385 est important pour l'interaction entre ING3 et l'histone H3. Comme cela avait été décrit pour ING1 et ING2, l'affinité d'ING3 pour l'histone H3 augmente selon l'ajout de groupe méthyle sur sa lysine en position 4.

#### 6- ING3 s'associe au site d'initiation de la transcription de CDKN1A.

Puisque la marque histone H3K4me<sub>3</sub> est classiquement associée aux sites de départ de la transcription (TSS), nous avons vérifié par méthode de CHIP, l'enrichissement protéique d'ING3 sur le TSS de certains gènes cibles. Nous avons montré que la protéine ING3 s'associe spécifiquement au TSS du gène *CDKN1A*, mais aussi *CCDN1* et *PCNA* grâce à l'interaction avec H3K4me<sub>3</sub> *via* son domaine PHD. À l'opposé, nous n'avons pas identifié la protéine ING3 au niveau des ARE des gènes impliqués dans la réponse aux androgènes, suggérant dans ce cas précis un mécanisme de régulation indirect. Au-delà

du travail de rédaction sur le manuscrit, les expériences de CHIP ont été ma principale contribution à la partie expérimentale à ce travail.

En conclusion, ces travaux révèlent pour la première fois un rôle oncogénique à la protéine ING3. L'augmentation de l'expression de la protéine ING3 est corrélée à une majoration de la prolifération cellulaire selon notre modèle expérimental et à un moins bon pronostic du cancer de la prostate en clinique. ING3 contrôle un réseau transcriptionnel complexe intéressant notamment des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et des gènes impliqués dans la réponse à p53 et aux androgènes. Ce contrôle s'exerce de manière directe *via* l'interaction du domaine PHD de la protéine ING3 avec l'histone H3K4 au niveau des sites d'initiation de la transcription en ce qui concernent certains gènes cibles contrôlant le cycle cellulaire. En revanche, l'impact semble plus indirect concernant les gènes impliqués dans la réponse aux androgènes.

À la lumière de ces résultats originaux, concordant avec d'autres observations de la littérature, nous avons proposé de modifier le nom original de la protéine ING3 « INhibitor of Growth 3 » au profit de l'appellation « INducer of Growth 3 ».

Keywords: ING3; H3K4<sup>me3</sup>; chromatin; methylated histones; prostate cancer

# Human *ex vivo* prostate tissue model system identifies ING3 as an oncoprotein

Urszula L McClurg<sup>1,6</sup>, Arash Nabbi<sup>2,3,6</sup>, Charles Ricordel<sup>4,6</sup>, Svitlana Korolchuk<sup>1</sup>, Stuart McCracken<sup>1</sup>, Rakesh Heer<sup>1</sup>, Laura Wilson<sup>1</sup>, Lisa M Butler<sup>5</sup>, Bronwyn Kate Irving-Hooper<sup>1</sup>, Rémy Pedeux<sup>4</sup>, Craig N Robson<sup>1</sup>, Karl T Riabowol<sup>\*2,3,7</sup> and Olivier Binda<sup>\*1,7,8</sup>

<sup>1</sup>Newcastle Cancer Centre at the Northern Institute for Cancer Research, Newcastle University, Newcastle-upon-Tyne NE2 4HH, England; <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Calgary, Calgary, AB T2N 1N4, Canada; <sup>3</sup>Department of Oncology, University of Calgary, Calgary, AB T2N 1N4, Canada; <sup>4</sup>Université Rennes 1, CLCC Eugène Marquis, INSERM ERL440-OSS, Rue Bataille Flandres Dunkerque, Batiment D, 1er étage, Rennes 35042, France and <sup>5</sup>School of Medicine and Freemasons Foundation Centre for Men's Health, University of Adelaide, South Australian Health and Medical Research Institute, Adelaide, SA 5005, Australia

**Background:** Although the founding members of the INhibitor of Growth (ING) family of histone mark readers, ING1 and ING2, were defined as tumour suppressors in animal models, the role of other ING proteins in cellular proliferation and cancer progression is unclear.

**Methods:** We transduced *ex vivo* benign prostate hyperplasia tissues with inducible lentiviral particles to express ING proteins. Proliferation was assessed by H3S10<sup>phos</sup> immunohistochemistry (IHC). The expression of ING3 was assessed by IHC on a human prostate cancer tissue microarray (TMA). Gene expression was measured by DNA microarray and validated by real-time qPCR.

**Results:** We found that ING3 stimulates cellular proliferation in *ex vivo* tissues, suggesting that ING3 could be oncogenic. Indeed, ING3 overexpression transformed normal human dermal fibroblasts. We observed elevated levels of ING3 in prostate cancer samples, which correlated with poorer patient survival. Consistent with an oncogenic role, gene-silencing experiments revealed that ING3 is required for the proliferation of breast, ovarian, and prostate cancer cells. Finally, ING3 controls the expression of an intricate network of cell cycle genes by associating with chromatin modifiers and the H3K4<sup>me3</sup> mark at transcriptional start sites.

**Conclusions:** Our investigations create a shift in the prevailing view that ING proteins are tumour suppressors and redefine ING3 as an oncoprotein.

In 2012, it was estimated that >1 million men were diagnosed with prostate cancer (PC) and 307 000 died from it worldwide, placing PC as the fifth leading cause of death from cancer in men (excluding non-melanoma skin cancers) (Ferlay *et al*, 2015). PC initiation and progression depend on androgens and the androgen receptor (AR) (Wong *et al*, 2014; Ferraldeschi *et al*, 2015). Although androgen-deprivation-based therapies (termed chemical castration) initially benefit most patients, PC inevitably recurs but in a castrate-resistant and invariably fatal form. Current PC diagnosis incorporates assessment of prostate-specific antigen (PSA) levels in patient sera with

trans-rectal ultrasound-guided prostate biopsies. However, PSA thresholds are unreliable and biopsies are misdiagnosed in about 30–50% of cases. Although the recently developed urinary PCA3 (PC gene 3) and PSA-based prostate health index blood tests offer alternative assessment methods and multiparametric magnetic resonance imaging improves tumour detection, novel, more reliable prognostic biomarkers are still required. Thus a better understanding of the molecular mechanisms driving PC is vital.

The INhibitor of Growth (ING) family of chromatin readers was established over 20 years ago with the identification of the tumour-

\*Correspondence: Dr O Binda; E-mail: olivier.binda@mail.mcgill.ca or Professor KT Riabowol; E-mail: karl@ucalgary.ca

Received 28 July 2017; revised 9 November 2017; accepted 14 November 2017; published online 30 January 2018



suppressor ING1 (Garkavtsev *et al*, 1996). ING proteins regulate access to genetic information in part through associating with the histone H3 trimethylated on lysine 4 (H3K4<sup>me3</sup>) active gene expression mark and tethering enzymatic activities to facilitate (e.g. ING4 via the acetyltransferase HBO1; Hung *et al*, 2009) or to restrict (e.g. ING2 via the deacetylase HDAC1; Shi *et al*, 2006) access to genetic information. The interaction with H3K4<sup>me3</sup> is mediated via a plant homeodomain (PHD) located at the carboxy terminus of each ING protein. Although ING1 and ING2 associate with the mSIN3A/HDAC1 histone deacetylase complex, ING3, ING4, and ING5 associate with either TIP60, HBO1, or MOZ histone acetyltransferase complexes (Doyon *et al*, 2006). Of note, ING3 is required along with EPC1 for full TIP60 histone acetyltransferase activity on nucleosomes (Doyon *et al*, 2004). In addition, ING3 is part of the ANP32E histone exchange complex (Obri *et al*, 2014), which is similar to the core ING3/TIP60 complex (Doyon *et al*, 2004, 2006). Given that ING1 and ING2 associate with histone deacetylases (HDACs), they are believed to principally function as transcriptional repressors, while ING3-5 would function as transcriptional activators (Bua and Binda, 2009).

Initially identified as a transcriptional co-activator that associates with the Tat transactivating factor from human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) (Kamine *et al*, 1996), TIP60 (Tat interactive protein, 60 kDa) was rapidly found to have histone acetyltransferase (HAT) activity (Yamamoto and Horikoshi, 1997) and to potentiate the transcriptional activity of AR (Brady *et al*, 1999). As an integral part of the TIP60 complex, we hypothesised that ING proteins could have an unsuspected role in AR signalling, potentially regulating a transcriptional network and cellular proliferation. We thus established an inducible expression system to screen ING proteins for proliferative potential in an *ex vivo* human prostate tissue model and identified ING3 as an inducer of growth. Then, we measured ING3 levels in benign tissues compared with matched cancer samples and found that elevated ING3 levels correlate with treatment resistance and poor survival, corroborating *in vitro* assays suggesting that ING3 has oncogenic properties. Indeed, ING3 expression was sufficient to transform normal human cells as assessed by anchorage-independent growth. Gene expression profiling identified several cell cycle regulatory genes as well as AR- and p53-responsive genes, whose expression was altered in the absence of ING3. The silencing of ING3 in breast cancer, ovarian cancer, and PC cell line models led to inhibition of proliferation characterised by a G<sub>1</sub>/S arrest accompanied by an induction of apoptosis. Mechanistically, ING3 associates with chromatin modifiers and H3K4<sup>me3</sup> at the transcriptional start site (TSS) of cell cycle genes to regulate gene expression. Collectively, we show that ING3 associates with gene promoters to regulate a transcriptional network that is required for cellular proliferation. Importantly, ING3 elevated copy number and protein levels in cancer patients, particularly in treatment-resistant patients, designate ING3 as a novel marker of poor survival for cancer patients and an unsuspected oncoprotein. We thus propose to rename the INHibitor of Growth 3 the INDucer of Growth 3 to retain the gene name while highlighting the potential of ING3 to promote cellular proliferation.

## MATERIALS AND METHODS

**Antibodies and plasmids.** The cDNA of human ING3 was cloned by PCR from total RNA extracted from the MCF7 cell line using forward 5'-GGCCAGATCTTTGTACCTAGAACTATCTGGA-3' and reverse 5'-AGGACTCGAGTTATTTGTGTCTGCTGCCTCT-3' primers, inserted in pCMV-3Tag-1A (Stratagene, Agilent, CA, USA) in frame with the 3xFLAG tag. The 3xFLAG-tagged ING3 cDNA was also inserted in the pLVX Lenti-X Tet-One inducible

expression system (Clontech, Takara, France) using the In-Fusion HD enzyme (Clontech). The mouse monoclonal  $\alpha$ -ING3 antibody was previously described and extensively characterised (Nabbi *et al*, 2015). The anti- $\alpha$ -tubulin and  $\alpha$ -FLAG antibodies, as well as  $\alpha$ -FLAG M2-agarose were purchased from Sigma (Gillingham, UK). The HRP-conjugated  $\alpha$ -GST (ab3416),  $\alpha$ -H3 (ab1791),  $\alpha$ -H3K4<sup>me3</sup> (ab8580), and  $\alpha$ -TIP49A (ab133513) antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK).

**Cell culture, transfections, and lentiviral transductions.** LNCaP, CWR22Rv1, MCF7, and PC3 cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), while MX-1, PEO1, and PEO4 cells were obtained from the Northern Institute for Cancer Research authenticated cell bank. Cells were maintained in RPMI 1640 media supplemented with 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Paisley, UK) and 10% (v/v) foetal calf serum (FCS) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. LNCaP-AI variant cell line was derived in-house by culturing LNCaP cells in steroid-depleted media to allow for the development of androgen independence (Lu *et al*, 1999). Cell lines were maintained for up to 30 passages or a maximum of 2 months of continuous culturing. As per institutional policy, cell lines were tested for mycoplasma on a tri-monthly basis. For p53 ChIP experiments, U2OS were maintained in modified McCoy's 5A medium supplemented with GlutaMAX and 10% FCS. Proliferation was measured by live cell imaging four times a day with the Incucyte system for 114 h postsilencing. Lentiviral particles were generated by co-transfecting HEK293T with pLVX-3xFLAG-ING3 (ING3<sup>WT</sup>, ING3<sup>Y362A</sup>, or ING3<sup>W385A</sup>), pMD2.G, and psPAX2 (latter two were gifts from Didier Trono; Addgene (Cambridge, UK) 12260 and 12259, respectively) and used as described previously (O'Neill *et al*, 2014). The expression of FLAG-ING3 was induced using doxycycline at 10 ng ml<sup>-1</sup>.

**Ex vivo culture.** Benign prostatic hyperplasia (BPH) samples were obtained from cancer-free patients as established by the Pathology Department at the Freeman Hospital (Newcastle upon Tyne, UK). The tissue samples were obtained with full ethical approval from Newcastle & North Tyneside 1 NHS Strategic Health Authority Local Research Ethics Committee (reference 15/NE/0400). All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. BPH samples were removed surgically following patient's written informed consent and placed in ice-cold culture media. Within 48 h from the surgery, tissues were dissected to 1 mm<sup>3</sup> pieces and cultured in duplicates on gelatin sponges (Spongostan, Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA) presoaked in culture media supplemented with 1 × antimycotic solution (Sigma), 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> hydrocortisone, and 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> insulin solution from bovine pancreas (Sigma) as previously described (Centenera *et al*, 2012). *Ex vivo* explants were transduced with empty vector (pLVX) or FLAG-ING3 lentiviral particles in media supplemented with 10 ng ml<sup>-1</sup> of doxycycline and tissues were cultured for 72 h. At the termination of the experiments, samples were immediately placed in 4% formalin for 1 h followed by processing in ethanol then xylene and finally paraffin embedding. Formalin-fixed paraffin-embedded tissues were stained as indicated and scored automatically using the Aperio imaging system (Milton Keynes, UK). Error bars represent s.e.m. of three independent patient samples.

**Anchorage-independent growth.** Normal human dermal fibroblasts (NHDF) were isolated from juvenile foreskin (PromoCell C-12300, Heidelberg, Germany) and maintained in fibroblast growth medium (PromoCell C-23010). NHDF were transduced with lentiviral particles, ING3 expression was induced with doxycycline (10 ng ml<sup>-1</sup>), and 48 h later cultured in fibroblast media containing 0.56% methylcellulose. Fibroblasts were seeded at a density of 2500 cells per well in a 24-well plate and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 14 days followed by imaging with IncuCyte



and automated colony counting. Transformation assays with 3T3-L1 murine fibroblasts were performed essentially as with NHDF but were seeded at 250 cells per well in a 24-well plate.

**siRNA gene silencing and gene expression analysis.** The *ING3* targeting siRNA sequences were (no.1) CAAUCACCAUGCU-CAUUCA[dTdT] and (no.2) CUAUAGAAUGGUUCCAUA [dTdT]. Cells were transfected with siRNA using RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and incubated in culture media for 96 h prior to cell lysis and analysis by immunoblotting or real-time qPCR using specific primers (sequences available in Supplementary Table S1). For real-time qPCR, total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen, 15596-026), RNA quality and yields were assessed using a NanoDrop 2000 (NanoDrop, UK), 1 µg of total RNA was reverse transcribed using SuperScript VILO (Invitrogen, 11755-050), and qPCR was performed using QuantiTect SYBR Green (QIAGEN, 204143, Manchester, UK) on an ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data were tested for parametric distribution. Parametric data were analysed using appropriate *t*-tests or ANOVA with Bonferroni's comparison test for multiple group comparisons. Non-parametric data were analysed using Wilcoxon signed-rank test. By convention, *P*-values are marked as follows; \*\*\**P* < 0.001, \*\**P* < 0.01, and \**P* < 0.05.

**Microarray.** LNCaP cells were transfected with siRNA and cultured in steroid-depleted media for 72 h followed by 24 h stimulation with 10 nM dihydrotestosterone (DHT). Total RNA was extracted (RNeasy Plus, QIAGEN) and its purity confirmed both using the NanoDrop and Bioanalyser. Samples were processed on the Illumina Human HT-12 platform by High Throughput Genomics (The Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford, UK) and analysed using the GenomeStudio software (Illumina, Cambridge, UK). Experiments consisted of four independent biological repeats of scrambled control-, siRNA no.1-, or siRNA no.2-treated samples. Analysis was performed by comparing *ING3* siRNA to scrambled siRNA and results compiled.

**Immunohistochemistry.** Tissue microarrays (TMA) containing 0.6 mm cores of benign prostatic hyperplasia (BPH) (*n* = 41), PC (*n* = 81), and control tissues, including breast, kidney, placenta, ovary, and liver, were used (Coffey *et al.*, 2013). These samples were obtained with full ethical approval from the Northumberland, Tyne, and Wear NHS Strategic Health Authority Local Research Ethics Committee (reference 2003/11). Antigens were retrieved by pressure cooking the TMA in 10 mM citrate pH 6.0 followed by staining the tissues with an extensively validated (Nabbi *et al.*, 2015) mouse monoclonal α-ING3 antibody. The TMA were independently scored by 2 individuals using the 0–300 *H*-score method (Kirkegaard *et al.*, 2006). Briefly, percentage and intensity of staining for positive cells was estimated (0, 1, 2, 3) using the following equation  $H\text{-score} = (\% \text{ of cells with low-level positivity}) + 2 \times (\% \text{ of cells with medium-level positivity}) + 3 \times (\% \text{ of cells with high-level positivity})$ .

**Flow cytometry.** Cell cycle profiles were generated by propidium iodide (PI) staining; cells were permeabilised with 1% Triton X-100 and incubated with 1 µg ml<sup>-1</sup> RNaseA and PI followed by analysis using a BD FACScan, as described previously (Burska *et al.*, 2013). Levels of apoptosis were analysed after 96 h of gene silencing by Annexin V assay (BD, Oxford, UK) according to the manufacturer's instructions and analysed using a BD FACScan. Cells were stained for both Annexin V and PI positivity and, during analysis, divided into quarters representing normal cells, necrotic cells, and apoptotic cells.

**Chromatin immunoprecipitation.** LNCaP cells were maintained in steroid-depleted media for 72 h followed by stimulation with

10 nM DHT for 120 min. Then ChIP were performed as described previously (Gaughan *et al.*, 2002). To quantify the binding of AR or ING3 at ARE or TSS, we performed real-time qPCR on ChIPed DNA using specific primers (sequences available in Supplementary Table S2). Data are represented as percentage of input fold change ( $\% \text{ input} = 100 \times 2^{(CT_{\text{input}} - CT_{\text{ChIP}})}$ ); CT refers to cycle threshold.

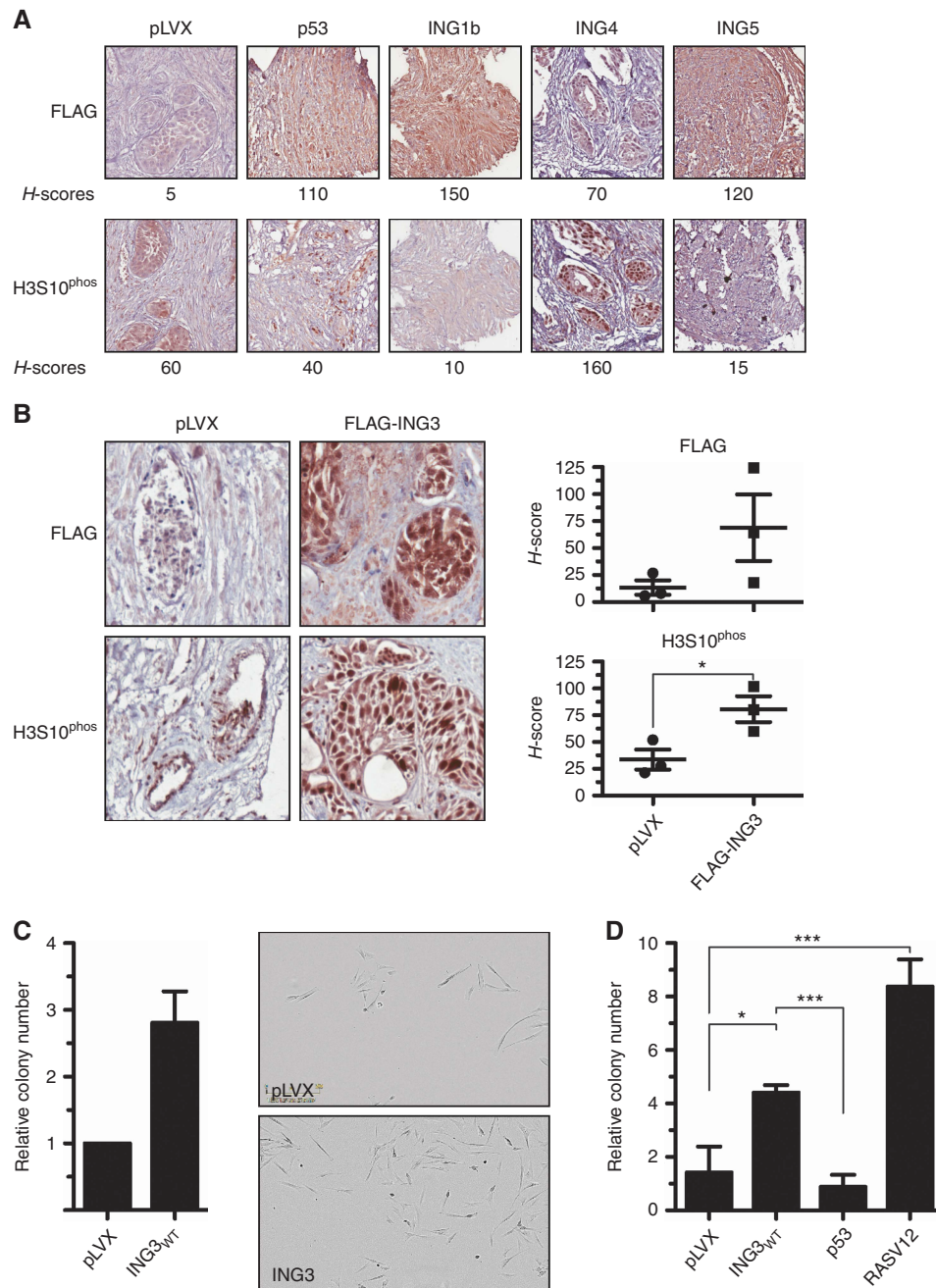
## RESULTS

**ING3 functions as an oncoprotein.** By maintaining native tissue architecture, including epithelia and stroma, *ex vivo* 3D culture of intact tissues is a more representative and robust disease model of cancer than cell line or animal xenograft models (Centenera *et al.*, 2012; Centenera *et al.*, 2013). To evaluate the proliferative role of ING proteins, we used a doxycycline-inducible lentiviral system composed of a minimal CMV promoter regulated by tetracycline-response elements (TRE). *Ex vivo* tissue cultures of benign prostate hyperplasia (BPH) tissues isolated from three different cancer-free patients were transduced with lentiviral particles and exposed to doxycycline to induce the expression of full-length wild-type FLAG-tagged ING proteins or FLAG-p53, as a known tumour-suppressor control. The expression of INGs and proliferation (mitosis) marker H3S10<sup>phos</sup> were assessed by IHC. In agreement with ING1b being a tumour suppressor, H3S10<sup>phos</sup> levels were decreased similarly to p53 compared with the empty vector control (Figure 1A). Interestingly, samples expressing ING4 had increased levels of H3S10<sup>phos</sup>, while H3S10<sup>phos</sup> was lower in ING5 samples (Figure 1A). These results confirm the tumour-suppressive functions of ING1b and suggest that ING4 may have pleiotropic roles (i.e., reported to be a tumour suppressor but appears to stimulate proliferation in prostate tissues).

Strikingly, ING3-transduced tissues had high levels of H3S10<sup>phos</sup> (not shown) thus, as ING3 associates with the AR co-activator TIP60, we extended our investigations and transduced ING3 in *ex vivo* tissues from three additional patients and confirmed that ING3 expression enhances H3S10<sup>phos</sup> levels (Figure 1B), suggesting that ING3 has oncogenic properties. To test the hypothesis that ING3 may be an oncoprotein, we expressed ING3 in NHDF in a classical anchorage-independent growth assay. In agreement with these observations, ING3 expression in NHDF was sufficient to stimulate anchorage-independent growth (Figure 1C), suggesting cellular transformation and further supporting the notion that ING3 is an oncoprotein. To further validate ING3 oncogenic properties, transformation assays were also performed in 3T3-L1 murine fibroblasts using p53 as an established tumour-suppressor control and RASV12 as an established oncoprotein control. As expected, p53-expressing cells did not form colonies, while RASV12-expressing cells formed colonies (Figure 1D). Importantly, ING3 expression also led to colony formation (Figure 1D), confirming that ING3 expression does transform cells.

**Elevated ING3 expression is a marker of poor prognosis in cancer patients.** Analysis of various cancer databases (Cerami *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013) showed a significant increase in the copy number of *ING3* in breast cancer, melanoma cancer, ovarian cancer, and PC patients. A more thorough analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) database showed that an increased copy number of *ING3* correlates with development of prostate adenocarcinoma (Supplementary Figure S1A). These results suggest that ING3 may have a role in PC initiation or progression. We thus compared *ING3* copy number with the disease outcome and observed that patients with increased *ING3* copy number were less likely to undergo remission (Supplementary Figure S1B) and relapsed earlier (Supplementary Figure S1C). These results imply a



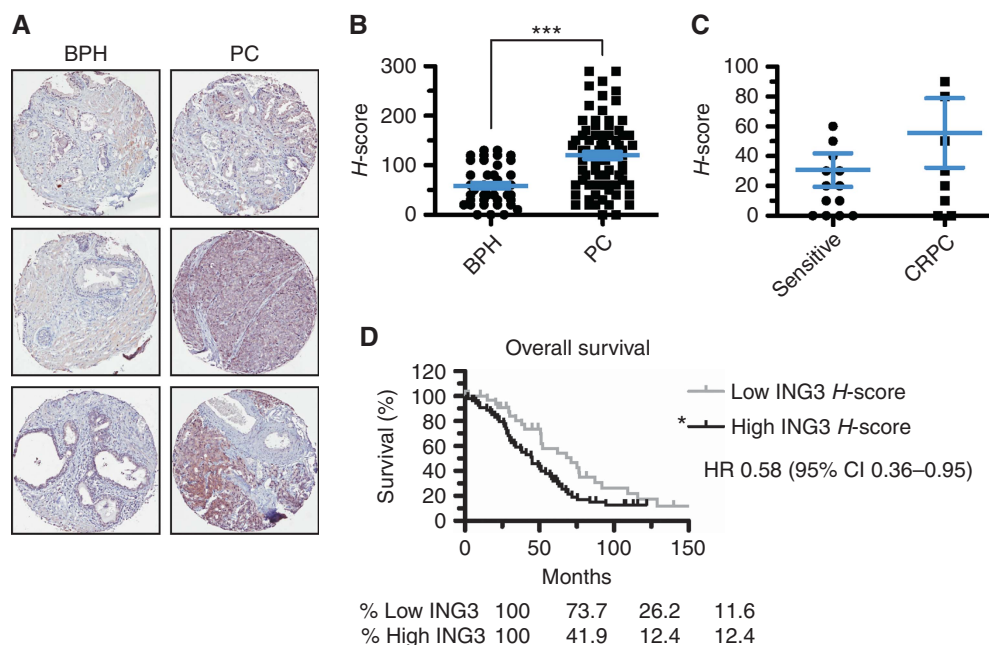


**Figure 1.** Ex vivo screen and transformation assays. **(A)** Ex vivo patient BPH tissues were transduced with negative control vector pLVX, positive control FLAG-p53, or FLAG-INGs. The expression of these genes was induced with doxycycline. Tissues were fixed and processed for staining by IHC for H3S10<sup>phos</sup> or FLAG. **(B)** Ex vivo patient benign tissues were transduced with control (pLVX) or FLAG-tagged ING3-expressing lentiviral particles. The expression of proliferation marker H3S10<sup>phos</sup> and ING3 was assessed by IHC. **(C)** Normal human fibroblasts were transduced with pLVX or FLAG-ING3 and anchorage-independent growth assessed by colony-formation assays in methylcellulose. The transformation assays were performed in three independent experiments and combined in one graphic with representative pictures. **(D)** As in panel **(C)** but performed in 3T3-L1 cells. By convention, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , and NS indicates not significant, as calculated by t-test. When not indicated,  $P$ -values are not significant. ING=INhibitor of Growth.

correlation between the amplification of *ING3* and poor outcome for PC patients and a potential application of *ING3* as a biomarker.

To further investigate the expression of *ING3* in PC tissues, we used an extensively characterised and validated *ING3* antibody, which was also optimised for IHC (Nabbi *et al*, 2015). Specifically, we examined *ING3* protein levels by IHC analysis of a TMA (described previously; Coffey *et al*, 2013) from BPH and PC specimens (Figure 2A) and observed elevated protein levels of *ING3* in PC when compared with BPH samples (Figure 2B). In

addition, *ING3* levels were found to be elevated in treatment-resistant compared with castration-sensitive PC patients (Figure 2C). Elevated *ING3* protein levels also correlated with decreased overall survival (Figure 2D). Finally, we observed that *ING3* levels in the TMA samples correlate with an increase in proliferation markers MCM2, Ki-67, and Geminin (Supplementary Figures S1D–F). Together, our data indicate that *ING3* copy number and *ING3* protein levels correlate with cellular proliferation and that *ING3* could be used as a biomarker of poor prognosis



**Figure 2.** The expression of ING3 is a poor prognostic marker for PC patients. (A) Prostate tissue microarray (TMA) were stained for ING3 by immunohistochemistry (B) TMA were scored for positive staining (histoscore or *H*-score). Data represent *H*-score for ING3 staining of PC ( $n = 81$ ) samples and BPH ( $n = 41$ ) samples.  $***P < 0.001$ . (C) ING3 *H*-scores comparison between castration sensitive ( $n = 14$ ) and castrate-resistant prostate cancer (CRPC) patients ( $n = 9$ ). (D) Kaplan–Meier overall survival curve based on patients with low ( $n = 35$ ) or high ( $n = 55$ ) ING3 protein levels ( $*P$ -value of 0.03). All error bars represent the s.e.m. BPH = benign prostatic hyperplasia; ING = INhibitor of Growth; PC = prostate cancer.

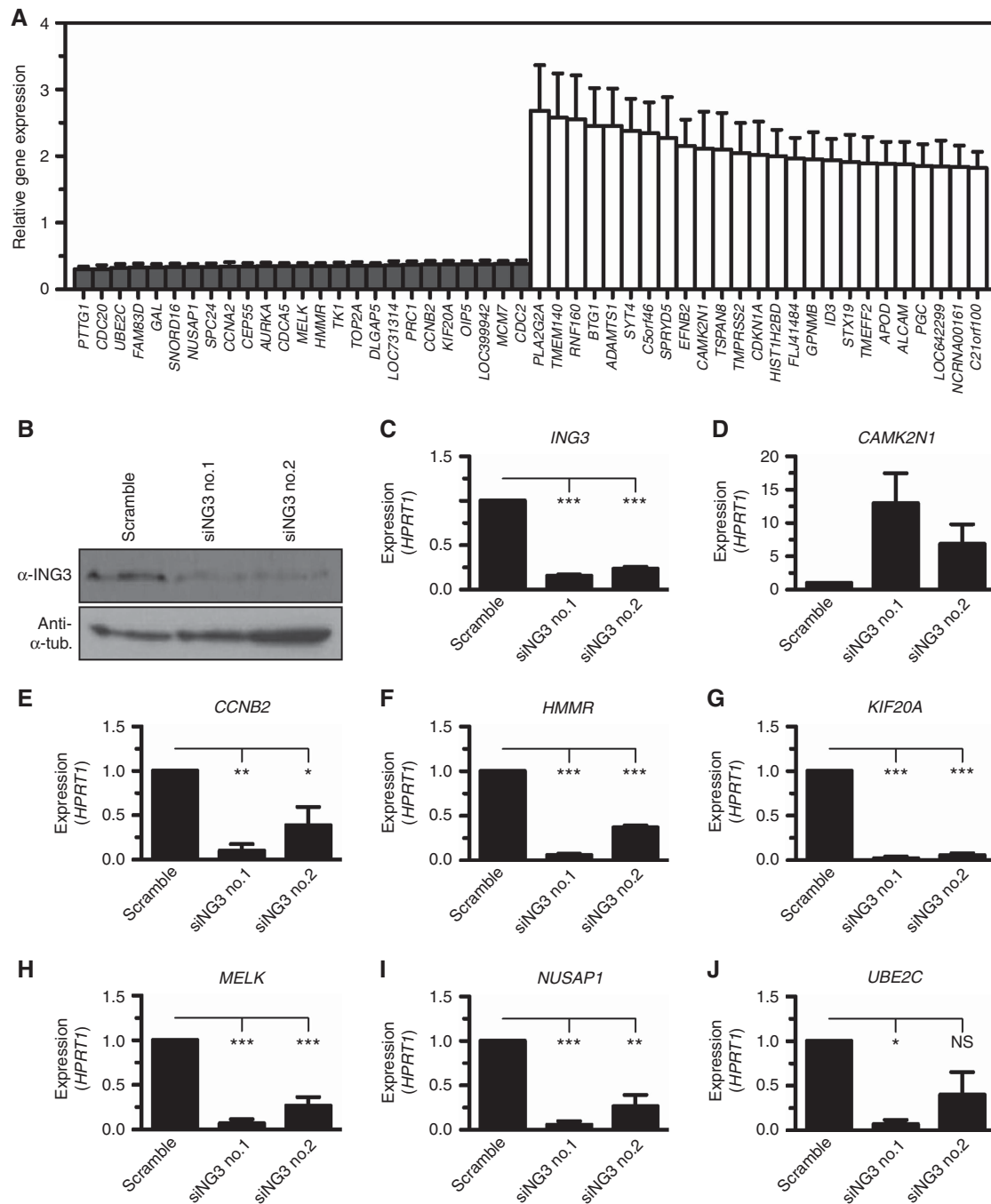
in PC. Our data strikingly indicate that ING3 does not behave as a tumour suppressor but rather as an oncoprotein.

**Identification of an ING3 transcriptional network.** As ING3 associates with methylated histones and chromatin-modifying enzymatic complexes and to understand how ING3 may function as an oncoprotein, we performed a microarray gene expression analysis. Given that ING3 is a potential AR co-regulator, we addressed the question whether ING3 was required for AR-dependent transcription upon androgen stimulation. Following the rationale that DHT would have a minimal impact on AR-independent transcription, the microarray survey was performed on androgen-stimulated LNCaP cells. To validate the specificity of the siRNAs used, the microarray data for each gene was plotted and the overlay of both siING3 no.1 and siING3 no.2 showed nearly identical gene expression profiles (Supplementary Figure S2). Upon silencing the expression of ING3 in the LNCaP PC cell line, we identified a number of genes that were either upregulated or downregulated (see Supplementary Table S3 for complete list). Among the top 25 downregulated genes, cell cycle regulators *CCNA2*, *CCNB2*, *CDC2*, *CDC20*, and *AURKA* were identified (Figure 3A). The silencing of ING3 was confirmed by immunoblotting using an extensively validated antibody (Nabbi *et al*, 2015) (Figure 3B) and real-time qPCR (Figure 3C). Importantly, only a single band appeared on immunoblots and decreased upon ING3 silencing (Figure 3B). Interestingly, the expression of *MELK* highly correlates with cell cycle genes *AURKB*, *CCNB2*, *TOP2A*, and *UBE2C*, which are upregulated in high-grade PC (Kuner *et al*, 2013) and appear to form a transcriptional network whose expression requires ING3 (Figure 3A), suggesting that ING3 regulates this pathway. Similarly, the expression of several genes from the EGFR inside-out pathway (*CCNB2-HMMR-KIF11-NUSAP1-PRC1-SLC2A1-UBE2C*) (Zhou *et al*, 2015) require the expression of ING3 (Figure 3A). The requirement of ING3 for the expression of these genes was validated by real-time qPCR (Figures 3D–J). Although ING3 associates with histone acetyltransferase activity and thus should mainly function as a transcriptional

activator, we observed that a number of genes were upregulated in the absence of ING3, including *CAMK2N1* (Figure 3A and D), a gene that inhibits proliferation of PC cells (Wang *et al*, 2014a, b), the cyclin-dependent kinase inhibitor *CDKN1A* ( $p21^{CIP1/WAF1}$ ), and the antiproliferative gene *BTG1* (Figure 3A). Together, these results demonstrate that ING3 directly or indirectly regulates genes involved in cell cycle progression and cell survival.

**Silencing of ING3 expression regulates genes associated with cell cycle progression and slows cellular proliferation.** In agreement with ING3-stimulating cellular proliferation (Figure 2E), close to half of the genes found to be affected by the depletion of ING3 are involved in cell cycle progression, including cyclin A (*CCNA2*) (Figure 3A and 4A). Also, about a quarter are DNA-binding factors, and a small, but significant, portion of genes regulate cell death. We validated by real-time qPCR the increased expression of *CDKN1A* (Figure 4B) and *CDKN1B* (Figure 4C) in PC and breast cancer cells.

Although the exogenous expression of ING3 in various cell lines presumably induces proliferation defects (Nagashima *et al*, 2003; Chen *et al*, 2010), little is known about the roles of ING3 in the control of cellular proliferation and the molecular mechanisms underlying its functions. To determine the potential role of ING3 in regulating cellular proliferation, we silenced the expression of ING3. Consistent with *ex vivo* experiments (Figure 1B), silencing the expression of ING3 reproducibly led to severe proliferation defects in PC cells. Specifically, LNCaP (DHT sensitive (DHT<sup>S</sup>)) cells treated with either siING3 no.1 or no.2 barely proliferated over a 5-day period (Figure 4D). Interestingly, silencing of ING3 expression had comparable consequences on the proliferation of the androgen-independent LNCaP-AI (DHT<sup>I</sup>) isogenic cell line (Supplementary Figure S3). Similarly, the proliferation of PC (CWR22Rv1 and PC3), breast cancer (MCF7 and MX-1), and ovarian cancer (PEO1 and PEO4) cell lines (see Supplementary Table S4 for characteristics) were also affected by silencing of ING3 (Supplementary Figure S3). To further investigate the potential causes of cellular proliferation defects induced by the silencing of

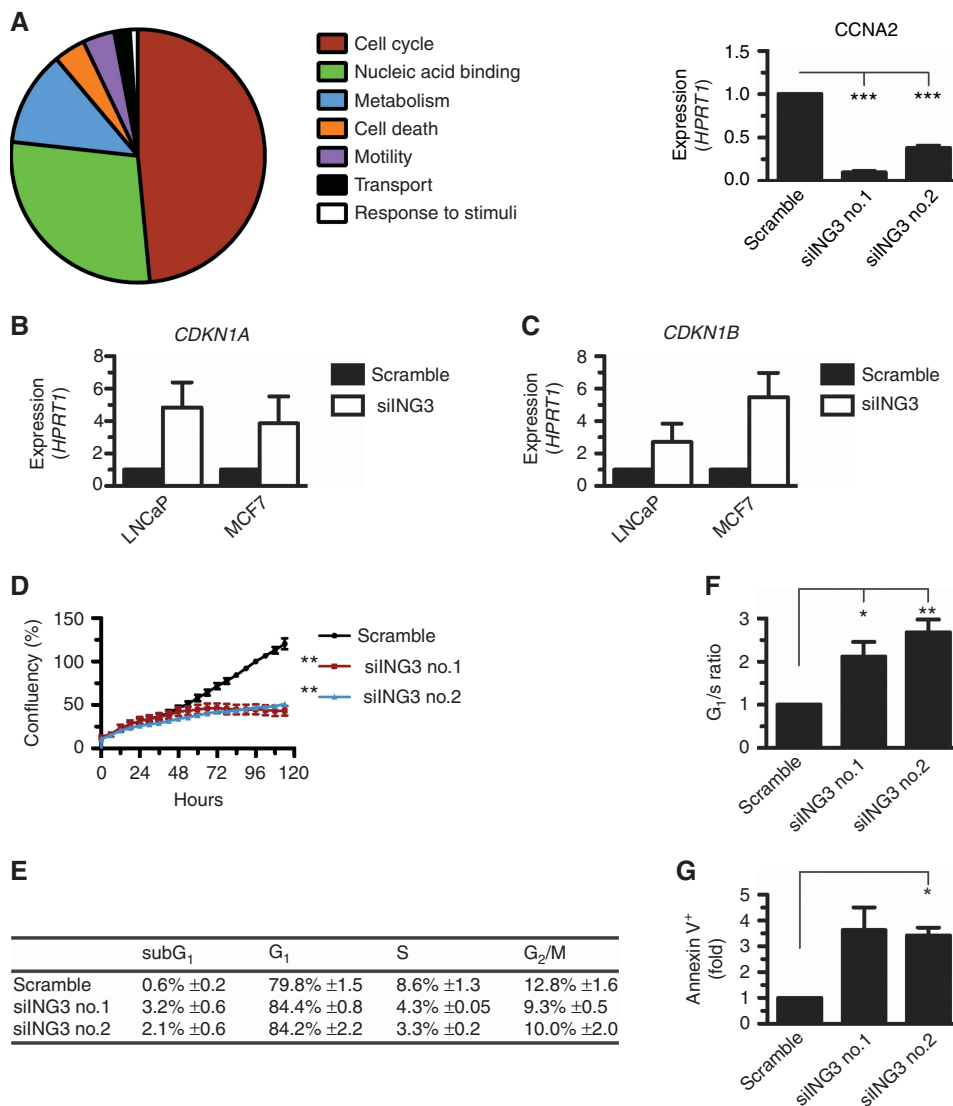


**Figure 3. Identification of an ING3 transcriptional network.** (A) The expression of *ING3* was silenced in the LNCaP cell line using two different siRNA in four independent biological replicates, total RNA isolated, and hybridised on Illumina Human HT-12 arrays. The top 25 downregulated and top 25 upregulated genes were plotted. (B) Silencing of *ING3* was assessed by immunoblotting using the indicated antibodies. (C) Silencing of *ING3* was confirmed by real-time qPCR. (D–J) Hits from the microarray analysis were validated by standard real-time qPCR on reverse transcribed total RNA isolated from control (Scramble siRNA) or *ING3*-silenced (siING3 no.1 and siING3 no.2) LNCaP cells. Expressed values are the average of three biological replicates, each performed in technical triplicate, normalised to the expression of *HPRT1*, with s.e.m. as error bars (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , and NS indicates not significant, as calculated by *t*-test). ING=INhibitor of Growth.

*ING3*, we performed cell cycle analysis of the LNCaP cell line. In agreement with slower proliferation rates (Figure 4D), *ING3*-silenced cells had a marked increase in the  $G_0/G_1$  phase population accompanied by lower S and  $G_2/M$  populations (Figure 4E). The increased  $G_0/G_1$  population translates into an increase in  $G_1/S$  ratio (Figure 4F), a hallmark of cell cycle arrest. Furthermore, we observed a small but consistent increase in the sub $G_1$  population (Figure 4E), suggesting that the silencing of *ING3* may induce apoptosis. Indeed, Annexin V staining of *ING3*-silenced cells

showed a threefold increase in apoptotic cells (Figure 4G), consistent with severely reduced proliferation as well as accumulation of  $G_1/S$  and sub $G_1$  populations (Figures 4D–F). These results demonstrate that *ING3* is essential for the proliferation of a broad range of cancer cell types, further demonstrating the oncogenic properties of *ING3*.

**ING3 regulates the expression of androgen-responsive genes.** Hypothetically, *ING3* could regulate AR-dependent transcription



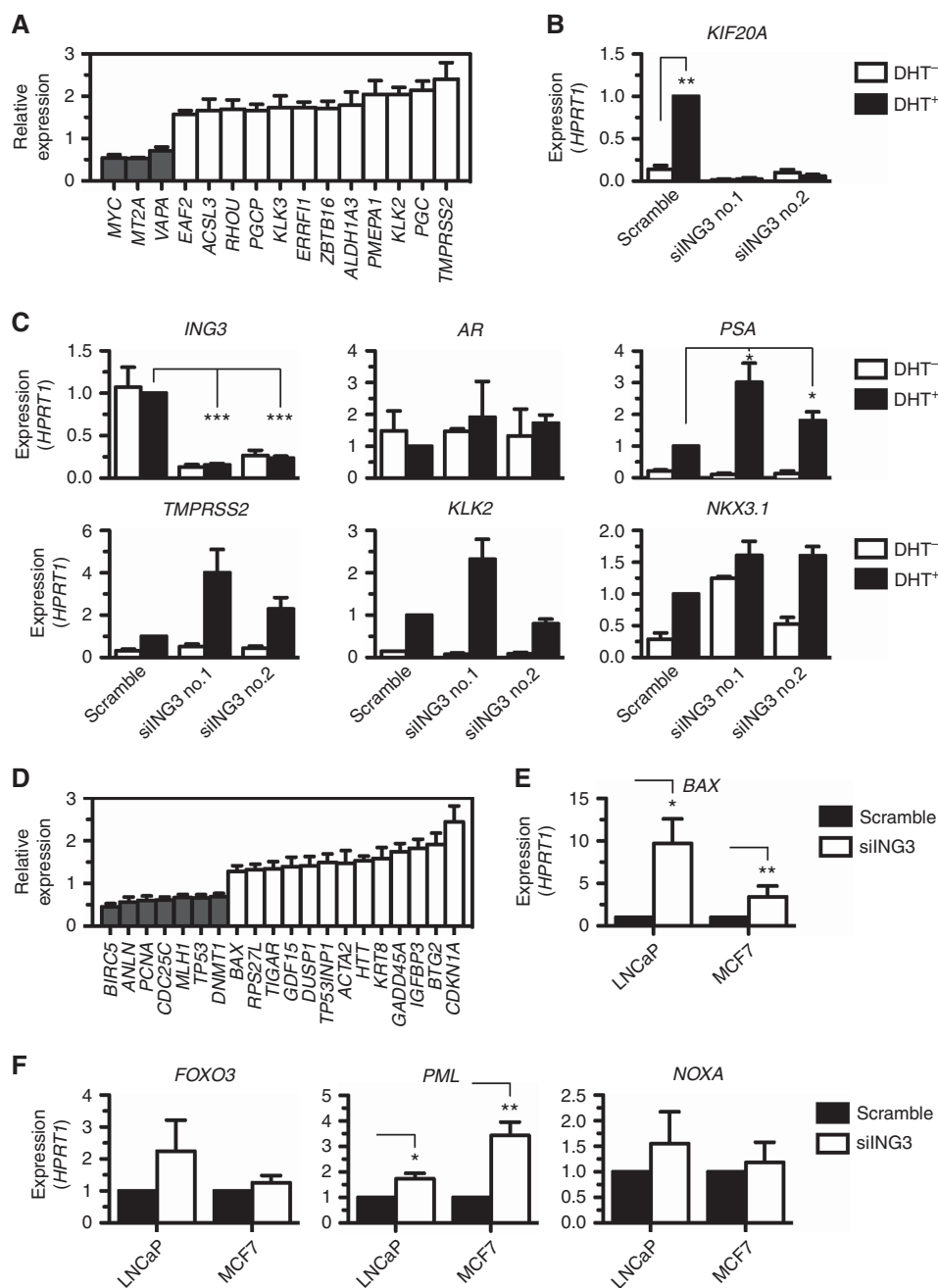
**Figure 4. ING3 regulates genes associated with cell cycle progression.** (A) Gene ontology analysis of downregulated genes upon silencing of ING3. A major fraction of genes requiring ING3 for expression is involved in cell cycle regulation. For instance, the expression of cyclin A (*CCNA2*) is impaired in the absence of ING3. (B) The expression of *CDKN1A* assessed by real-time qPCR on reverse transcribed total RNA isolated from control (Scramble) or ING3-silenced (siING3) prostate (LNCaP) and breast (MCF7) cells. (C) As in (B) but for *CDKN1B*. (D) Proliferation of control (Scramble siRNA) or ING3-silenced (siING3 no.1 and siING3 no.2) LNCaP cells was monitored for 5 consecutive days by IncuCyte. Data were analysed using Wilcoxon signed-rank test. (E) Flow cytometric analysis of control (Scramble siRNA) or ING3-silenced (siING3 no.1 and siING3 no.2) LNCaP cells was conducted and (F) G<sub>1</sub>/S ratio was calculated. (G) Control (Scramble siRNA) or ING3-silenced (siING3 no.1 and siING3 no.2) LNCaP cells were stained for Annexin V and analysed by flow cytometry. By convention, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, and NS indicates not significant, as calculated by *t*-test. When not indicated, *P*-values are not significant.

via the acetyltransferase TIP60 (Brady *et al*, 1999; Doyon *et al*, 2004, 2006), which regulates cellular proliferation and the expression of cell cycle genes. We thus performed an extensive survey of known AR-regulated genes from the ING3 transcriptional network. We identified three genes requiring the expression of ING3 for normal expression and a dozen that were stimulated in the absence of ING3 (Figure 5A). To assess whether androgens affect ING3-regulated genes, all validation experiments were performed with and without DHT. Interestingly, through validation of the microarray analysis, we identified a novel androgen-responsive gene, *KIF20A*, which is stimulated by DHT, but requires ING3 for expression (Figure 5B). Reduced levels of ING3 (Figure 5C) did not affect the expression of the *AR* itself (Figure 5C) but nonetheless appeared to further stimulate the DHT-induced expression of androgen-responsive genes such as *PSA* (*KLK3*), *TMPRSS2*, and *KLK2* (only with siING3 no.1)

(Figure 5C), while having inconclusive effects on the expression of other androgen-responsive genes, such as *NKX3.1* (Figure 5C).

**ING3 regulates the expression of a subset of p53-responsive genes.** Given the potential role of ING3 in the regulation of p53-dependent transcription (Nagashima *et al*, 2003), which also regulates the expression of cell cycle genes, proliferation, and apoptosis, we compared known p53-responsive genes (Riley *et al*, 2008) to the list of genes identified in the ING3 transcriptional network (highlighted in Supplementary Figure S4). Out of the 129 known p53-responsive genes (Riley *et al*, 2008), 7 were downregulated (5%) and 13 upregulated (10%) following the silencing of ING3 expression (Figure 5D). The increased expression of *BAX* (Figure 5D) was validated by real-time qPCR in both LNCaP and breast cancer MCF7 cell lines (Figure 5E). Notably, the induced expression of *CDKN1A* (Figure 5D) had already been validated in

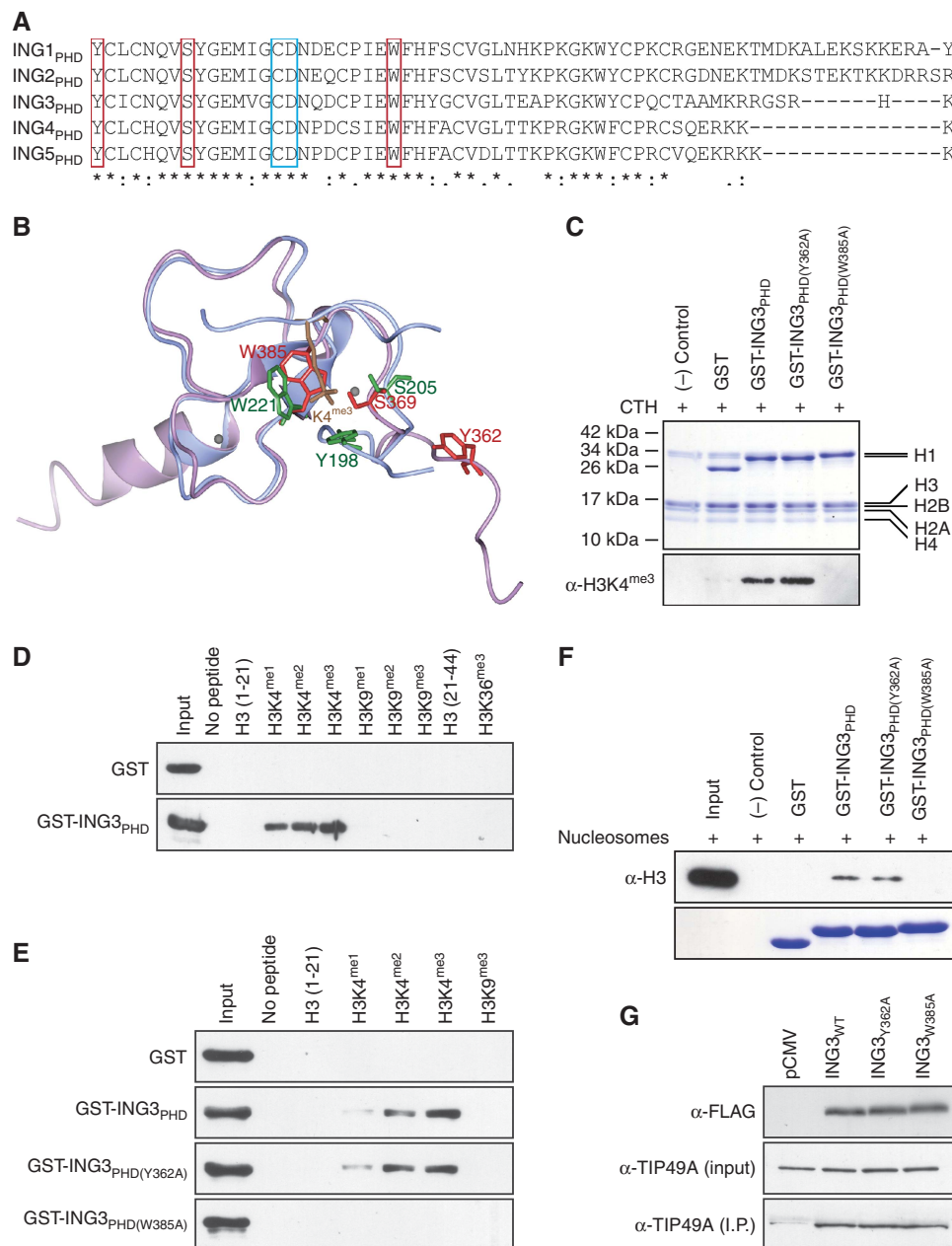




**Figure 5.** ING3 regulates a subset of AR-responsive genes and p53-responsive genes. **(A)** The microarray gene expression analysis identified a number of AR-target genes that are regulated by ING3. **(B)** A novel androgen-responsive gene *KIF20A* was found to be regulated by ING3. **(C)** The silencing of *ING3* in the absence (DHT<sup>-</sup>) or presence (DHT<sup>+</sup>) of androgen stimulation was assessed by real-time qPCR. The expression of AR was measured in *ING3*-depleted cells. Validation by real-time qPCR of the effect of *ING3* depletion on the expression of known AR-responsive genes. **(D)** The microarray gene expression analysis identified a number of *ING3*-regulated genes that are known p53-responsive genes. **(E)** The expression of p53-responsive gene *BAX* was assessed from LNCaP and MCF7 cells by real-time qPCR. **(F)** Validation by real-time qPCR of the effect of *ING3* depletion on the expression of known p53-responsive genes in LNCaP and MCF7 cells. All experiments were conducted three times ( $n=3$  biological replicates) in triplicate (technical replicates). The values represent the average of  $n=3$  with s.e.m. as error bars. By convention, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , and NS indicates not significant, as calculated by t-test. When not indicated,  $P$ -values are not significant.

LNCaP and MCF7 (Figure 4B). The expression of other p53-regulated genes not identified in the microarray analysis was also investigated. In particular, we found that the transcription of *FOXO3*, *PML*, and *NOXA* was activated by the silencing of *ING3* in LNCaP (Figure 5F), whereas only *PML* was induced in MCF7 (Figure 5F). These results, alongside published work (Nagashima *et al*, 2003), suggest that *ING3* functions as a p53 co-factor for a subset of genes.

**Characterisation of *ING3* interaction with H3K4<sup>me3</sup>.** As the PHD of *ING* proteins has a central role in controlling proliferation, survival, and other cellular functions, we investigated this key region within *ING3*. The PHD of *ING3* (*ING3*<sub>PHD</sub>) shares extensive primary amino-acid sequence similarity with other family members (Figure 6A). Specifically, tyrosine 362 (Y362), serine 369 (S369), and tryptophan 385 (W385) (Figure 6A, red boxes) are perfectly conserved with amino acids that form an



**Figure 6.** The aromatic cage of ING3 mediates interactions with H3K4<sup>me3</sup>. **(A)** Alignment of the PHD from all the members of the ING family. Amino acids boxed in red form the aromatic cage that encloses the side chain of H3K4<sup>me3</sup>, while amino acids boxed in blue restrain the unmodified side chain of H3R2. \**P* < 0.05. **(B)** The structure of ING3<sub>PHD</sub> (lilac) was predicted using Phyre<sup>2</sup> and overlaid with the published structure of H3K4<sup>me3</sup>-bound ING4<sub>PHD</sub> (blue). **(C)** The aromatic cage amino acids Y362 and W385 of ING3 were converted to alanine. The ING3<sub>PHD</sub> and aromatic cage mutants ING3<sub>PHD</sub>(Y362A) and ING3<sub>PHD</sub>(W385A) were expressed in *Escherichia coli* BL21, affinity purified, and used in pull-down assays to assess the interaction between ING3<sub>PHD</sub> and calf thymus histones (CTH). The top panel represents a Coomassie stained gel showing the level of ING3<sub>PHD</sub> forms and CTH used (input). The lower panel represents an α-H3K4<sup>me3</sup> immunoblot of a representative pull-down experiment. **(D)** GST or GST-ING3<sub>PHD</sub> were incubated with the indicated biotinylated histone peptides and pulled down using streptavidin-sepharose. Histone peptide-bound GST proteins were detected by immunoblotting using an α-GST antibody. **(E)** As in **(D)** but ING3<sub>PHD</sub>(Y362A) and ING3<sub>PHD</sub>(W385A) were also used. **(F)** GST pull-down assay as in **(C)**, but crude nucleosomes isolated from HEK293T cells were used. Binding of ING3<sub>PHD</sub> to nucleosomes was assessed by immunoblotting using α-H3 (top) and the level of ING3<sub>PHD</sub> forms was assessed by Coomassie staining. **(G)** HEK293T were transfected with empty vector (pCMV) or FLAG-tagged ING3-expressing constructs, as indicated, and α-FLAG immunoprecipitates were analysed with α-FLAG or α-TIP49A antibodies.

H3K4<sup>me3</sup>-binding aromatic cage in other ING proteins (Shi *et al*, 2006; Hung *et al*, 2009). Thus we predicted the structure of ING3<sub>PHD</sub> using Phyre<sup>2</sup> (Kelley and Sternberg, 2009) and superimposed it with the structure of ING4<sub>PHD</sub>-bound to H3K4<sup>me3</sup> using CCP4mg (McNicholas *et al*, 2011) (Figure 6B). The overlay of ING3<sub>PHD</sub> and ING4<sub>PHD</sub> suggests that Y362, S369, and W385 of

ING3 would indeed form an aromatic cage similar to ING4 and thus mediate interactions with H3K4<sup>me3</sup>. To confirm their role in H3 binding, the Y362 and W385 sites were converted to alanine **(A)** and used to investigate the interaction between ING3<sub>PHD</sub> and histones purified from calf thymus. This experiment confirmed that the PHD of ING3 does bind to histone H3 (Figure 6C).

In addition, the failure of ING3<sub>PHD</sub>[W385A] to bind to H3 (Figure 6C) suggests that the aromatic amino-acid residue is responsible for interactions with H3K4<sup>me3</sup>, as predicted (Figures 6A and B). However, ING3<sub>PHD</sub>[Y362A] retained wild-type H3-binding capacity (Figure 6C). The interaction between ING3<sub>PHD</sub> and H3 was further investigated using synthetic H3 peptides harboring mono-, di-, or tri-methyl groups at K4 or K9, as well as unmodified or tri-methylated H3K36. As expected, ING3<sub>PHD</sub> specifically bound the methylated H3K4 forms, with an affinity increasing (H3<sup>unmod</sup> < H3K4<sup>me1</sup> < H3K4<sup>me2</sup> < H3K4<sup>me3</sup>) concomitantly with the methylation state of K4 (Figure 6D). Interestingly, both ING3<sub>PHD</sub> and ING3<sub>PHD</sub>[Y362A] associated more stably with H3K4<sup>me2/3</sup>, while the ING3<sub>PHD</sub>[W385A] mutant completely failed to interact with any histone modifications assessed (Figure 6E). Similar interaction results were obtained between ING3 and nucleosomes, where ING3<sub>Y362A</sub> retained wild-type binding to H3, whereas ING3<sub>W385A</sub> failed to associate with H3 (Figure 6F). For subsequent gene expression and chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments, it is worth mentioning that both ING3<sub>Y362A</sub> and ING3<sub>W385A</sub> forms retain wild-type capacity to associate with subunits of the TIP60 complex, such as TIP49A (Figure 6G). Together, these results establish that the PHD of ING3 associates with methylated H3K4 and requires conserved amino-acid residues that, based on sequence similarities to other ING protein and structure prediction, form an aromatic cage.

**ING3 associates with the TSS of cell cycle genes.** We have so far demonstrated that ING3 is required for the expression of an intricate transcriptional network involved in regulating the proliferation of cancer cells. However, ING3 may directly or indirectly regulate the expression of these genes. We thus performed ChIP experiments to investigate the association of ING3 with genes that were identified in our gene expression survey (Figure 3). Also, as the PHD of ING3 binds H3K4<sup>me3</sup> (Figure 6), a modification marking the TSS of most genes (Barski *et al*, 2007), and a similar molecular mechanism for the regulation of gene expression was described for ING2 (Shi *et al*, 2006) and ING4 (Hung *et al*, 2009), we investigated that region in particular. Upon induction of ING3 expression (Figures 7A and B), the expression of *BAX*, *KLK2*, *TMPRSS2*, and *CDKN1A* (genes induced in ING3-silenced cells) was repressed (Figures 7C–F). Interestingly, ING3<sub>WT</sub> and ING3<sub>Y362A</sub> were found at the TSS of *CDKN1A*, while the H3K4<sup>me3</sup>-defective mutant ING3<sub>W385A</sub> was absent from this region (Figure 7G). Importantly, all ING3 forms were absent from a control region situated approximately 500 base pairs upstream (–500 bp) of the TSS (Figure 7H). In agreement with ING3 repressing the expression of *CDKN1A*, inhibition of HDAC activity with trichostatin A (TSA) completely relieved ING3-mediated transcriptional repression of *CDKN1A* (Figure 7I). An HDAC-dependent and TSA-sensitive transcriptional repression mechanism was further explored, and we found that ING3 associates with HDAC1 (Figure 7J). Given that ING proteins often cooperate with p53, we investigated whether p53 and ING3 could occupy the same sites on the *CDKN1A* promoter in U2OS human osteosarcoma cells (wild-type p53). Interestingly, ChIP experiments revealed that both p53 and ING3 occupied the TSS of *CDKN1A* (Figure 7K). Moreover, in response to DNA damage induced by doxorubicin, p53 vacated the TSS while ING3 bound more avidly (Figure 7K). Despite this dynamic occupancy at the TSS, ING3 did not occupy the p53-binding site upstream of *CDKN1A* (Figure 7K).

In addition, further supporting the role of ING3 in regulating the expression of cell cycle genes, ING3 was also found at the TSS of *CCND1* and *PCNA* but remained undetectable at both the androgen response element (ARE) ARE<sub>III</sub> of *PSA* and the ARE of *KLK2* (Supplementary Figure S5). Interestingly, the presence of AR at the ARE of *KLK2* was reduced when ING3 was expressed

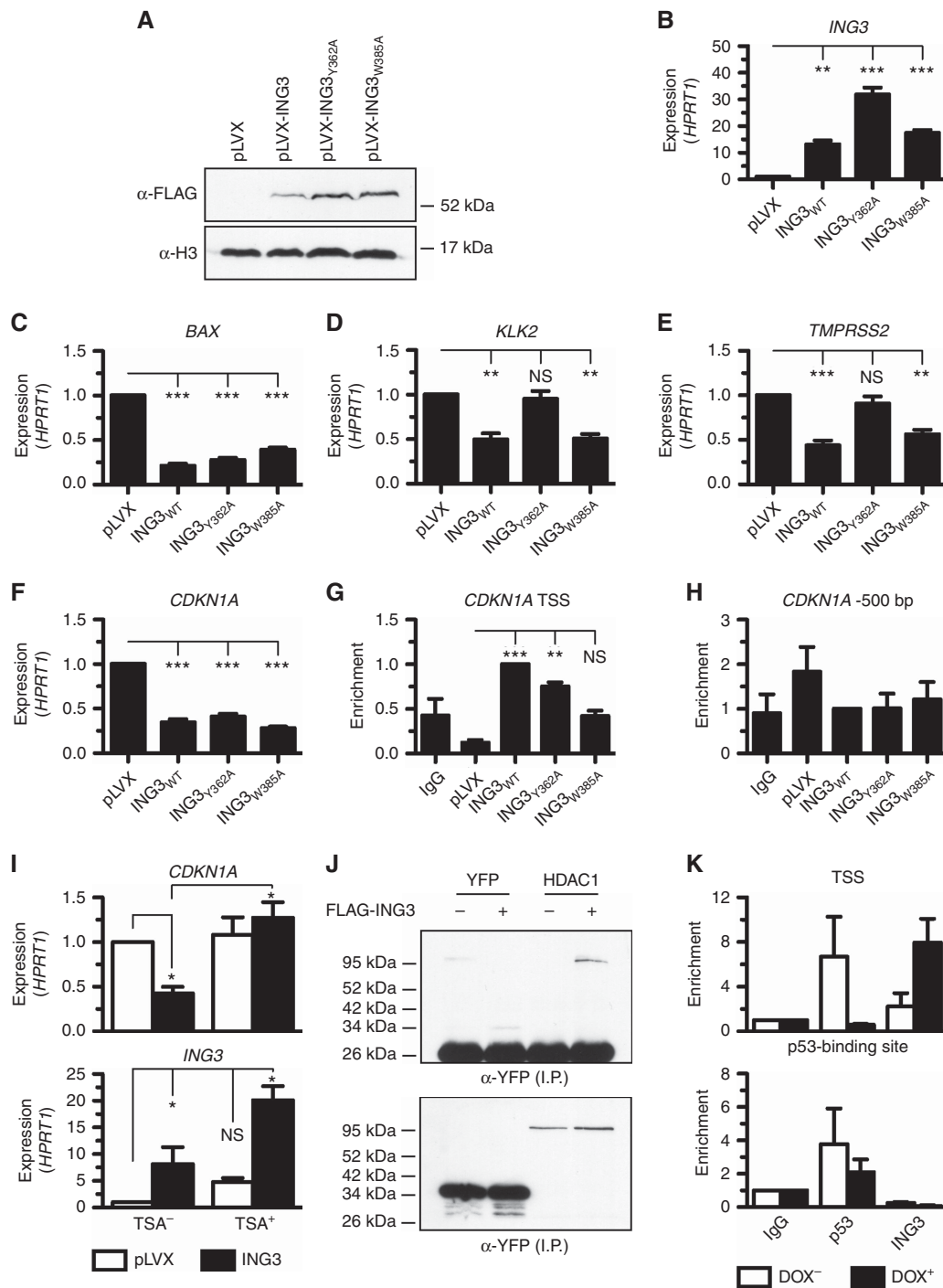
(Supplementary Figure S5), potentially explaining the increased *KLK2* expression observed in ING3-silenced cells (Figure 5C). These results suggest that ING3 indirectly regulates the expression of AR-regulated genes (e.g., *KLK2* and *PSA*). However, ING3 also appears to use a direct mechanism to regulate gene expression involving the binding to H3K4<sup>me3</sup> at the TSS of cell cycle genes (e.g. *CDKN1A*) to regulate their expression. Taken together with the histone interaction studies (Figure 6), these results demonstrate that ING3 associates with H3K4<sup>me3</sup> at the TSS of cell cycle genes via its PHD to regulate gene expression.

In conclusion, ING3 associates with TSSs to regulate the expression of an intricate transcriptional network involving cell cycle genes as well as AR- and p53-dependent genes to control the proliferation of cancer cells. Elevated levels of ING3 correlate with increased cellular proliferation and lower survival of PC patients and, as such, represents a novel marker of poor prognosis for PC patients and herein redefined as an oncoprotein.

## DISCUSSION

Genetic deletion of the *Ing1* locus in a mouse model leads to early onset and increased incidence of lymphomas (Kichina *et al*, 2006). The *Ing1*<sup>−/−</sup> animals also harbour increased sensitivity to  $\gamma$ -radiation (Kichina *et al*, 2006). Deletion of the p37Ing1 isoform in a mouse model causes spontaneous development of follicular B-cell lymphomas (Coles *et al*, 2007). Similarly, the *Ing2*<sup>−/−</sup> animals have a threefold higher incidence of soft-tissue sarcomas (Saito *et al*, 2010), providing concrete evidence that at least Ing1 and Ing2 are bona fide tumour suppressors. However, the evidence that ING3-5 are tumour suppressors is minimal and largely based on adenovirus delivery and supraphysiological overexpression or correlative expression studies. Indeed, silencing of *ING4* prevents the transition from the G<sub>2</sub>/M phase to G<sub>1</sub> phase of the cell cycle, while silencing of *ING5* results in S-phase blockade (Doyon *et al*, 2006). Moreover, the *Ing4*<sup>−/−</sup> mouse model does not develop cancer under reported experimental conditions (Coles *et al*, 2010), suggesting that these proteins are not tumour suppressors, or have complex yet unidentified cellular functions. Indeed, as recently reported by one of our groups, ING3 is expressed preferentially in proliferating cells (Nabbi *et al*, 2015), suggesting that ING3 may not inhibit growth but rather drive cellular proliferation. In agreement, we have found elevated levels of ING3 in various cancers and using an *ex vivo* human tissue explant model demonstrated that ING3 does have oncogenic properties by stimulating cellular proliferation. Precisely, our data demonstrate that (i) ING3 levels are elevated in PC patients and correlate with poor outcome; (ii) ING3 is required for the proliferation of breast cancer, ovarian cancer, and PC cell lines; and (iii) ING3 expression is sufficient to elicit anchorage-independent growth. Together, these results strongly suggest that ING3 functions as an oncoprotein.

Herein we have identified ING3 as a cellular proliferation-regulating factor. Interestingly, loss of ING3 expression led to decreased expression of *MELK*, *UBE2C*, *TOP2A*, *CCNB2*, and *AURKB*. These genes have been reported to be highly expressed in high-grade PC patients (Kuner *et al*, 2013), while *CAMK2N1* forms a transcriptional network with *NUSAP*, *UBE2C*, and *HMMR* whose expression regulates proliferation of treatment-resistant cancer cells (Wang *et al*, 2014a). In addition, the silencing of ING3 expression led to proliferation defects in a wide array of cancer cell models, including treatment-sensitive and -resistant PC cell lines, suggesting that inactivation of ING3 functions could be a viable therapeutic avenue to eliminate cancer cells in early as well as in advanced cases.



**Figure 7. ING3 associates with H3K4<sup>me3</sup> at TSSs.** (A) A tetracycline-inducible system was used to express FLAG-tagged ING3 (predicted molecular weight of ~50 kDa) forms in LNCaP cells. (B) The expression of *ING3*, (C) *BAX*, (D) *KLK2*, (E) *TMPRSS2*, and (F) *CDKN1A* was assessed by real-time qPCR from total RNA isolated from ING3-expressing LNCaP cells. (G) ChIP experiments of FLAG-ING3 at the TSS of *CDKN1A* using a FLAG antibody. (H) As in (G), but real-time qPCR assay was performed at a control region about 500 base pairs (-500 bp) from the TSS of *CDKN1A* (\*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, and NS indicates not significant, as calculated by *t*-test). (I) FLAG-ING3 was expressed as in (B–F), but in the absence (TSA<sup>-</sup>) or presence (TSA<sup>+</sup>) of the histone deacetylase Trichostatin A (TSA), then the expression of *CDKN1A* was assessed by real-time qPCR. (J) FLAG-ING3 and YFP-HDAC1 were co-expressed in HEK293T cells, immunoprecipitated with α-FLAG M2 agarose, and analysed by immunoblotting using α-GFP antibody (recognises all GFP variants). (K) ChIP experiments were conducted in U2OS cells in the absence (DOX<sup>-</sup>) or presence (DOX<sup>+</sup>) of doxorubicin. By convention, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, and NS indicates not significant, as calculated by *t*-test. When not indicated, *P*-values are not significant. ING = INhibitor of Growth; TSS = transcriptional start site.

Notably, silencing of *ING3* resulted in decreased *AURKA* and *AURKB* expression (Supplementary Table S3), two H3S10 kinases, in agreement with increased H3S10<sup>phos</sup> in cells expressing *ING3* (Figure 1B).

Consistent with previous studies (Kim *et al*, 2016) showing that the *ING3*<sub>PHD[Y362A]</sub>-H3K4<sup>me3</sup> interaction has a *K<sub>d</sub>* of 46 μM, compared with 0.9 μM for *ING3*<sub>PHD</sub>-H3K4<sup>me3</sup>, 3.0 μM for *ING3*<sub>PHD</sub>-H3K4<sup>me2</sup>, and 23 μM for *ING3*<sub>PHD</sub>-H3K4<sup>me1</sup>, we found



that ING3<sub>PHD[Y362A]</sub> retains H3K4<sup>me3</sup>-binding capacity (Figures 6C, E, and F). Interestingly, the ING3<sub>PHD[S369A]</sub>-H3K4<sup>me3</sup> interaction, with a  $K_d$  of 1.5  $\mu$ M, also retains binding capacity (Kim *et al.*, 2016). Although highly conserved, Y362 is dispensable for the ING3<sub>PHD</sub>-H3K4<sup>me3</sup> interaction, unlike the corresponding Y198 in ING4<sub>PHD</sub> (Hung *et al.*, 2009) or Y214 in ING2<sub>PHD</sub> (Shi *et al.*, 2006). The Phyre<sup>2</sup>-predicted structures of ING3<sub>PHD</sub> suggest that Y362 may be positioned away from the aromatic cage (Figure 6B and Supplementary Figure S6), leaving the binding burden on W385 and a different mode of interaction to methyl-lysine. Interestingly, the structure predictions including or excluding PNEPR peptide preceding Y362 suggest that the sequence located on the amino side of the PHD may be flexible and thus may fold upon binding to H3K4<sup>me3</sup>. Further structural biology investigations will be required to elucidate the precise mode of interaction between ING3<sub>PHD</sub> and H3K4<sup>me3</sup> and how it differs from other ING3s.

The importance of the role played by ING3 in tightly controlling cellular proliferation of cancer cells is also highlighted by the loss of expression of several cyclin genes (*CCNA2*, *CCNB1*, *CCNB2*, and *CCND1*) and gain of cell cycle inhibitors (*CDKN1A* and *CDKN1B*) as well as apoptotic genes (*BAX*) concomitant with the silencing of ING3. Importantly, ChIP analysis located ING3 at the TSS of genes upregulated (i.e., *CDKN1A*) and downregulated (e.g., *CCND1*) in the absence of ING3, demonstrating that ING3 has a direct role in controlling the expression of genes associated with cellular proliferation. However, as ING3-regulated genes can be either negatively or positively regulated in the absence of ING3, there would be more than one transcriptional mechanism involved. Potentially, ING3 may positively regulate gene expression via TIP60 histone acetyltransferase activity (Doyon *et al.*, 2004) and negatively regulate transcription via an ANP32E histone exchange mechanism (Obri *et al.*, 2014) or via HDAC1, which we found in association with ING3 (Figure 7J). Indeed, the ING3-mediated transcriptional repression of *CDKN1A* was completely relieved by the deacetylase inhibitor Trichostatin A (Figures 7I), demonstrating that ING3 can silence gene expression via histone deacetylation. Future investigations should address the acetylation state of histones at ING3-bound chromatin sites as well as the presence of histone variants deposited by ANP32E. Interestingly, according to the TCGA database and in agreement with our microarray analysis, the expression of several cell cycle genes correlated in a similar way with the expression of ING3 in human PC (Supplementary Figure S7). Although ING3 was previously reported to activate the p53-responsive gene *CDKN1A* using a transient luciferase reporter assays in colon carcinoma cells (Nagashima *et al.*, 2003; Doyon *et al.*, 2006), we observed that silencing of ING3 induced the expression of *CDKN1A* in breast cancer and PC cells (Figure 4B), whereas exogenous expression of ING3 driven by a doxycycline-inducible system repressed the expression of *CDKN1A* (Figures 7F and I). We can only speculate on the causes of these discrepancies, but they are most likely due to the different cell lines or systems used. Although several ING proteins have been reported to associate with p53, we failed to observe any interactions between p53 and ING3 in LNCaP cells under mild immunoprecipitation conditions. In ChIP experiments at *CDKN1A*, we found p53 at the p53-binding site, but ING3 was not detected. In addition, p53 could be detected at the TSS, while ING3 levels were low, but under stressed conditions, p53 was released and ING3 occupied the TSS more avidly (Figure 7K). Together, these results suggest that p53 and ING3 do not occupy chromatin regions at the same time in agreement with the observation that the two factors do not seem to interact.

Although ING3 associates with TIP60 (Doyon *et al.*, 2006) and AR (Nabbi *et al.*, 2017), this interaction occurs in the cytoplasm and regulates acetylation-dependent AR shuttling (Nabbi *et al.*, 2017). Moreover, although AR was present at the ARE of *KLK2*

and *KLK3* (PSA), ChIP experiments did not detect enrichment of ING3 at these sites (Supplementary Figure S5), suggesting that ING3 is not recruited via AR. Indeed, ING3 associates with the TSS (H3K4<sup>me3</sup> marked region) of genes while AR binds the ARE regions, thus suggesting that ING3 can also regulate AR-responsive transcription independently of AR. Indeed, our silencing experiments (Figures 4D–G and Supplementary Figure S3) clearly show that ING3 is required for the proliferation of both AR<sup>+</sup> (e.g., LNCaP) and AR<sup>-</sup> (e.g., PC3) cells, demonstrating that ING3, although able to regulate some AR-responsive genes, regulates cell proliferation through AR-independent pathways. Indeed, ING3 regulates the expression of p53-responsive genes (Figures 5D–F) as well as several cell cycle genes (Figure 4A).

Although the ING3 siRNAs had consistent effects on most AR-responsive genes (e.g., *KIF20A*, *PSA*, *TMPRSS2*), they had different effects on *KLK2*. Interestingly, *KLK2* and *KLK3* (PSA) are located ~12 kb apart on chromosome 19. However, the chromatin landscape seems highly divergent. Specifically, a clear TSS (H3K4<sup>me3</sup> double peak) is found at *KLK2*, whereas no such regulatory element is found in the ENCODE project data at *KLK3* and very few transcription factors bind the *KLK3* locus compared with *KLK2*. We hypothesise that the difference in *KLK2* and *KLK3* response to ING3 siRNAs may be a reflection of different mechanisms regulating these genes.

In agreement with ING4 and ING5 being required for normal cell cycle progression (Doyon *et al.*, 2006), we observed that ING3 is also required for cellular proliferation of cancer cells. Importantly, our ING3-dependent proliferation results are in line with a recent publication showing that ING3 protein levels correlate with the proliferation status of cells (Nabbi *et al.*, 2015). Our data from cell line models showing the requirement of ING3 for the proliferation of cancer cells are also in agreement with the elevated levels of ING3 in a subset of tumours in cancer patients. The requirement of ING3 for the proliferation of breast cancer, ovarian cancer, and PC cells and its elevated levels in prostate tumours, which also correlate with poor survival, define ING3 as a novel marker of poor prognosis and a potential therapeutic target. Overexpression-based studies and sequence similarities to the tumour-suppressor ING1 led to the hypothesis that ING3 may be a tumour suppressor. However, our investigations using a more physiologically relevant *ex vivo* explant model define ING3 as an oncoprotein, which is supported by transformation and proliferation assays.

Although mutations of ING proteins are rarely reported (Cerami *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013), there are many cases of either amplification or deletion (Supplementary Figure S8). In agreement with our observations that ING3 levels are elevated in PC compared with BPH patient samples, most PC databases report ING3 amplification (Supplementary Figure S8). Interestingly, one case of mutation could be found in a PC patient, a nonsense mutation at E125, which likely results in a truncated form lacking the PHD and 70% of the protein.

Together, our data demonstrate that ING3 is required for proliferation of cancer cells via an intricate transcriptional network involving cell cycle regulators, androgen, and p53 signalling pathways. Importantly, elevated ING3 expression in cancer patients and correlation with poor survival support ING3 as a biomarker and potentially a therapeutic target in both early and advanced treatment-resistant cancer patients. Our results redefine ING3 as an INDucer of Growth (ING) and an oncoprotein.

## ACKNOWLEDGEMENTS

OB is supported by the Newcastle's Biomedical Fellowship Programme, which is in part funded through the Wellcome

Trust's Institutional Strategic Support Fund, and by the Breast Cancer Campaign charity grant number 2013MaySP005. ULM and CNR are supported by the JGWP Foundation (BH142412), Newcastle Healthcare Charity (JG/ML/0414), Prostate Cancer UK (PG09-23), and Cancer Research UK (C27826/A15994). SK is supported by the MRC (MR/N009738/1), while AN and KTR are supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant MOP-311094). We thank Byron Matthiopoulos for his assistance in the construction of pLVX lentiviral plasmids. Finally, an immense thank you to Laura Greaves, Luisa Wakeling, and Julia Whitehall for the 3T3-L1 cells.

<sup>6</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>7</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>8</sup>Current address: Institut NeuroMyoGène (INMG), Université Claude Bernard Lyon 1, Faculty of Medicine & Pharmacy, Lyon 69008, France.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**(4): 823–837.
- Brady ME, Ozanne DM, Gaughan L, Waite I, Cook S, Neal DE, Robson CN (1999) Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator. *J Biol Chem* **274**(25): 17599–17604.
- Bua DJ, Binda O (2009) The return of the ING3s, histone mark sensors and phospholipid signaling effectors. *Curr Drug Targets* **10**(5): 418–431.
- Burska UL, Harle VJ, Coffey K, Darby S, Ramsey H, O'Neill D, Logan IR, Gaughan L, Robson CN (2013) Deubiquitinating enzyme Usp12 is a novel co-activator of the androgen receptor. *J Biol Chem* **288**(45): 32641–32650.
- Centenera MM, Gillis JL, Hanson AR, Jindal S, Taylor RA, Risbridger GP, Sutherland PD, Scher HI, Raj GV, Knudsen KE, Yeadon T, Tilley WD, Butler LM (2012) Evidence for efficacy of new Hsp90 inhibitors revealed by ex vivo culture of human prostate tumors. *Clin Cancer Res* **18**(13): 3562–3570.
- Centenera MM, Raj GV, Knudsen KE, Tilley WD, Butler LM (2013) Ex vivo culture of human prostate tissue and drug development. *Nat Rev Urol* **10**(8): 483–487.
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* **2**(5): 401–404.
- Chen G, Wang Y, Garate M, Zhou J, Li G (2010) The tumor suppressor ING3 is degraded by SCF(Skp2)-mediated ubiquitin-proteasome system. *Oncogene* **29**(10): 1498–1508.
- Coffey K, Rogerson L, Ryan-Munden C, Alkharaf D, Stockley J, Heer R, Sahadevan K, O'Neill D, Jones D, Darby S, Staller P, Mantilla A, Gaughan L, Robson CN (2013) The lysine demethylase, KDM4B, is a key molecule in androgen receptor signalling and turnover. *Nucleic Acids Res* **41**(8): 4433–4446.
- Coles AH, Gannon H, Cerny A, Kurt-Jones E, Jones SN (2010) Inhibitor of growth-4 promotes IkappaB promoter activation to suppress NF-kappaB signaling and innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**(25): 11423–11428.
- Coles AH, Liang H, Zhu Z, Marfella CGA, Kang J, Imbalzano AN, Jones SN (2007) Deletion of p37Ingl1 in mice reveals a p53-independent role for Ing1 in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. *Cancer Res* **67**(5): 2054–2061.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry A-J, Côté V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang X-J, Côté J (2006) ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* **21**(1): 51–64.
- Doyon Y, Selleck W, Lane WS, Tan S, Côté J (2004) Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol* **24**(5): 1884–1896.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**(5): E359–E386.
- Ferraldeschi R, Welti J, Luo J, Attard G, de Bono JS (2015) Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects. *Oncogene* **34**(14): 1745–1757.
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* **6**(269): p11.
- Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K (1996) Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* **14**(4): 415–420.
- Gaughan L, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN (2002) Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem* **277**(29): 25904–25913.
- Hung T, Binda O, Champagne KS, Kuo AJ, Johnson K, Chang HY, Simon MD, Kutateladze TG, Gozani O (2009) ING4 mediates crosstalk between histone H3 K4 trimethylation and H3 acetylation to attenuate cellular transformation. *Mol Cell* **33**(2): 248–256.
- Kamine J, Elangovan B, Subramanian T, Coleman D, Chinnadurai G (1996) Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* **216**(2): 357–366.
- Kelley LA, Sternberg MJE (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**(3): 363–371.
- Kichina JV, Zeremski M, Aris L, Gurova KV, Walker E, Franks R, Nikitin AY, Kiyokawa H, Gudkov AV (2006) Targeted disruption of the mouse ing1 locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene* **25**(6): 857–866.
- Kim S, Natesan S, Cornilescu G, Carlson S, Tonelli M, McClurg UL, Binda O, Robson CN, Markley JL, Balaz S, Glass KC (2016) Mechanism of histone H3K4me3 recognition by the plant homeodomain of inhibitor of growth 3. *J Biol Chem* **291**(35): 18326–18341.
- Kirkegaard T, Edwards J, Tovey S, McGlynn LM, Krishna SN, Mukherjee R, Tam L, Munro AF, Dunne B, Bartlett JM (2006) Observer variation in immunohistochemical analysis of protein expression, time for a change? *Histopathology* **48**(7): 787–794.
- Kuner R, Falth M, Pressinotti NC, Brase JC, Puig SB, Metzger J, Gade S, Schafer G, Bartsch G, Steiner E, Klocker H, Sultmann H (2013) The maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) is upregulated in high-grade prostate cancer. *J Mol Med* **91**(2): 237–248.
- Lu S, Tsai SY, Tsai MJ (1999) Molecular mechanisms of androgen-independent growth of human prostate cancer LNCaP-AI cells. *Endocrinology* **140**(11): 5054–5059.
- McNicholas S, Potterton E, Wilson KS, Noble ME (2011) Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**(Pt 4): 386–394.
- Nabbi A, Almami A, Thakur S, Suzuki K, Boland D, Bismar TA, Riabowol K (2015) ING3 protein expression profiling in normal human tissues suggest its role in cellular growth and self-renewal. *Eur J Cell Biol* **94**(5): 214–222.
- Nabbi A, McClurg UL, Thalappilly S, Almami A, Mobahat M, Bismar TA, Binda O, Riabowol KT (2017) ING3 promotes prostate cancer growth by activating the androgen receptor. *BMC Med* **15**(1): 103.
- Nagashima M, Shiseki M, Pedoux RM, Okamura S, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Yokota J, Harris CC (2003) A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* **22**(3): 343–350.
- O'Neill DJ, Williamson SC, Alkharaf D, Monteiro ICM, Goudreaux M, Gaughan L, Robson CN, Gingras A-C, Binda O (2014) SETD6 controls the expression of estrogen-responsive genes and proliferation of breast carcinoma cells. *Epigenetics* **9**(7): 942–950.
- Obri A, Ouararhni K, Papin C, Diebold M-L, Padmanabhan K, Marek M, Stoll I, Roy L, Reilly PT, Mak TW, Dimitrov S, Romier C, Hamiche A (2014) ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. *Nature* **505**(7485): 648–653.
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 402–412.

- Saito M, Kumamoto K, Robles AI, Horikawa I, Furusato B, Okamura S, Goto A, Yamashita T, Nagashima M, Lee T-L, Baxendale VJ, Rennert OM, Takenoshita S, Yokota J, Sesterhenn IA, Trivers GE, Hussain SP, Harris CC (2010) Targeted disruption of Ing2 results in defective spermatogenesis and development of soft-tissue sarcomas. *PLoS One* 5(11): e15541.
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Peña P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Côté J, Chua KF, Gozani O (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442(7098): 96–99.
- Wang T, Guo S, Liu Z, Wu L, Li M, Yang J, Chen R, Liu X, Xu H, Cai S, Chen H, Li W, Xu S, Wang L, Hu Z, Zhuang Q, Wang L, Wu K, Liu J, Ye Z, Ji J-Y, Wang C, Chen K (2014a) CAMK2N1 inhibits prostate cancer progression through androgen receptor-dependent signaling. *Oncotarget* 5(21): 10293–10306.
- Wang T, Liu Z, Guo S, Wu L, Li M, Yang J, Chen R, Xu H, Cai S, Chen H, Li W, Wang L, Hu Z, Zhuang Q, Xu S, Wang L, Liu J, Ye Z, Ji J-Y, Wang C, Chen K (2014b) The tumor suppressive role of CAMK2N1 in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* 5(11): 3611–3621.
- Wong YNS, Ferraldeschi R, Attard G, de Bono J (2014) Evolution of androgen receptor targeted therapy for advanced prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 11(6): 365–376.
- Yamamoto T, Horikoshi M (1997) Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J Biol Chem* 272(49): 30595–30598.
- Zhou H, Wang L, Huang J, Jiang M, Zhang X, Zhang L, Wang Y, Jiang Z, Zhang Z (2015) High EGFR\_1 inside-out activated inflammation-induced motility through SLC2A1-CCNB2-HMMR-KIF11-NUSAP1-PRC1-UBE2C. *J Cancer* 6(6): 519–524.



This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) named above 2018

Supplementary Information accompanies this paper on British Journal of Cancer website (<http://www.nature.com/bjc>)

### Supplementary Figure and Table legends

**Figure S1:** (A) The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was accessed through [oncomine.org](http://oncomine.org) and the copy number of *ING3* from paired normal tissue (i.e. blood or prostate gland; n = 207) and prostate adenocarcinoma (n = 169) plotted (\*\*\*) indicates a p-value < 0.001). (B) *ING3* copy number counts from the TCGA prostate cancer dataset between patients who achieved complete or partial remission during androgen ablation (n = 185) and patients who experienced no remission (n = 34). (C) Kaplan-Meier survival curve of patients in the TCGA prostate cancer dataset based on patients with low (n = 46) or high (n = 24) *ING3* counts (\* indicates a p-value of 0.02). (D-F) TMA from main Figure 1A were stained for indicated proliferation markers and plotted against *ING3* H-score.

**Figure S2:** The microarray data for each gene was plotted for both si*ING3* no. 1 and si*ING3* no. 2.

**Figure S3:** Proliferation of breast, ovarian, and prostate cancer cell lines. Proliferation of control (Scramble siRNA) or *ING3*-silenced (si*ING3* no.1) CWR22Rv1, LNCaP-AI, MCF7, MX-1, PC3, PEO1, and PEO4 cells was monitored for 5 consecutive days by IncuCyte. Data was analysed using Wilcoxon signed-rank test.

**Figure S4:** Kegg pathway analysis.

**Figure S5:** *ING3* associates with H3K4<sup>me3</sup> at transcriptional start sites. ChIP experiments of *ING3* at the transcriptional start site (TSS) of *CCND1* and *PCNA* were conducted using an  $\alpha$ -FLAG antibody. Similarly, ChIP experiments of *ING3* and AR at the ARE<sub>III</sub> of *PSA* and the ARE of *KLK2* were conducted using  $\alpha$ -FLAG or  $\alpha$ -AR antibodies, respectively.

**Figure S6:** Structure prediction of *ING3*<sub>PHD</sub> with (A) or without (B) the PNEPR sequence preceding the PHD domain.

**Figure S7:** The TCGA database was analysed for the expression of *ING3* and cell cycle genes in prostate cancer tissues and the expression of genes that correlated with the expression of *ING3* was plotted.

**Figure S8:** The cBioPortal website was queried for alterations in *ING* proteins in various cancers.

**Table S1:** List of primers used for real-time qPCR gene expression analysis.

**Table S2:** List of primers used for real-time qPCR analysis of ChIP.

**Table S3:** Complete list of genes from the si*ING3* microarray survey.

**Table S4:** Summary of characteristics of cell lines used in our studies.



Figure S1

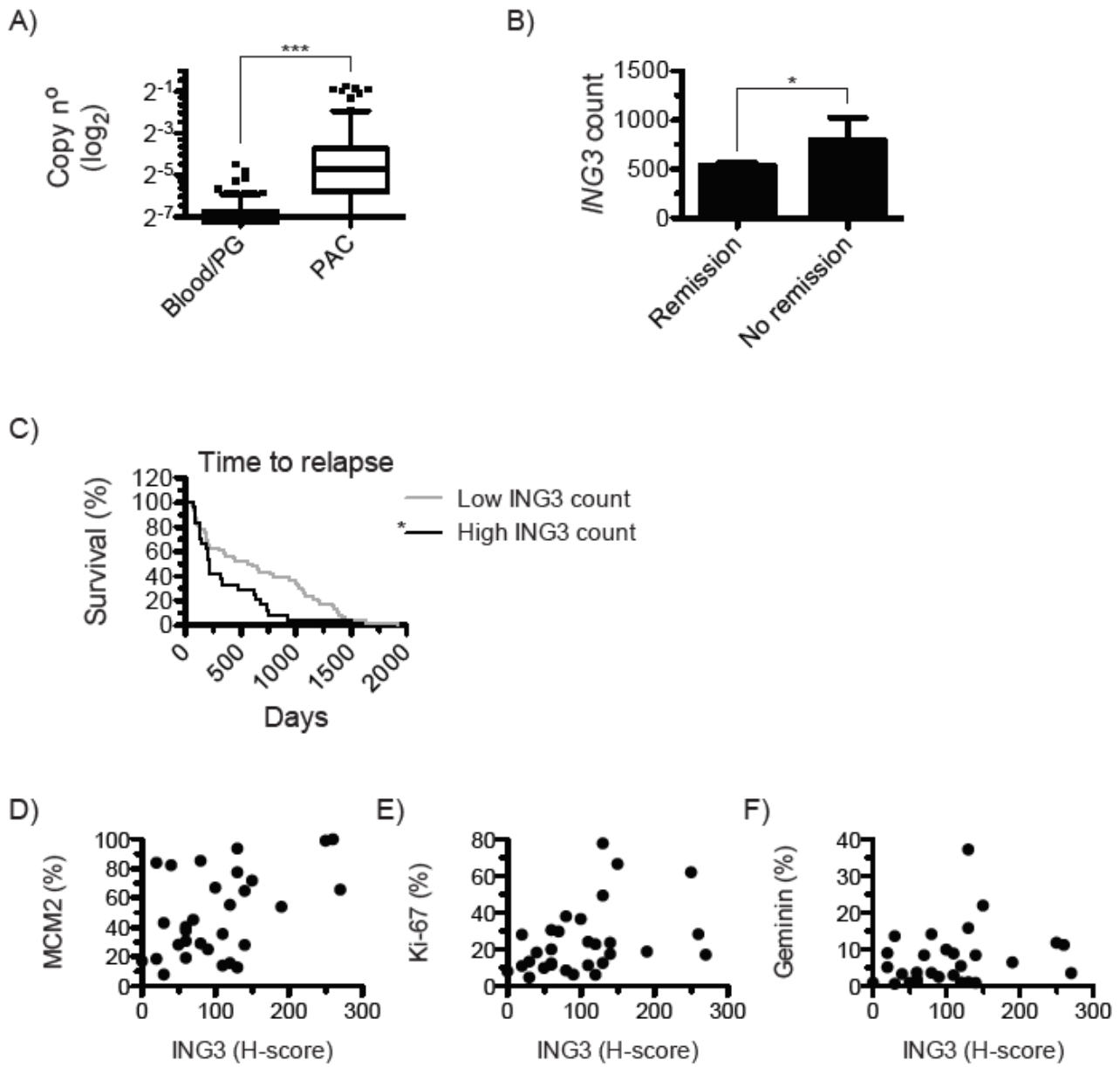


Figure S2

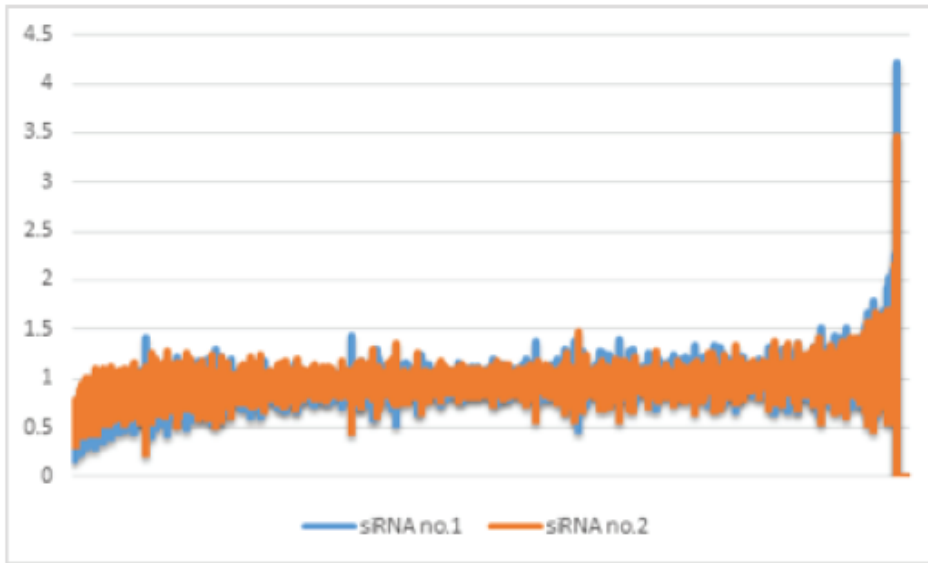


Figure S3

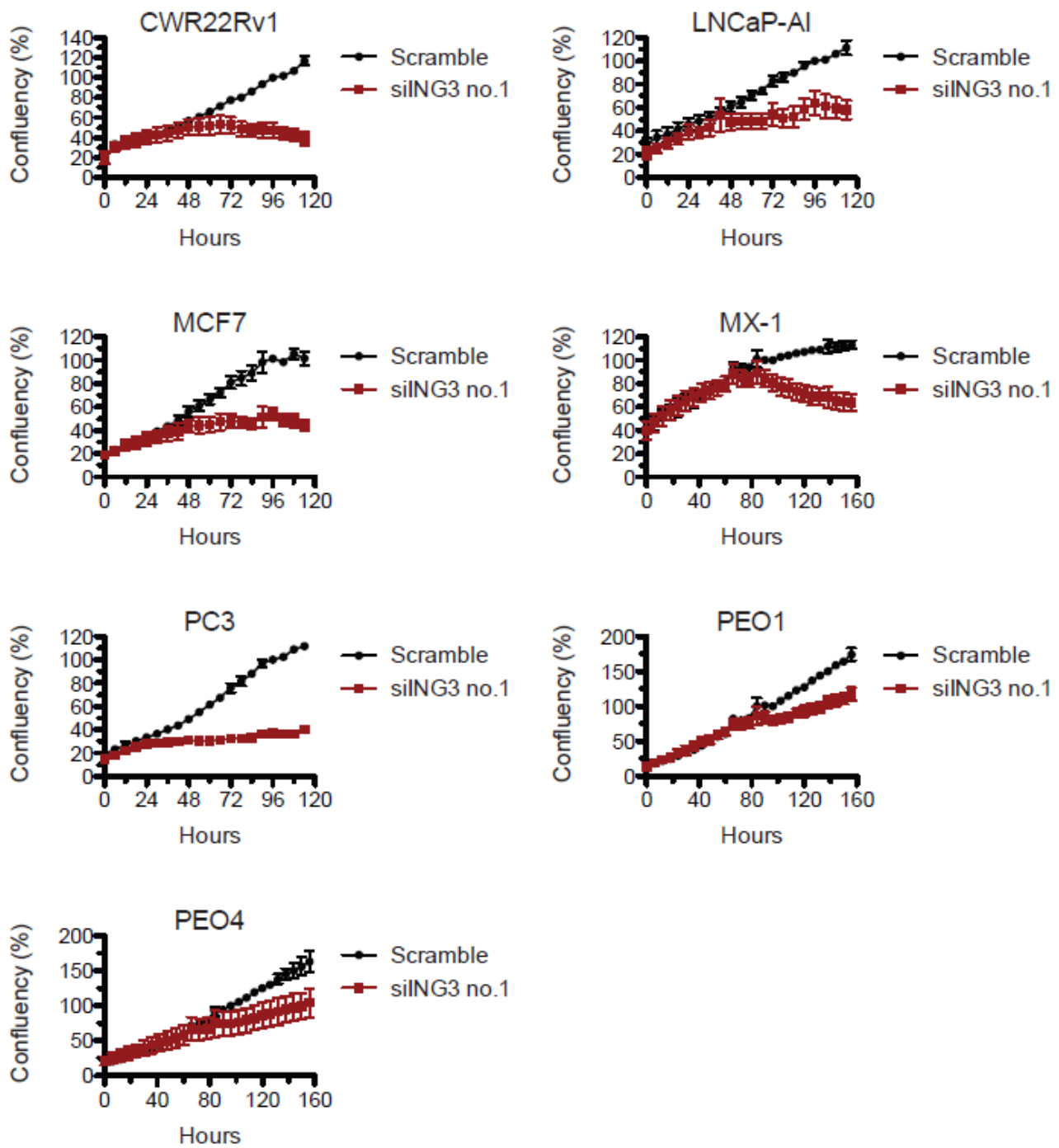






Figure S5

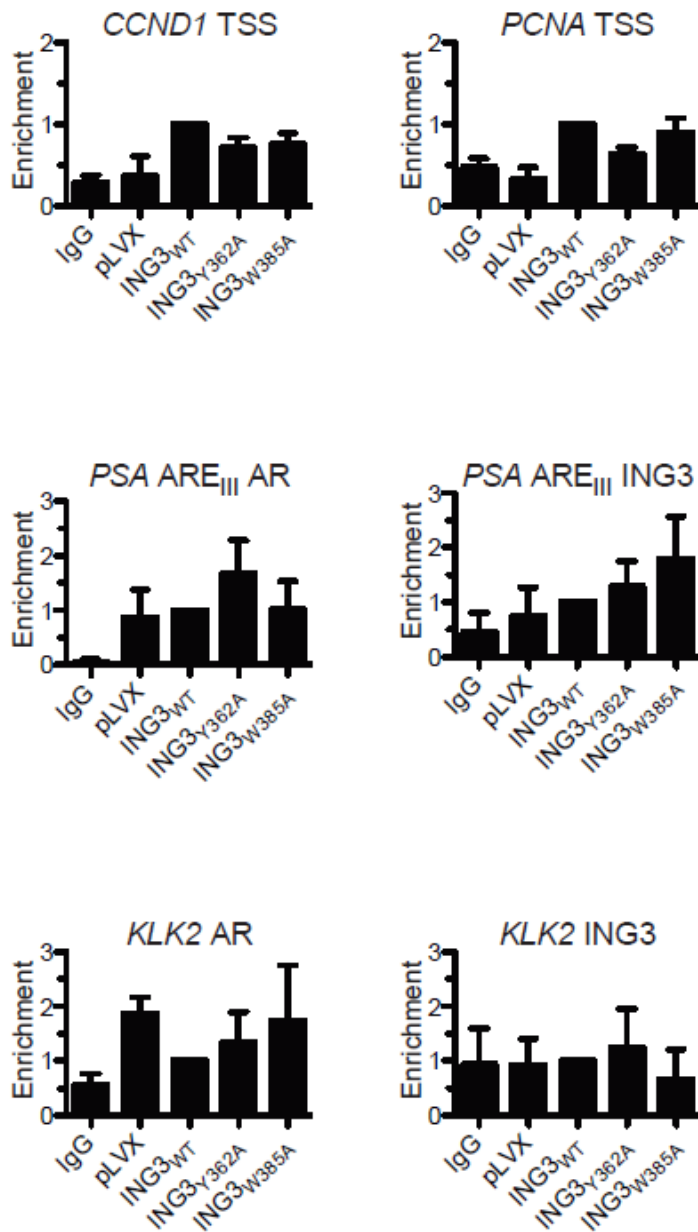
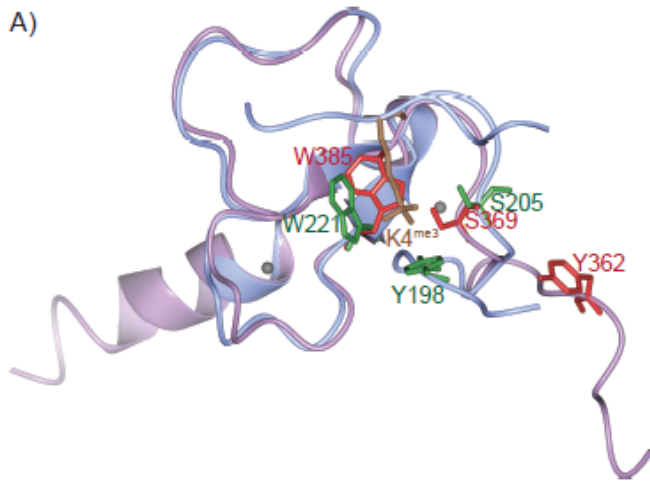


Figure S6

A)



B)

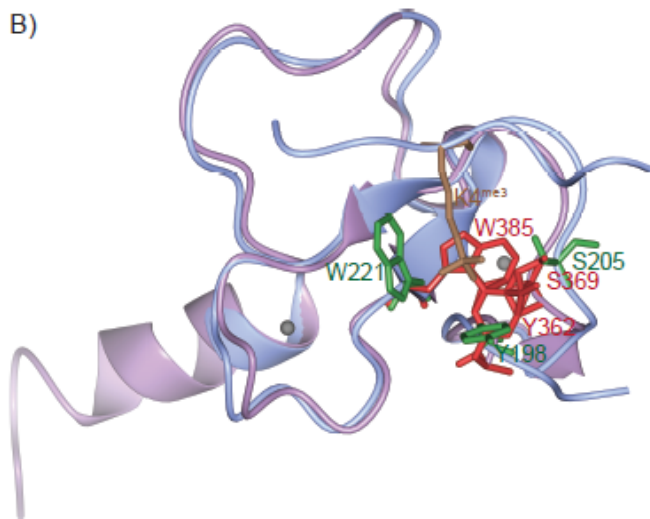


Figure S7

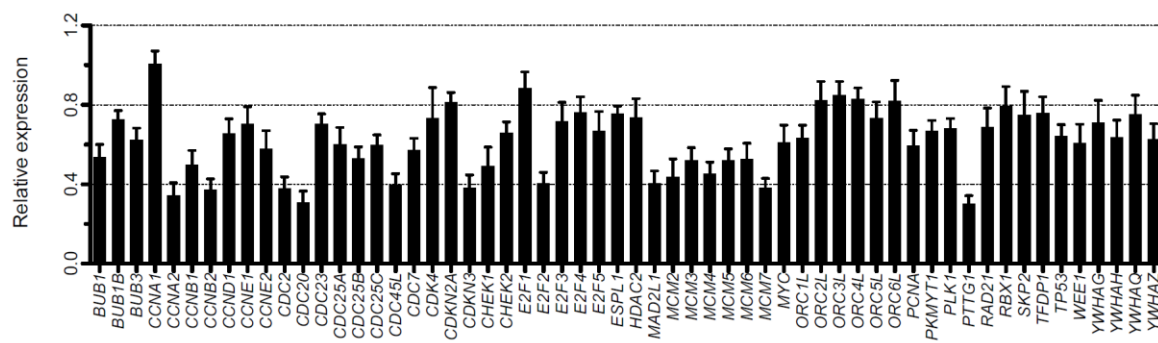
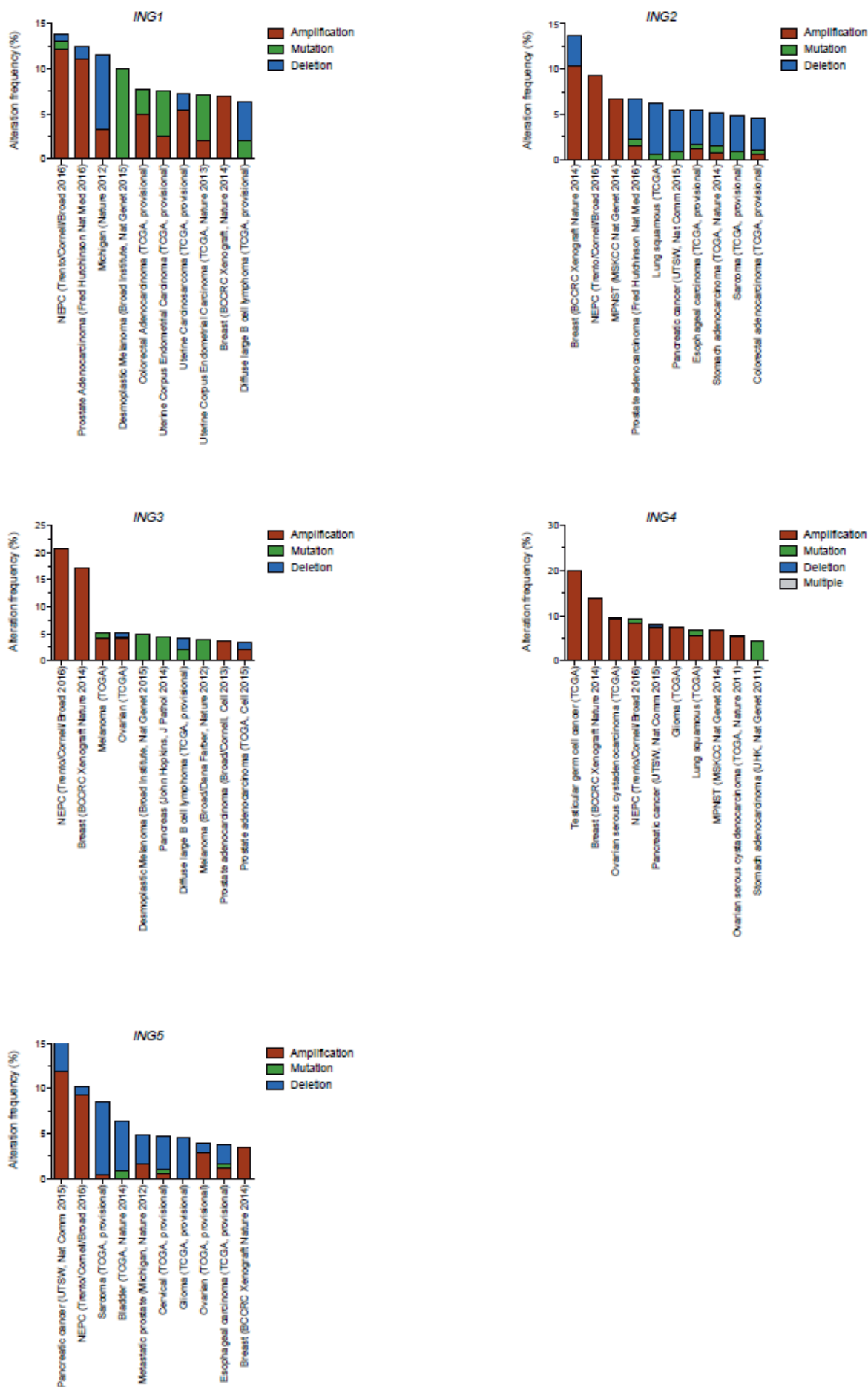


Figure S8



**Table S1:** Real-time qPCR primers for gene expression. The primers were selected from the NCBI Nucleotide database using the utility Primer-BLAST. The primers used for gene expression were designed to span exon-exon junctions and be separated by at least one intron when possible.

Gene	Forward sequence 5'-3'	Reverse sequence 5'-3'
<i>AR</i>	GCAAAGCC1AAAGCCAGAT	GAGTTCATGGGTGGCAAAG
<i>BAX</i>	GCCCTTTTGCTTCAGGGTTTCA	TCAGCTTCTTGGTGGACGCA
<i>CAMK2N1</i>	GCACGTCAATCAATCCTATCATC	ACACCAACAACCTTCTTCGGC
<i>CCNA2</i>	CACTCACTGGCTTTTCATCTTC	CAGAAAACCATTGGTCCCTC
<i>CCNB2</i>	GATTTTGCAGAGCAAGGCAT	TGGAAAAGTTGGCTCCAAG
<i>CDKN1A</i>	CAGCTGCCGAGTCAAGTTCC	GTTCTGACATGGCGCCTCCT
<i>FOXO3</i>	AACGTGGGGAACCTCACTGGT	TTTGAGGTCTGCTTTGCCCA
<i>GREB1</i>	GGATGAGGAGCTGGGGACAG	GCTGAACCGGAAGCCTTGGA
<i>HMMR</i>	AAGCTGACAGCGGAGTTTTG	TGGGTCATCAGAATTTGAAACA
<i>HPRT1</i>	GAACGTCTTGCTCGAGAGATGTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTT
<i>ING3</i>	TGGAGGGAAGAGCAAATGGCA	TCTCAAGTGTGATCTACCAAGTCA
<i>KIF20A</i>	TAACAAGGGCCTAACCCCTCA	TGCTCTGTCGTCTCTACCTCC
<i>KLK2</i>	AGCATCGAACCAGAGGAGTTCT	TGGAGGCTCACACACTGAAGA
<i>MELK</i>	GAGAGCCACTTGGGAACATC	TGTGTGGATTTCTACCATTTGA
<i>NKX3.1</i>	AGCCAGAAAGGCACTTGGG	GGCGCCTGAAGTGTTTTCA
<i>NOXA</i>	CTCTGTAGCTGAGTGGGCGG	ACACTCGACTTCCAGCTCTGC
<i>NUSAP1</i>	TCATTTCTTTTCTTGCCTCA	GCCAAGAGTCTGGGTCTCC
<i>PIRC1</i>	TACTATGGACTCCTCCGCCA	CCGTGTGGAGTAGGTCTGGA
<i>PML</i>	GTCTTCTGCCAACAGCAAC	AGCTCTCGGGAGGACGAGTT
<i>PSA</i>	ACTGCATCAGGAACAAAAGCGT	TGTGGGAAGCTGTGGCTGAC
<i>TMPRSS2</i>	CTGCTGGATTTCCGGGTG	TTCTGAGGTCTTCCCTTTCTCCT
<i>UBE2C</i>	TTGTAAGGGTAGCCACTGGG	TCAAATGGGTAGGGACCATC

Table S2: Real-time qPCR primers for CHIP analysis

Gene	Forward sequence 5'-3'	Reverse sequence 5'-3'
AURKA <sub>TSS</sub>	AGAGATTCTGATTTACCGGGCTCT	TCCGTA CTTCTCAGACCGTAGACC
CCNB1 <sub>TSS</sub>	TCTTTCTGGGAAC TTCTCCTTG TG	TCGAGTTCTGAAAGAAGCAAGACC
CCND1 <sub>TSS</sub>	GTCTCAAATGGTCACCAAGAAAT	CTGTCTTCTTTAAACCCACCACGA
CCNE2 <sub>TSS</sub>	GGTCACCTGATCGTAAGCAGAACT	TTCCACAAACGTTACTCGACATA
CDC2 <sub>TSS</sub>	GGAATAATAAGCCGGGTACAGTGG	TAGAGGACCCCGTTCCTCAATACT
CDK2 <sub>TSS</sub>	GAAGAAGGCATCTTTTAGCACCA	TGCAAATGAGCACCC TTTTCTTAT
CDKN1A <sub>-500bp</sub>	GGAGACTGCAGTGAGCTGAGAT	CCCTGGCTTTTGT TTTTCATTT
CDKN1A <sub>TSS</sub>	CTGTGGCTCTGATTGGCTTTCT	GACAAAATAGCCACCAGCCTCT
CDKN2B <sub>TSS</sub>	TGGCCGTAAACTTAACGACTCT	ACGGGAGGGTAATGAAGCTGAG
KLK2 <sub>ARE</sub>	ACCCCTGTTGCTGTTTCATCCTG	CCGCCCTTGCCCTGTTGG
PCNA <sub>TSS</sub>	AGGAGGAAAGTCTAGCTGGTTTCG	TGGTCGTTGTCTTTCTAGGTCTCA
PSA <sub>AREIII</sub>	TGGGACAAC TTGCAAACCTG	CCAGAGTAGGTCTGTTTTCATCCA
TMPRSS2 <sub>TSS</sub>	TGGTCCTGGATGATAAAAAAAGTTT	GACATACGCCCCACAACAGA

**Table S3:** Microarray data from siING3 LNCaP.

SYMBOL	repeat 1	repeat 2	repeat 3	repeat 4	n=4 average	S.D.M.
PTTG1	0.1788	0.3643	0.3575	0.3044	0.3012	0.0430
CDC20	0.1359	0.3863	0.3803	0.3187	0.3053	0.0585
UBE2C	0.1621	0.4084	0.3986	0.3329	0.3255	0.0570
FAM83D	0.1542	0.3745	0.3844	0.4071	0.3300	0.0590
GAL	0.1844	0.3757	0.4043	0.3653	0.3324	0.0500
SNORD16	0.1892	0.3848	0.4103	0.3647	0.3372	0.0502
NUSAP1	0.2043	0.3992	0.4035	0.3433	0.3376	0.0465
SPC24	0.1891	0.4030	0.3784	0.3893	0.3400	0.0505
CCNA2	0.1661	0.3966	0.4601	0.3533	0.3440	0.0632
CEP55	0.1973	0.3994	0.3888	0.3932	0.3447	0.0492
AURKA	0.1958	0.4288	0.4010	0.3692	0.3487	0.0524
CDCA5	0.2289	0.4406	0.4057	0.3206	0.3489	0.0473
MELK	0.2323	0.4513	0.3531	0.3663	0.3508	0.0451
HMMR	0.2280	0.4003	0.4225	0.3587	0.3524	0.0435
TK1	0.2131	0.4460	0.4145	0.3372	0.3527	0.0519
TOP2A	0.1870	0.4605	0.3730	0.3928	0.3533	0.0585
DLGAP5	0.2390	0.3972	0.3913	0.3996	0.3568	0.0393
LOC731314	0.1842	0.4761	0.4060	0.3816	0.3620	0.0626
PRC1	0.2231	0.4509	0.4075	0.4021	0.3709	0.0505
CCNB2	0.2149	0.4545	0.4251	0.4032	0.3744	0.0542
KIF20A	0.2305	0.4718	0.3680	0.4304	0.3752	0.0527
OIP5	0.2344	0.4493	0.4255	0.3950	0.3761	0.0485
LOC399942	0.2116	0.4766	0.4457	0.3728	0.3767	0.0592
MCM7	0.2597	0.4699	0.4355	0.3560	0.3803	0.0467
CDC2	0.2239	0.4737	0.4711	0.3538	0.3806	0.0593
PTTG3P	0.1978	0.4419	0.4556	0.4359	0.3828	0.0618
CDKN3	0.2112	0.5224	0.4293	0.3709	0.3834	0.0653
NCAPG	0.2065	0.4762	0.4562	0.3962	0.3838	0.0615
C16orf75	0.2102	0.4667	0.4131	0.4826	0.3932	0.0628
CDC45L	0.2312	0.4717	0.4576	0.4321	0.3981	0.0562
TMSB15A	0.2714	0.4406	0.4354	0.4473	0.3987	0.0425
FAM64A	0.2733	0.4806	0.4312	0.4135	0.3996	0.0445
CKS1B	0.2459	0.5311	0.4068	0.4200	0.4009	0.0587
TYMS	0.2172	0.5749	0.4812	0.3338	0.4018	0.0790
NMU	0.2512	0.4487	0.4810	0.4281	0.4023	0.0515
MAD2L1	0.2169	0.4870	0.4715	0.4405	0.4039	0.0631
AURKB	0.2213	0.5332	0.4099	0.4518	0.4040	0.0661
PBK	0.2503	0.4480	0.4499	0.4688	0.4043	0.0515
E2F2	0.2478	0.4739	0.4008	0.4999	0.4056	0.0566
CENPM	0.2545	0.5062	0.4324	0.4447	0.4094	0.0541
CDCA8	0.2835	0.4743	0.4793	0.4248	0.4155	0.0457
KIFC1	0.2673	0.4892	0.4565	0.4778	0.4227	0.0522
HES6	0.2690	0.5558	0.4785	0.3896	0.4232	0.0616

Lien hypertexte pour accès au tableau entier :

[https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fbjc.2017.447/MediaObjects/41416\\_2018\\_BFbjc2017447\\_MOESM445\\_ESM.pdf](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fbjc.2017.447/MediaObjects/41416_2018_BFbjc2017447_MOESM445_ESM.pdf)

**Table S4:** Characteristics of prostate, breast, and ovarian cancer cell lines used.

Cell line	Origin	Androgen/estrogen status	AR status	AR variants	p53 status	Other
LNCaP	Prostate	sensitive	T877A mutant	Absent	Wild-type	
LNCaP-AI	Prostate	independent	T877A mutant	Absent	Wild-type	
CWR22Rv1	Prostate	independent	Exon 3 duplication (ZnF <sub>2</sub> DNA-binding domain), H874Y (lower AR specificity)	Present	Mutant	
PC3	Prostate	independent	Negative	Absent	Null	
MCF7	Breast	sensitive	Positive	Absent	Wild-type	
MX-1	Breast				Wild-type	BRCA1 <sup>mut</sup> , ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , HER2 <sup>-</sup>
PEO1	Ovarian				Mutant	BRCA2 <sup>-</sup> , ER <sup>+</sup>
PEO4	Ovarian				Mutant	BRCA2 <sup>+</sup> , ER <sup>+</sup>
U2OS	Osteosarcoma				Wild-type	



# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Ces travaux de thèse nous ont permis de rapporter de nouvelles fonctions biologiques originales à propos de deux membres de la famille de gènes *ING* : les protéines ING2 et ING3. Principalement reconnues pour leurs fonctions suppressives de tumeur en lien avec leur activité de lecture du code histone (« gatekeeper ») ou leurs actions sur les processus de réplication ou réparation de l'ADN nucléaire (« caretaker »), nos résultats démontrent l'existence d'un rôle direct pour ING2 dans le compartiment mitochondrial en relation avec le métabolisme cellulaire et un rôle oncogénique inattendu pour ING3 dans le contexte spécifique du cancer de la prostate. Enfin, dans un objectif de recherche appliquée « du laboratoire au chevet du patient », nous avons exploré l'impact de l'expression de la protéine ING2 en tant que biomarqueur prédictif de réponse à une thérapie ciblée dans le cancer bronchique primitif.

### ING2 en relation avec le compartiment mitochondrial

La découverte des protéines ING dans la mitochondrie est à créditer à l'équipe du Pr Riabowol qui a démontré que, en cas de stress génotoxique, la protéine ING1 était importée dans le compartiment mitochondrial de lignées de tumeurs humaines (Bose et al. 2013). Nos travaux ont quant à eux démontré qu'à l'état basal, une partie du pool cytoplasmique de la protéine ING2 était présente dans la mitochondrie au sein de cellules tumorales mais aussi de cellules non-tumorales transformées. À l'instar de la protéine ING1, un stress génotoxique (etoposide) majore la translocation de la protéine ING2 dans le compartiment mitochondrial.

Nos travaux sont les seuls, à ce jour, qui apportent des indices sur les mécanismes moléculaires précis responsables de l'import mitochondrial de la protéine ING2. Les protéines ING1 et ING2 ne présentent pas dans leur structure de séquence d'adressage à la mitochondrie. Le système de relais par ponts disulfures est un mécanisme d'import protéique dans la mitochondrie de découverte récente et concerne, de par sa nature, les protéines capables de former des ponts disulfures intramoléculaires (Chatzi, Manganas, et Tokatlidis 2016). D'après des analyses *in silico*, la protéine ING2 posséderait cette propriété, et nous avons donc émis l'hypothèse d'une prise en charge par ce système d'import. Nos résultats, fondés sur une inhibition pharmacologique du relais de ponts disulfures, soutiennent celle-ci. En revanche, nos expériences n'expliquent que partiellement la localisation de la protéine ING2, précisément située dans la matrice mitochondriale selon nos données de sous-fractionnement d'organites. En effet, le système d'import par relais de ponts disulfures aboutit à la présence de la protéine cible dans l'espace inter-membranaire. Ainsi, les mécanismes de franchissement de la membrane mitochondriale interne par ING2 restent inconnus. Un transfert vers la matrice

mitochondriale dépendante d'une protéine partenaire est une hypothèse à privilégier. Un argument en ce sens est la présence dans la mitochondrie de certains isoformes de la protéine cargo 14-3-3 (Abdrabou, Brandwein, et Wang 2020; Miyamoto et al. 2012). Or, une interaction directe entre la protéine ING1 et la protéine 14-3-3 $\eta$  est déjà décrite (Gong et al. 2006) et celle-ci est rendue possible par la séquence d'acides aminés REASP que partagent les protéines ING1 et ING2. À la lumière de cette observation, il est licite de formuler l'hypothèse que la translocation de la protéine ING2 de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale pourrait être dépendante d'une interaction avec la protéine 14-3-3 $\eta$ . Nos travaux apportent un argument indirect en faveur, puisque l'augmentation de l'expression de 14-3-3 $\eta$  augmente la quantité d'ING2 observée dans la mitochondrie.

ING1 et ING2 partagent une forte homologie de séquence et leur présence commune dans le compartiment mitochondrial apparaît cohérente. En revanche, la séquence des autres protéines de la famille ING diffère significativement, notamment au niveau de la région C-terminale. Ainsi, affirmer ou infirmer la présence des protéines ING3, ING4 ou ING5 dans le compartiment mitochondrial pourrait guider l'identification de la séquence « critique » facilitant l'import dans la mitochondrie. De manière intéressante, les données disponibles dans la littérature suggèrent que la fonction des protéines ING1 et ING2 dans le compartiment mitochondrial n'est pas redondante. En effet, ING1 a été impliqué dans le contrôle du processus d'apoptose mitochondriale grâce à l'identification d'une séquence BH3-like et une interaction avec la protéine pro-apoptotique BAX. Cette séquence n'est pas partagée par ING2 et nos travaux ont mis en évidence un lien entre la protéine ING2 et l'ADN mitochondrial. En référence à la classification de l'équipe de G. Kroemer à propos de la protéine suppressive de tumeur p53 (Galluzzi et al. 2011), ING1 semble donc impliquée dans les fonctions létales de la mitochondrie, à la différence de ING2 orientée vers les fonctions vitales de la mitochondrie. L'hypothèse d'un équilibre compétitif au sein du compartiment mitochondrial entre les deux protéines mériterait donc d'être explorée plus avant.

Nos travaux ont permis d'identifier le rôle fonctionnel de la protéine ING2 dans la mitochondrie mais sans que les processus moléculaires sous-jacents aient pu clairement être élucidés. En effet, malgré le lien proche établi entre ING2 et l'ADN mitochondrial par l'intermédiaire de TFAM, nos résultats n'expliquent pas comment la perte de l'expression d'ING2 aboutit à une perturbation de l'ultrastructure mitochondriale. Ce phénotype est classiquement rapporté en cas de dégradation de l'ADN mitochondrial. Cependant, la quantité d'ADN mitochondrial, son activité transcriptionnelle ou sa maintenance n'apparaissent pas impactées par la diminution de l'expression de la protéine ING2 dans nos modèles expérimentaux. Le potentiel de membrane est lui aussi inchangé quel que soit le niveau d'expression de ING2. En revanche, la production de ROS mitochondriaux diminuée et une plus faible

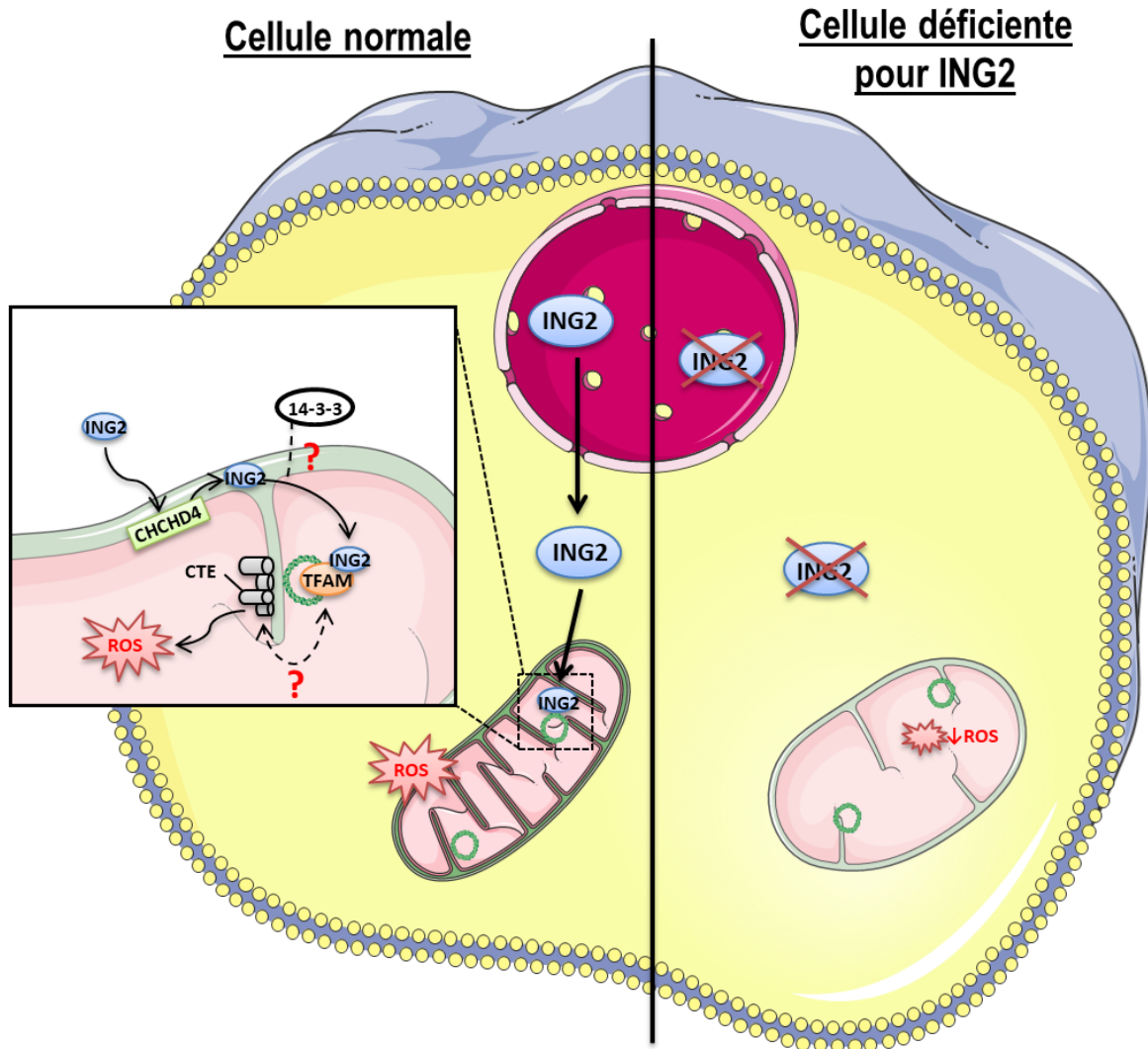
respiration mitochondriale suggèrent un impact négatif sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cela est corroboré par une plus faible sensibilité aux inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons dans nos modèles de cellules sans expression de la protéine ING2. Cela suggère que les cellules déficientes pour ING2 seraient moins dépendantes de l'activité de la phosphorylation oxydative pour leur survie. Cependant, nos travaux n'explicitent pas les mécanismes existant entre ING2, en relation avec l'ADN mitochondrial, et l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. La littérature abonde d'exemples illustrant le lien entre la transcription des protéines codées par l'ADN mitochondrial et l'activité de la chaîne respiratoire (Hebert, Lanza, et Nair 2010). Nos travaux n'ont pu montrer d'impact quantitatif de l'expression d'ING2 sur l'ADN mitochondrial ou sur les membres du complexe de la chaîne respiratoire. Cette question reste donc encore en suspens à ce jour. Enfin, dans quelle mesure il s'agit d'une conséquence ou d'une cause des modifications structurelles mitochondriales que nous avons observées, des travaux complémentaires sont là aussi nécessaires pour pouvoir répondre.

Enfin, l'impact de la protéine ING2 sur les grandes voies métaboliques telles que la synthèse de la glutamine, la synthèse des lipides ou des acides nucléiques restent encore à explorer. Les données d'expression génique disponibles dans la littérature tendent à écarter l'hypothèse d'un contrôle transcriptionnel de la protéine ING2 sur l'expression de gènes impactant directement le métabolisme cellulaire (D. Ythier et al. 2010). Une étude publiée récemment a démontré l'existence d'une induction de l'expression d'ING2 en cas de culture de cellules HK-2 en milieu enrichi en glucose, ce qui se traduit par un arrêt du cycle cellulaire (Ma et al. 2020). De manière intéressante, la suppression de l'expression de la protéine ING2 entraîne dans ce modèle, une réversion de l'impact de l'hyperglycémie sur le cycle cellulaire. Même si ce travail démontre l'existence d'un lien entre l'accès au glucose et l'expression de la protéine ING2, les mécanismes sous-jacents restent mal compris. Par ailleurs, on rappellera que des travaux antérieurs de l'équipe ont démontré l'existence d'un lien entre ING1 et la dégradation de la protéine HIF1 $\alpha$  (Bigot et al. 2015), principal médiateur intracellulaire de la réponse à l'hypoxie. Ainsi, analyser l'impact de l'expression des gènes *ING1* et *ING2* en condition d'hypoxie ou de privation en nutriments serait une approche pertinente pour aller plus loin dans la compréhension de l'implication des INGs dans le métabolisme cellulaire.

Une perspective de travail de recherche translationnelle pourrait consister en la conduite d'une étude interventionnelle avec prélèvements de tumeurs guidés par les données du TEP-scanner. En effet, cette imagerie à la fois morphologique et métabolique permet d'identifier les zones hypermétaboliques ou hypométaboliques d'une même tumeur humaine et ainsi d'orienter des prélèvements ciblés. Une

analyse du niveau d'expression protéique d'ING1 et ING2 en zones hypermétaboliques en comparaison aux zones hypométaboliques serait une approche intéressante pour vérifier l'hypothèse d'une adaptation métabolique dépendante de l'expression de nos protéines d'intérêt.

La figure 28 récapitule les résultats obtenus et les questions non résolues concernant le rôle de la protéine ING2 dans la mitochondrie.



**Figure 28. Représentation schématique des résultats et questions non résolues à propos du rôle d'ING2 dans la mitochondrie.** La partie gauche du schéma représente une cellule normale en situation basale, dans laquelle ING2 est importée dans la mitochondrie par le système d'import par relais de ponts disulfures (acteur principal CHCHD4). Les mécanismes permettant le transfert à travers la membrane mitochondriale interne restent à élucider. Un rôle potentiel de la protéine cargo 14-3-3 dans ce processus est possible. ING2 interagit avec TFAM et est en relation étroite avec l'ADN mitochondrial. La partie droite du schéma représente une cellule déficiente pour ING2. La perte d'expression d'ING2 aboutit à une perturbation sévère de l'ultrastructure mitochondriale et impacte négativement la production de ROS mitochondriaux sans que les mécanismes sous-jacents ne soient élucidés. En effet, le lien entre la protéine ING2 dans le compartiment mitochondrial et l'activité de la chaîne respiratoire est à ce jour inconnu. CTE : chaîne de transport d'électrons ; ROS : espèces réactives de l'oxygène.

## ING2 potentiel biomarqueur thérapeutique

Le statut de la protéine ING2 dans les tumeurs humaines fait l'objet de débat à ce jour. Les preuves scientifiques actuellement disponibles plaident pour une perte d'expression fréquente dans les cellules tumorales et notamment dans le cancer bronchique non à petites cellules. Les causes précises de cette perte d'expression sont mal connues. Cependant, de plus en plus de preuves dans la littérature suggèrent l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes *INGs* et notamment de *ING2* (Gournay et al. 2019).

Par l'analyse d'une cohorte rétrospective de patients, nous avons étudié le niveau d'expression d'ING2 dans le contexte précis du cancer bronchique non à petites cellules de stade précoce. Notre travail s'est attaché à établir une estimation fiable, reproductible et objective de l'expression protéique d'ING2 à l'aide d'une méthodologie robuste. Il s'agit à ce jour de la seule étude portant sur cette protéine d'intérêt ayant utilisé la technologie de « tissue micro-array ». Cette méthode permet une coloration homogène et contrôlée sur une même lame histologique d'environ 100 échantillons, s'affranchissant ainsi des variabilités techniques inter-échantillons. De plus, l'analyse quantitative a été automatisée par approche informatique, limitant de ce fait une autre source de variabilité qui est l'interprétation de l'expérimentateur. L'avantage est aussi celui d'une mesure quantitative précise pour chaque cas. Grâce à ce travail, nous avons donc déterminé le niveau d'expression de la protéine ING2 au sein des cellules tumorales du tissu du microenvironnement, et même à l'échelle intracellulaire, dans le compartiment cytoplasmique ou nucléaire. Nos résultats démontrent qu'il existe une répartition quasi-gaussienne de l'expression protéique d'ING2 dans les cancers bronchiques non à petites cellules, quantitativement plus importante dans les cellules tumorales que les cellules stromales. Comment expliquer l'apparente discordance avec les principales études publiées ?

Premièrement, il est important de souligner que les échantillons de notre cohorte sont issus uniquement de tumeurs de stade précoce. On peut supposer que l'évènement oncogénique aboutissant à la perte d'expression de la protéine ING2 survient plus tard dans le processus de carcinogénèse. Des travaux antérieurs de l'équipe tendraient à écarter cette hypothèse, dans la mesure où une perte d'expression de ING2 a été observée en proportion équivalente dans des stades précoces et métastatiques (Damien Ythier et al. 2010). Deuxièmement, les anticorps utilisés en immunohistochimie pour les principaux travaux publiés sur ING2 sont très hétérogènes. Dans notre travail, nous avons utilisé un anticorps commercial ING2 (ab244387 - Abcam®) dont la sensibilité a été préalablement validée sur des modèles de surexpression ou de perte d'expression d'ING2. En effet, l'épitope reconnu par cet anticorps est situé

sur la partie N-terminale (acides aminés 1 à 100), limitant en conséquence le risque de réactivité croisée avec les autres protéines de la famille ING. Troisièmement, l'analyse standardisée, automatisée et quantitative que nous avons menée renforce la validité externe de notre approche par opposition aux études déjà publiées. En effet, les deux autres études principales analysant ING2 dans le cancer bronchique non à petites cellules reposent sur une analyse semi-quantitative, sujette à l'interprétation de l'investigateur, et non contrôlée (Damien Ythier et al. 2010; Pan et al. 2014, 2). En conséquence, nous remettons donc en question la fréquence de cette perte d'expression dans les cancers bronchiques qu'on estime rare d'après nos travaux, contre une incidence évaluée à environ 30% d'après la littérature.

Par ailleurs, nous n'avons pas observé dans notre cohorte de variations de l'expression nucléaire et cytoplasmique d'ING2. Une relation linéaire a même été observée entre l'expression nucléaire et cytoplasmique et ce, pour les cellules du microenvironnement ou les cellules tumorales. Plusieurs travaux ont rapporté dans de rares cas, une perte de l'expression d'ING2 spécifique au compartiment nucléaire des cellules tumorales (Shuang Zhao et al. 2016; X.-R. Han et al. 2014). Nous n'avons pas observé ce phénotype dans notre cohorte. Cependant, nous avons pu établir une corrélation entre le ratio nucléo-cytoplasmique de l'expression de ING2 et le pronostic des patients. En effet, un rapport entre l'expression nucléaire et cytoplasmique diminué au sein des cellules tumorales était associé à une plus faible survie globale. Cette observation n'a pas été confirmée pour les cellules stromales. Ces données suggèrent donc qu'un déséquilibre en faveur de l'expression cytoplasmique de ING2 impacte l'agressivité de la cellule tumorale. Explorer cette hypothèse en construisant un modèle cellulaire d'expression compartimentale de la protéine ING2 est une perspective intéressante. Par la construction d'un plasmide codant une protéine ING2 recombinante, porteuse d'une délétion de sa séquence REASP, nous serions en mesure d'évaluer l'impact d'une expression principalement nucléaire de ING2 sur le phénotype cellulaire (prolifération, migration, résistance aux cytotoxiques...). Selon le même concept, l'expression exogène d'une protéine ING2 recombinante tronquée pour la séquence NLS constituerait un modèle intéressant, car il permettrait une expression cytoplasmique exclusive d'ING2.

En outre, notre travail a aussi permis de révéler une opportunité thérapeutique dans le contexte spécifique du cancer bronchique. Nous avons vérifié par plusieurs approches complémentaires l'existence d'une sensibilité accrue des cellules déficientes pour ING2 vis-à-vis d'une inhibition de l'activité kinase de la protéine WEE1, point de contrôle de la transition G<sub>2</sub>/M du cycle cellulaire. Sur le plan mécanistique, le modèle que nous proposons se base sur les connaissances de la littérature impliquant ING2 dans le cycle cellulaire. Selon ce modèle, la perte d'expression d'ING2 favorise l'entrée

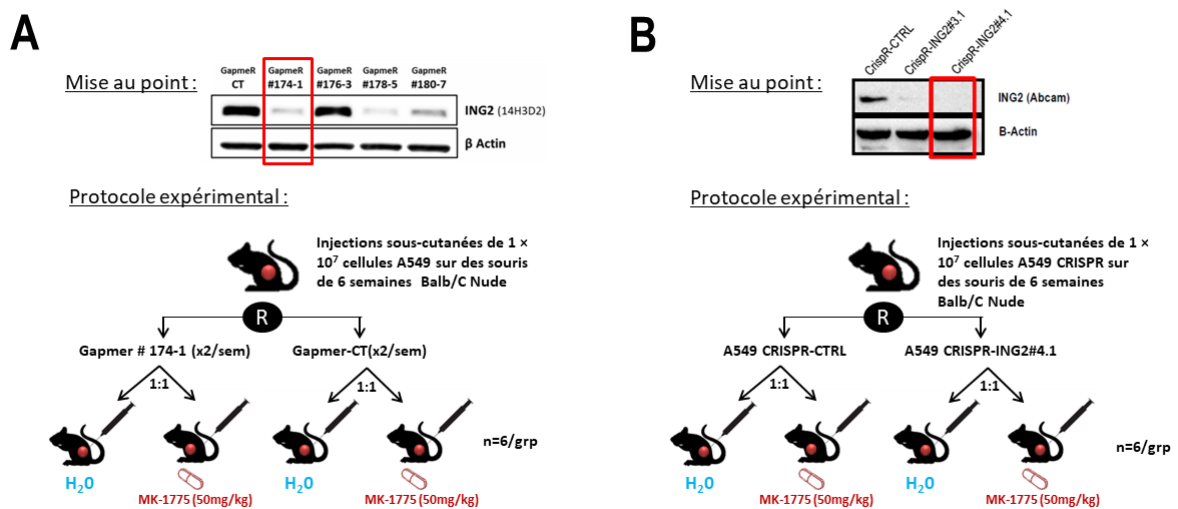
des cellules vers la phase S dont la progression est ensuite ralentie par défaut de progression de la fourche de réplication (Larrieu et al. 2009; 2010). L'inhibition de WEE1 force les cellules à entrer en mitose de manière prématurée, ce qui aboutit à une catastrophe mitotique et promeut la mort cellulaire. Dans notre modèle, nous avons reproduit ces résultats par l'utilisation d'un inhibiteur d'HDAC (vorinostat) utilisé en qualité d'inhibiteur de l'interaction d'ING2 avec le complexe Sin3A/HDAC (Smith et al. 2010). De manière cohérente avec nos résultats, plusieurs publications ont rapporté une synergie entre les traitements par inhibiteurs d'HDAC et inhibiteurs de WEE1 dans de nombreux modèles tumoraux (Tanaka et al. 2017; Hanmod et al. 2015). Sur le plan mécanistique nous apportons des arguments en faveur d'un contrôle transcriptionnel d'ING2 sur le gène *CHEK1*, codant la protéine CHK1, principal activateur de WEE1. Une publication récente apporte des éléments complémentaires sur le lien existant entre les protéines HDAC et l'activité de la protéine CHK1 (Göder et al. 2018, 130). Selon ce travail, l'expression de HDAC1 et de HDAC2 permet le maintien de l'activité de CHK1 et WEE1 par inhibition de la sous-unité PR130 de la phosphatase PP2A. En cas d'inhibition de l'activité HDAC1 et HDAC2, l'activité de cette phosphatase augmente au détriment de la phosphorylation de CHK1. À la lumière de ces données, vérifier dans notre modèle si la variation d'expression de ING2 modifie l'activité de PP2A et *in fine* la phosphorylation de CHK1 serait une approche pertinente. En résumé, l'effet synergique constaté entre les inhibiteurs d'HDAC et les inhibiteurs de WEE1 pourrait reposer, au moins en partie, sur l'inactivation de la voie ING2/HDAC/CHK1, ce qui aurait pour effet de renforcer l'inhibition de WEE1.

D'autres hypothèses mériteraient d'être explorées plus précisément pour affiner notre compréhension du lien existant entre ING2 et WEE1. La sensibilité des cellules tumorales aux inhibiteurs de WEE1 a été rapportée comme dépendant de l'expression de SIRT1 (G. Chen et al. 2017). Or, ING2 interagit avec SIRT1 et cette interaction est importante pour contrôler l'activité du complexe Sin3A/HDAC sur les gènes cibles. Par ailleurs, le niveau d'expression de la marque d'histone H3K36me3 semble prédictif de la sensibilité aux inhibiteurs de WEE1 dans les cellules tumorales (Pfister et al. 2015). Cette marque d'histone prévient les transcriptions aberrantes au niveau des exons par le recrutement des HDAC. Ainsi, on peut supposer qu'une accumulation de cette marque d'histone soit la conséquence d'une inhibition de l'activité HDAC. Auquel cas, il serait intéressant de vérifier si la perte d'expression d'ING2 se traduit effectivement par l'enrichissement en cette modification épigénétique.

Enfin, nous souhaitons valider cette cible thérapeutique par la conduite d'expériences *in vivo* dans plusieurs modèles murins. Les lignées de CBNPC rendues déficientes pour le gène *ING2* par technologie CRISPR-Cas9, constituent un premier modèle de xénogreffe sur modèle murin. Nous



mettons au point une méthodologie d'inactivation *in situ*, c'est-à-dire directement dans la xéno greffe murine, de la traduction de l'ARNm de *ING2* par injection d'oligonucléotides antisens de conformation GapmeR® (Figure 29). Par ces deux approches, nous serons en mesure d'affirmer ou non la transposition *in vivo* des résultats obtenus sur lignées tumorales. À terme, une validation clinique pourrait être envisagée par la conduite d'un essai thérapeutique de phase 2. En effet, les inhibiteurs d'HDAC et les inhibiteurs de WEE1 ont déjà été testés en clinique et leur profil de toxicité est bien décrit, y compris en association. En revanche, évaluer le niveau d'expression du gène *ING2* dans la population cible nécessitera une validation préalable de la méthode diagnostique pour ce potentiel biomarqueur compagnon.



**Figure 29. Schémas expérimentaux retenus pour la conduite des expériences *in vivo*.** A. À l'aide d'une inhibition *in situ* de la traduction de l'ARNm de *ING2* par technologie GapmeR® dans un modèle de xéno greffes de tumeurs humaines sur souris immunodéficientes, nous testerons la sensibilité *in vivo* au MK-1775 en fonction de l'expression d'*ING2*. B. Un deuxième modèle de tumeur pulmonaire humaine déficient pour *ING2*, généré par la technologie CRISPR-Cas9, nous permettra de confirmer par une deuxième méthode l'hypothèse initiale. Les critères de jugement principaux seront la perte de poids de la souris et le temps jusqu'à sacrifice dans les deux expériences.

## L'oncogène *ING3* dans le cancer de la prostate

Le dernier axe de mon travail de thèse a porté sur l'identification de nouvelles fonctions pour la protéine *ING3*. Ce travail présente une originalité méthodologique qui a rendu l'approche scientifique innovante. En effet, nous avons tiré parti d'un modèle de culture *ex vivo* de tumeurs prostatiques humaines, déjà mis en place dans le laboratoire de recherche collaborateur. L'avantage d'un tel modèle tient avant tout à la transposabilité des résultats vers l'*in vivo*, du fait de la préservation du microenvironnement tumoral (pièce de tissu d'environ 1mm<sup>3</sup> en culture). Les principaux inconvénients sont l'impossibilité de culture sur le long terme et le caractère peu reproductible à grande échelle d'une telle procédure, du fait des contraintes mécaniques, des variations d'oxygène ou de température que peut subir le matériel expérimental. L'expression exogène du gène *ING3* dans ce modèle nous a apporté des résultats inattendus, puisque celui-ci était associé à une majoration des marqueurs de mitose, suggérant donc un rôle prolifératif. Ce phénotype a pu être reproduit sur des lignées non transformées de fibroblastes humains. Contrairement aux données de la littérature portant sur d'autres types de cancers, nous n'avons pas détecté de diminution de l'expression de la protéine *ING3* dans notre cohorte de cancers de la prostate. Au contraire, les tumeurs prostatiques hormono-résistantes présentaient un niveau supérieur d'expression associé à un pronostic plus réservé. L'hypothèse la plus recevable pour expliquer cette apparente contradiction est sans doute l'existence d'un rôle tissu-spécifique de *ING3* dans le contexte des cellules prostatiques.

Sur le plan mécanistique, nous avons démontré que la protéine *ING3* régulait la transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la réponse aux androgènes. Notamment, *ING3* se lie au site d'initiation de la transcription du gène *CDKN1A* et régule ainsi négativement son activité transcriptionnelle. En revanche, nous n'avons pas identifié la protéine *ING3* au niveau des sites de réponse aux androgènes, suggérant un mécanisme de régulation indirect. Concernant le cas du gène *CDKN1A*, des travaux précédents suggéraient un impact transcriptionnel inverse d'*ING3* dans un modèle de cancer du côlon (Makoto Nagashima et al. 2003). Il est important de rappeler que *ING3* peut positivement, par l'intermédiaire du complexe NuA4/TIP60, ou négativement, par le recrutement de l'histone chaperone ANP32E (Obri et al. 2014), réguler l'expression des gènes lorsqu'elle est associée à la chromatine. Nos données et celles de la littérature soutiennent l'existence d'une dépendance à p53 au cours de ces processus. En conséquence, une des hypothèses à avancer pour expliquer ces différences observées selon les lignées tumorales est l'impact du statut p53. En effet, dans notre lignée de cancer prostatique LNCaP, le gène *TP53* n'est pas altéré et p53 entre en compétition avec la protéine *ING3* pour la fixation sur le TSS du gène *CDKN1A*. Ainsi, ce mécanisme n'est peut-être pas

opérant dans les lignées p53 mutées expliquant ainsi la différence phénotypique observée. De plus, ING3 peut aussi inhiber la progression dans le cycle cellulaire, indépendamment de p53, par une diminution de l'expression du gène *CyclinD1*, secondairement à une inactivation du complexe PI3K/AKT (Song Zhao et al. 2018). Ainsi, le statut d'activation de la voie PI3K/AKT, qui diffère selon les lignées tumorales, est peut-être en mesure d'expliquer une partie des différences observées. Cette hypothèse reste une piste à explorer.

Il est aujourd'hui parfaitement établi que les fonctions oncogéniques potentielles d'une protéine diffèrent d'un tissu à l'autre, du fait de facteurs génétiques, cellulaires ou environnementaux (Schneider et al. 2017). L'organisation de la chromatine et la conformation de l'ADN ont été récemment proposées par les études de séquençage à haut débit comme des éléments déterminant la spécificité tissulaire d'un oncogène (Schuster-Böckler et Lehner 2012; Lawrence et al. 2013). ING3 étant une protéine capable de lire le code histone, il est licite de supposer que sa fonction puisse fortement varier en fonction du profil épigénétique d'une cellule. On pourrait postuler qu'un statut épigénétique particulier prédispose à une modification des propriétés suppressives de tumeur d'ING3. En d'autres termes, il serait intéressant de déterminer s'il existe un lien entre l'organisation de la chromatine dans les tumeurs prostatiques hormono-résistantes et la fonction de la protéine ING3.

Nos résultats remettent en question le fait que les protéines INGs ne soient associées qu'à des fonctions suppressives de tumeur. Il existe dans la littérature des exemples de gènes suppresseurs de tumeur qui, de manière spécifique à certains contextes tissulaires ou génétiques, présentent des fonctions oncogéniques. On peut citer l'exemple édifiant de la protéine p53. En effet, cette protéine reconnue comme l'exemple type de la protéine suppressive de tumeur, présente des fonctions oncogéniques lorsqu'elle acquiert certaines mutations (Soussi et Wiman 2015). Les mutations dites « gain-de-fonction » de p53 observées dans les tumeurs humaines ont été impliquées dans l'activation des processus de tumorigénèse, d'invasion tissulaire, de résistance aux thérapies et d'instabilité génomique (Oren et Rotter 2010). De même, on peut citer le gène *RB1* dont certaines altérations sont possiblement pro-oncogéniques (Kontic et al. 2006). En ce qui concerne la protéine ING3, la littérature fait état d'une fréquence rare de mutation de son gène dans les tumeurs humaines (<10% d'après la base de données TCGA). Puisque certaines fonctions suppressives de tumeur d'ING3 sont dépendantes de p53, on peut supposer que celles-ci seront modifiées en présence d'une protéine p53 porteuse d'une mutation « gain-de-fonction ». Mener des expériences explorant ce concept serait une perspective de recherche intéressante pour la compréhension de l'apparente ambivalence fonctionnelle de la protéine ING3.

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abdrabou, Abdalla, Daniel Brandwein, et Zhixiang Wang. 2020. « Differential Subcellular Distribution and Translocation of Seven 14-3-3 Isoforms in Response to EGF and During the Cell Cycle ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010318>.
- Achanta, Geetha, Ryohei Sasaki, Li Feng, Jennifer S Carew, Weiqin Lu, Helene Pelicano, Michael J Keating, et Peng Huang. 2005. « Novel Role of P53 in Maintaining Mitochondrial Genetic Stability through Interaction with DNA Pol Gamma ». *The EMBO Journal* 24 (19): 3482-92. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600819>.
- Adekola, Kehinde, Steven T. Rosen, et Mala Shanmugam. 2012. « Glucose Transporters in Cancer Metabolism ». *Current Opinion in Oncology* 24 (6): 650-54. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e328356da72>.
- Allen, Scott, Vassilia Balabanidou, Dionisia P. Sideris, Thomas Lisowsky, et Kostas Tokatlidis. 2005. « Erv1 Mediates the Mia40-Dependent Protein Import Pathway and Provides a Functional Link to the Respiratory Chain by Shuttling Electrons to Cytochrome c ». *Journal of Molecular Biology* 353 (5): 937-44. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.049>.
- Allfrey, V. G., R. Faulkner, et A. E. Mirsky. 1964. « ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51 (mai): 786-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>.
- Almami, Amal, Samar A. Hegazy, Arash Nabbi, Mohammed Alshalalfa, Asma Salman, Hatem Abou-Ouf, Karl Riabowol, et Tarek A. Bismar. 2016. « ING3 Is Associated with Increased Cell Invasion and Lethal Outcome in ERG-Negative Prostate Cancer Patients ». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (7): 9731-38. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4802-y>.
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, et al. 1981. « Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome ». *Nature* 290 (5806): 457-65. <https://doi.org/10.1038/290457a0>.
- Andersson, S. G., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Pontén, U. C. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Näslund, A. S. Eriksson, H. H. Winkler, et C. G. Kurland. 1998. « The Genome Sequence of *Rickettsia prowazekii* and the Origin of Mitochondria ». *Nature* 396 (6707): 133-40. <https://doi.org/10.1038/24094>.
- Arismendi-Morillo, Gabriel. 2009. « Electron Microscopy Morphology of the Mitochondrial Network in Human Cancer ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (10): 2062-68. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.02.002>.
- Armitage, P., et R. Doll. 1957. « A Two-Stage Theory of Carcinogenesis in Relation to the Age Distribution of Human Cancer ». *British Journal of Cancer* 11 (2): 161-69. <https://doi.org/10.1038/bjc.1957.22>.
- Attardi, Laura D., et Julien Sage. 2013. « RB Goes Mitochondrial ». *Genes & Development* 27 (9): 975-79. <https://doi.org/10.1101/gad.219451.113>.
- Aubrey, Brandon J., Gemma L. Kelly, Ana Janic, Marco J. Herold, et Andreas Strasser. 2018. « How Does P53 Induce Apoptosis and How Does This Relate to P53-Mediated Tumour Suppression? ». *Cell Death & Differentiation* 25 (1): 104-13. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>.
- Audia, James E., et Robert M. Campbell. 2016. « Histone Modifications and Cancer ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (4): a019521. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019521>.
- Bacman, Sandra R., Sion L. Williams, Milena Pinto, et Carlos T. Moraes. 2014. « The Use of Mitochondria-Targeted Endonucleases to Manipulate MtDNA ». *Methods in Enzymology* 547: 373-97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801415-8.00018-7>.
- Becker, Thomas, Lena Böttinger, et Nikolaus Pfanner. 2012. « Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network ». *Trends in Biochemical Sciences* 37 (3): 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.004>.
- Becker, Thomas, Sylvia Pfannschmidt, Bernard Guiard, Diana Stojanovski, Dusanka Milenkovic, Stephan Kutik, Nikolaus Pfanner, Chris Meisinger, et Nils Wiedemann. 2008. « Biogenesis of the Mitochondrial TOM Complex: Mim1 Promotes Insertion and Assembly of Signal-Anchored Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (1): 120-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706997200>.
- Bensaad, Karim, Atsushi Tsuruta, Mary A. Selak, M. Nieves Calvo Vidal, Katsunori Nakano, Ramon Bartrons, Eyal Gottlieb, et Karen H. Vousden. 2006. « TIGAR, a P53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis ». *Cell* 126 (1): 107-20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.036>.

- Bienz, Mariann. 2006. « The PHD Finger, a Nuclear Protein-Interaction Domain ». *Trends in Biochemical Sciences*, SPECIAL ISSUE: CELEBRATING 30 YEARS OF TiBS, 31 (1): 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.11.001>.
- Bigot, N., C. Guérillon, S. Loisel, N. Bertheuil, L. Sensebé, K. Tarte, et R. Pedoux. 2015. « ING1b Negatively Regulates HIF1 $\alpha$  Protein Levels in Adipose-Derived Stromal Cells by a SUMOylation-Dependent Mechanism ». *Cell Death & Disease* 6 (janvier): e1612. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.577>.
- Blasco, Maria A. 2007. « Telomere Length, Stem Cells and Aging ». *Nature Chemical Biology* 3 (10): 640-49. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.38>.
- Blondel, Alice, Amine Benberghout, Rémy Pedoux, et Charles Ricordel. 2019. « Exploiting ING2 Epigenetic Modulation as a Therapeutic Opportunity for Non-Small Cell Lung Cancer ». *Cancers* 11 (10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101601>.
- Borkosky, Silvia S., Mehmet Gunduz, Levent Beder, Hidetsugu Tsujigiwa, Ryo Tamamura, Esra Gunduz, Naoki Katase, et al. 2010. « Allelic Loss of the ING Gene Family Loci Is a Frequent Event in Ameloblastoma ». *Oncology Research* 18 (10): 509-18.
- Borkosky, Silvia S., Mehmet Gunduz, Hitoshi Nagatsuka, Levent Bekir Beder, Esra Gunduz, Mahmoud A. L. Sheikh Ali, Andrea P. Rodriguez, et al. 2009. « Frequent Deletion of ING2 Locus at 4q35.1 Associates with Advanced Tumor Stage in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 135 (5): 703-13. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0507-y>.
- Bose, P., S. Thakur, S. Thalappilly, B. Y. Ahn, S. Satpathy, X. Feng, K. Suzuki, S. W. Kim, et K. Riabowol. 2013. « ING1 Induces Apoptosis through Direct Effects at the Mitochondria ». *Cell Death & Disease* 4: e788. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.321>.
- Bourdon, Alice, Limor Minai, Valérie Serre, Jean-Philippe Jais, Emmanuelle Sarzi, Sophie Aubert, Dominique Chrétien, et al. 2007. « Mutation of RRM2B, Encoding P53-Controlled Ribonucleotide Reductase (P53R2), Causes Severe Mitochondrial DNA Depletion ». *Nature Genetics* 39 (6): 776-80. <https://doi.org/10.1038/ng2040>.
- Cairns, Rob A., Isaac S. Harris, et Tak W. Mak. 2011. « Regulation of Cancer Cell Metabolism ». *Nature Reviews. Cancer* 11 (2): 85-95. <https://doi.org/10.1038/nrc2981>.
- Calin, George Adrian, et Carlo Maria Croce. 2006. « MicroRNA-Cancer Connection: The Beginning of a New Tale ». *Cancer Research* 66 (15): 7390-94. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0800>.
- Cann, R. L., M. Stoneking, et A. C. Wilson. 1987. « Mitochondrial DNA and Human Evolution ». *Nature* 325 (6099): 31-36. <https://doi.org/10.1038/325031a0>.
- Canugovi, Chandrika, Scott Maynard, Anne-Cécile V Bayne, Peter Sykora, Jingyan Tian, Nadja C de Souza-Pinto, Deborah L Croteau, et Vilhelm A Bohr. 2010. « The Mitochondrial Transcription Factor A Functions in Mitochondrial Base Excision Repair ». *DNA Repair* 9 (10): 1080-89. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.07.009>.
- Cao, Yiyi, Juan Chen, Dan Wang, Hong Peng, Xixi Tan, Dongmei Xiong, Ailong Huang, et Hua Tang. 2015. « Upregulated in Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma Cells, MiR-331-3p Promotes Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells by Targeting ING5 ». *Oncotarget* 6 (35): 38093-106. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5642>.
- Cekaite, Lina, Trevor Clancy, et Mouldy Sioud. 2010. « Increased MiR-21 Expression during Human Monocyte Differentiation into DCs ». *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 2 (juin): 818-28. <https://doi.org/10.2741/e143>.
- Cengiz, Beyhan, Esra Gunduz, Mehmet Gunduz, Levent Bekir Beder, Ryo Tamamura, Cahit Bagci, Noboru Yamanaka, Kenji Shimizu, et Hitoshi Nagatsuka. 2010. « Tumor-Specific Mutation and Downregulation of ING5 Detected in Oral Squamous Cell Carcinoma ». *International Journal of Cancer* 127 (9): 2088-94. <https://doi.org/10.1002/ijc.25224>.
- Cetin, E., B. Cengiz, E. Gunduz, M. Gunduz, H. Nagatsuka, L. Bekir-Beder, K. Fukushima, et al. 2008. « Deletion Mapping of Chromosome 4q22-35 and Identification of Four Frequently Deleted Regions in Head and Neck Cancers ». *Neoplasia* 55 (4): 299-304.
- Chacinska, Agnieszka, Carla M Koehler, Dusanka Milenkovic, Trevor Lithgow, et Nikolaus Pfanner. 2009. « Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms ». *Cell* 138 (4): 628-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005>.

- Chacinska, Agnieszka, Sylvia Pfannschmidt, Nils Wiedemann, Vera Kozjak, Luiza K. Sanjuán Szklarz, Agnes Schulze-Specking, Kaye N. Truscott, Bernard Guiard, Chris Meisinger, et Nikolaus Pfanner. 2004. « Essential Role of Mia40 in Import and Assembly of Mitochondrial Intermembrane Space Proteins ». *The EMBO Journal* 23 (19): 3735-46. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600389>.
- Chatzi, Afroditi, Phanees Manganas, et Kostas Tokatlidis. 2016. « Oxidative Folding in the Mitochondrial Intermembrane Space: A Regulated Process Important for Cell Physiology and Disease ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1863 (6 Pt A): 1298-1306. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.023>.
- Chen, Dexi, Zhiyong Yu, Zhiyi Zhu, et Charles D Lopez. 2006. « The P53 Pathway Promotes Efficient Mitochondrial DNA Base Excision Repair in Colorectal Cancer Cells ». *Cancer Research* 66 (7): 3485-94. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4103>.
- Chen, G., Y. Wang, M. Garate, J. Zhou, et G. Li. 2010. « The Tumor Suppressor ING3 Is Degraded by SCF(Skp2)-Mediated Ubiquitin-Proteasome System ». *Oncogene* 29 (10): 1498-1508. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.424>.
- Chen, G., B. Zhang, H. Xu, Y. Sun, Y. Shi, Y. Luo, H. Jia, et F. Wang. 2017. « Suppression of Sirt1 Sensitizes Lung Cancer Cells to WEE1 Inhibitor MK-1775-Induced DNA Damage and Apoptosis ». *Oncogene* 36 (50): 6863-72. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.297>.
- Chen, Kuo-Hsin, Po-Yuan Tung, Jiahn-Chun Wu, Ying Chen, Po-Chun Chen, Shih-Horng Huang, et Seu-Mei Wang. 2008. « An Acidic Extracellular PH Induces Src Kinase-Dependent Loss of Beta-Catenin from the Adherens Junction ». *Cancer Letters* 267 (1): 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.005>.
- Chen, Wen-Ting, Yu-Jia Yang, Zhen-Dong Zhang, Qiang An, Na Li, Wei Liu, et Bing Yang. 2017. « MiR-1307 Promotes Ovarian Cancer Cell Chemoresistance by Targeting the ING5 Expression ». *Journal of Ovarian Research* 10 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0301-4>.
- Chipuk, Jerry E., Lisa Bouchier-Hayes, Tomomi Kuwana, Donald D. Newmeyer, et Douglas R. Green. 2005. « PUMA Couples the Nuclear and Cytoplasmic Proapoptotic Function of P53 ». *Science (New York, N.Y.)* 309 (5741): 1732-35. <https://doi.org/10.1126/science.1114297>.
- Chipuk, Jerry E., Tomomi Kuwana, Lisa Bouchier-Hayes, Nathalie M. Droin, Donald D. Newmeyer, Martin Schuler, et Douglas R. Green. 2004. « Direct Activation of Bax by P53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis ». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5660): 1010-14. <https://doi.org/10.1126/science.1092734>.
- Coffey, G., et C. Campbell. 2000. « An Alternate Form of Ku80 Is Required for DNA End-Binding Activity in Mammalian Mitochondria ». *Nucleic Acids Research* 28 (19): 3793-3800. <https://doi.org/10.1093/nar/28.19.3793>.
- Coles, Andrew H., Huiling Liang, Zhiqing Zhu, Concetta G. A. Marfella, Joonsoo Kang, Anthony N. Imbalzano, et Stephen N. Jones. 2007. « Deletion of P37Ing1 in Mice Reveals a P53-Independent Role for Ing1 in the Suppression of Cell Proliferation, Apoptosis, and Tumorigenesis ». *Cancer Research* 67 (5): 2054-61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3558>.
- Collavin, L., A. Lunardi, et G. Del Sal. 2010. « P53-Family Proteins and Their Regulators: Hubs and Spokes in Tumor Suppression ». *Cell Death & Differentiation* 17 (6): 901-11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.35>.
- Croce, Carlo M. 2009. « Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation in Cancer ». *Nature Reviews Genetics* 10 (10): 704-14. <https://doi.org/10.1038/nrg2634>.
- Cui, Shufang, Xin Liao, Chao Ye, Xin Yin, Minghui Liu, Yeting Hong, Mengchao Yu, et al. 2017. « ING5 Suppresses Breast Cancer Progression and Is Regulated by MiR-24 ». *Molecular Cancer* 16 (1): 89. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0658-z>.
- Culurgioni, Simone, Inés G. Muñoz, Alberto Moreno, Alicia Palacios, Maider Villate, Ignacio Palmero, Guillermo Montoya, et Francisco J. Blanco. 2012. « Crystal Structure of Inhibitor of Growth 4 (ING4) Dimerization Domain Reveals Functional Organization of ING Family of Chromatin-Binding Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 10876-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.330001>.
- Culurgioni, Simone, Inés G. Muñoz, Alicia Palacios, Pilar Redondo, Francisco J. Blanco, et Guillermo Montoya. 2010. « Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of the Dimerization Domain of the Tumour Suppressor ING4 ». *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications* 66 (Pt 5): 567-70. <https://doi.org/10.1107/S1744309110010080>.

- Dantas, Arthur, Buthaina Al Shueilli, Yang Yang, Arash Nabbi, Dieter Fink, et Karl Riabowol. 2019. « Biological Functions of the ING Proteins ». *Cancers* 11 (11). <https://doi.org/10.3390/cancers11111817>.
- Davis, Alison J., Nathan N. Alder, Robert E. Jensen, et Arthur E. Johnson. 2007. « The Tim9p/10p and Tim8p/13p Complexes Bind to Specific Sites on Tim23p during Mitochondrial Protein Import ». *Molecular Biology of the Cell* 18 (2): 475-86. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-06-0546>.
- DeBerardinis, Ralph J. 2020. « Tumor Microenvironment, Metabolism, and Immunotherapy ». *New England Journal of Medicine*, février. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1914890>.
- Der, C. J., T. G. Krontiris, et G. M. Cooper. 1982. « Transforming Genes of Human Bladder and Lung Carcinoma Cell Lines Are Homologous to the Ras Genes of Harvey and Kirsten Sarcoma Viruses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (11): 3637-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3637>.
- Dmitrieva, Natalia I., Daniela Malide, et Maurice B. Burg. 2011. « Mre11 Is Expressed in Mammalian Mitochondria Where It Binds to Mitochondrial DNA ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301 (3): R632-640. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00853.2010>.
- Domena, J. D., et D. W. Mosbaugh. 1985. « Purification of Nuclear and Mitochondrial Uracil-DNA Glycosylase from Rat Liver. Identification of Two Distinct Subcellular Forms ». *Biochemistry* 24 (25): 7320-28. <https://doi.org/10.1021/bi00346a045>.
- Doyon, Yannick, Christelle Cayrou, Mukta Ullah, Anne-Julie Landry, Valérie Côté, William Selleck, William S Lane, Song Tan, Xiang-Jiao Yang, et Jacques Côté. 2006. « ING Tumor Suppressor Proteins Are Critical Regulators of Chromatin Acetylation Required for Genome Expression and Perpetuation ». *Molecular Cell* 21 (1): 51-64. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.12.007>.
- Drexler, H. G. 1998. « Review of Alterations of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor INK4 Family Genes P15, P16, P18 and P19 in Human Leukemia-Lymphoma Cells ». *Leukemia* 12 (6): 845-59. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401043>.
- D'Souza, Aaron R., et Michal Minczuk. 2018. « Mitochondrial transcription and translation: overview ». *Essays in Biochemistry* 62 (3): 309-20. <https://doi.org/10.1042/EBC20170102>.
- Dudek, Jan, Peter Rehling, et Martin van der Laan. 2013. « Mitochondrial Protein Import: Common Principles and Physiological Networks ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Protein Import and Quality Control in Mitochondria and Plastids*, 1833 (2): 274-85. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.028>.
- Eapen, Shawn A., Stuart J. Netherton, Krishna P. Sarker, Lili Deng, Angela Chan, Karl Riabowol, et Shirin Bonni. 2012. « Identification of a Novel Function for the Chromatin Remodeling Protein ING2 in Muscle Differentiation ». *PLoS One* 7 (7): e40684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040684>.
- Eiyama, Akinori, et Koji Okamoto. 2015. « PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy in Mammalian Cells ». *Current Opinion in Cell Biology* 33 (avril): 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.01.002>.
- Falkenberg, Maria, Nils-Göran Larsson, et Claes M. Gustafsson. 2007. « DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria ». *Annual Review of Biochemistry* 76: 679-99. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.152028>.
- Farge, Géraldine, et Maria Falkenberg. 2019. « Organization of DNA in Mammalian Mitochondria ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112770>.
- Feinberg, A. P., et B. Vogelstein. 1983. « Hypomethylation Distinguishes Genes of Some Human Cancers from Their Normal Counterparts ». *Nature* 301 (5895): 89-92. <https://doi.org/10.1038/301089a0>.
- Feinberg, Andrew P., Michael A. Koldobskiy, et Anita Göndör. 2016. « Epigenetic Modulators, Modifiers and Mediators in Cancer Aetiology and Progression ». *Nature Reviews. Genetics* 17 (5): 284-99. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.13>.
- Felli, Nadia, Laura Fontana, Elvira Pelosi, Rosanna Botta, Desirée Bonci, Francesco Facchiano, Francesca Liuzzi, et al. 2005. « MicroRNAs 221 and 222 Inhibit Normal Erythropoiesis and Erythroleukemic Cell Growth via Kit Receptor Down-Modulation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (50): 18081-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506216102>.



- Feng, Xiaolan, Shirin Bonni, et Karl Riabowol. 2006. « HSP70 Induction by ING Proteins Sensitizes Cells to Tumor Necrosis Factor Alpha Receptor-Mediated Apoptosis ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (24): 9244-55. <https://doi.org/10.1128/MCB.01538-06>.
- Fink, Dieter, Tienyin Yau, Arash Nabbi, Bettina Wagner, Christine Wagner, Shiting Misaki Hu, Viktor Lang, Stephan Handschuh, Karl Riabowol, et Thomas Rüllicke. 2019. « Loss of Ing3 Expression Results in Growth Retardation and Embryonic Death ». *Cancers* 12 (1). <https://doi.org/10.3390/cancers12010080>.
- Freed-Pastor, William A., et Carol Prives. 2012. « Mutant P53: One Name, Many Proteins ». *Genes & Development* 26 (12): 1268-86. <https://doi.org/10.1101/gad.190678.112>.
- Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert, et T. P. Dryja. 1986. « A Human DNA Segment with Properties of the Gene That Predisposes to Retinoblastoma and Osteosarcoma ». *Nature* 323 (6089): 643-46. <https://doi.org/10.1038/323643a0>.
- Füllgrabe, J., E. Kavanagh, et B. Joseph. 2011. « Histone Onco-Modifications ». *Oncogene* 30 (31): 3391-3403. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.121>.
- Galluzzi, Lorenzo, Eugenia Morselli, Oliver Kepp, Ilio Vitale, Marcello Pinti, et Guido Kroemer. 2011. « Mitochondrial Liaisons of P53 ». *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (6): 1691-1714. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3504>.
- Gao, Yujing, Hongning Ma, Chanchan Gao, Ye Lv, XueHua Chen, Rongrong Xu, Miao Sun, et al. 2018. « Tumor-Promoting Properties of MiR-8084 in Breast Cancer through Enhancing Proliferation, Suppressing Apoptosis and Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition ». *Journal of Translational Medicine* 16 (1): 38. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1419-5>.
- Garate, Marco, Eric I. Campos, Jason A. Bush, Hao Xiao, et Gang Li. 2007. « Phosphorylation of the Tumor Suppressor P33(ING1b) at Ser-126 Influences Its Protein Stability and Proliferation of Melanoma Cells ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (13): 3705-16. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8069com>.
- Garate, Marco, Ronald P. C. Wong, Eric I. Campos, Yemin Wang, et Gang Li. 2008. « NAD(P)H Quinone Oxidoreductase 1 Inhibits the Proteasomal Degradation of the Tumour Suppressor P33(ING1b) ». *EMBO Reports* 9 (6): 576-81. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.48>.
- Garkavtsev, I., I. A. Grigorian, V. S. Ossovskaya, M. V. Chernov, P. M. Chumakov, et A. V. Gudkov. 1998. « The Candidate Tumour Suppressor P33ING1 Cooperates with P53 in Cell Growth Control ». *Nature* 391 (6664): 295-98. <https://doi.org/10.1038/34675>.
- Garkavtsev, I., A. Kazarov, A. Gudkov, et K. Riabowol. 1996a. « Suppression of the Novel Growth Inhibitor P33ING1 Promotes Neoplastic Transformation ». *Nature Genetics* 14 (4): 415-20. <https://doi.org/10.1038/ng1296-415>.
- . 1996b. « Suppression of the Novel Growth Inhibitor P33ING1 Promotes Neoplastic Transformation ». *Nature Genetics* 14 (4): 415-20. <https://doi.org/10.1038/ng1296-415>.
- Garofalo, Michela, Gianpiero Di Leva, Giulia Romano, Gerard Nuovo, Sung-Suk Suh, Apollinaire Ngankeu, Cristian Taccioli, et al. 2009. « MiR-221&222 Regulate TRAIL Resistance and Enhance Tumorigenicity through PTEN and TIMP3 Downregulation ». *Cancer Cell* 16 (6): 498-509. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.10.014>.
- Gatenby, Robert A., Edward T. Gawlinski, Arthur F. Gmitro, Brant Kaylor, et Robert J. Gillies. 2006. « Acid-Mediated Tumor Invasion: A Multidisciplinary Study ». *Cancer Research* 66 (10): 5216-23. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4193>.
- Giacomello, Marta, Aswin Pyakurel, Christina Glytsou, et Luca Scorrano. 2020. « The Cell Biology of Mitochondrial Membrane Dynamics ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 21 (4): 204-24. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>.
- Glasauer, Andrea, et Navdeep S. Chandel. 2013. « ROS ». *Current Biology: CB* 23 (3): R100-102. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.12.011>.
- Göder, Anja, Claudia Emmerich, Teodora Nikolova, Nicole Kiweler, Maria Schreiber, Toni Kühl, Diana Imhof, et al. 2018. « HDAC1 and HDAC2 Integrate Checkpoint Kinase Phosphorylation and Cell Fate through the Phosphatase-2A Subunit PR130 ». *Nature Communications* 9 (1): 764. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03096-0>.

- Gong, Wei, Michael Russell, Keiko Suzuki, et Karl Riabowol. 2006. « Subcellular Targeting of P33ING1b by Phosphorylation-Dependent 14-3-3 Binding Regulates P21WAF1 Expression ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (8): 2947-54. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.2947-2954.2006>.
- Gou, Wen-Feng, Xue-Feng Yang, Dao-Fu Shen, Shuang Zhao, Hong-Zhi Sun, Jun-Sheng Luo, et Hua-Chuan Zheng. 2017. « Immunohistochemical Profile of ING3 Protein in Normal and Cancerous Tissues ». *Oncology Letters* 13 (3): 1631-36. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5632>.
- Gournay, Marjorie, Mathieu Paineau, Jérôme Archambeau, et Rémy Pedoux. 2019. « Regulat-INGs in Tumors and Diseases: Focus on NcRNAs ». *Cancer Letters* 447 (avril): 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.006>.
- Gozani, Or, Philip Karuman, David R. Jones, Dmitri Ivanov, James Cha, Alexey A. Lugovskoy, Cheryl L. Baird, et al. 2003. « The PHD Finger of the Chromatin-Associated Protein ING2 Functions as a Nuclear Phosphoinositide Receptor ». *Cell* 114 (1): 99-111. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00480-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00480-x).
- Greenberg, Maxim V. C., et Deborah Bourc'his. 2019. « The Diverse Roles of DNA Methylation in Mammalian Development and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (10): 590-607. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0159-6>.
- Greger, V., E. Passarge, W. Höpping, E. Messmer, et B. Horsthemke. 1989. « Epigenetic Changes May Contribute to the Formation and Spontaneous Regression of Retinoblastoma ». *Human Genetics* 83 (2): 155-58. <https://doi.org/10.1007/BF00286709>.
- Grumbt, Barbara, Vincent Stroobant, Nadia Terziyska, Lars Israel, et Kai Hell. 2007. « Functional Characterization of Mia40p, the Central Component of the Disulfide Relay System of the Mitochondrial Intermembrane Space ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (52): 37461-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707439200>.
- Guerillon, C., D. Larrieu, F. Mourcin, C. Brambilla, S. Sengupta, et R. Pedoux. 2012. « 532 The Tumor Suppressive Protein ING2 Is Required for DNA Damage Response Proteins Recruitment and Promotes NHEJ ». *European Journal of Cancer Supplement* 5 (48): S126. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(12\)71191-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(12)71191-7).
- Guérillon, Claire, Nicolas Bigot, et Rémy Pedoux. 2013. « The ING Tumor Suppressor Genes: Status in Human Tumors ». *Cancer Letters*, décembre. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.016>.
- Guérillon, Claire, Delphine Larrieu, et Rémy Pedoux. 2013. « ING1 and ING2: Multifaceted Tumor Suppressor Genes ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 70 (20): 3753-72. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1270-z>.
- Gunduz, M., M. Ouchida, K. Fukushima, H. Hanafusa, T. Etani, S. Nishioka, K. Nishizaki, et K. Shimizu. 2000. « Genomic Structure of the Human ING1 Gene and Tumor-Specific Mutations Detected in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas ». *Cancer Research* 60 (12): 3143-46.
- Gunduz, Mehmet, Levent Bekir Beder, Esra Gunduz, Hitoshi Nagatsuka, Kunihiro Fukushima, Davut Pehlivan, Eren Cetin, et al. 2008. « Downregulation of ING3 mRNA Expression Predicts Poor Prognosis in Head and Neck Cancer ». *Cancer Science* 99 (3): 531-38. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00708.x>.
- Gunduz, Mehmet, Mamoru Ouchida, Kunihiro Fukushima, Sachio Ito, Yoshimi Jitsumori, Tomoko Nakashima, Noriyuki Nagai, Kazunori Nishizaki, et Kenji Shimizu. 2002. « Allelic Loss and Reduced Expression of the ING3, a Candidate Tumor Suppressor Gene at 7q31, in Human Head and Neck Cancers ». *Oncogene* 21 (28): 4462-70. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205540>.
- Guo, Qin, et Walter Fast. 2011. « Citrullination of Inhibitor of Growth 4 (ING4) by Peptidylarginine Deminase 4 (PAD4) Disrupts the Interaction between ING4 and P53 ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (19): 17069-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230961>.
- Gustafsson, Claes M., Maria Falkenberg, et Nils-Göran Larsson. 2016. « Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA ». *Annual Review of Biochemistry* 85 (juin): 133-60. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014402>.
- Gutschner, Tony, et Sven Diederichs. 2012. « The hallmarks of cancer ». *RNA Biology* 9 (6): 703-19. <https://doi.org/10.4161/rna.20481>.

- Guzel, Esra, Tugba Muhlise Okyay, Burhanettin Yalcinkaya, Seymanur Karacaoglu, Melek Gocmen, et Muhammed Huseyin Akcakuyu. 2019. « Tumor suppressor and oncogenic role of long non-coding RNAs in cancer ». *Northern Clinics of Istanbul* 7 (1): 81-86. <https://doi.org/10.14744/nci.2019.46873>.
- György, Bence, Erzsébet Tóth, Edit Tarcsa, András Falus, et Edit I. Buzás. 2006. « Citrullination: A Posttranslational Modification in Health and Disease ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (10): 1662-77. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.03.008>.
- Hahn, Alexander, Kristian Parey, Maike Bublitz, Deryck J. Mills, Volker Zickermann, Janet Vonck, Werner Kühlbrandt, et Thomas Meier. 2016. « Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology ». *Molecular Cell* 63 (3): 445-56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.037>.
- Han, Xiao-Rui, Xi-Zhuang Bai, Yu Sun, et Yan Yang. 2014. « Nuclear ING2 Expression Is Reduced in Osteosarcoma ». *Oncology Reports* 32 (5): 1967-72. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3458>.
- Han, Xijing, Xiaolan Feng, Jerome B. Rattner, Heather Smith, Pinaki Bose, Keiko Suzuki, Mohamed A. Soliman, Michelle S. Scott, Brian E. Burke, et Karl Riabowol. 2008. « Tethering by Lamin A Stabilizes and Targets the ING1 Tumour Suppressor ». *Nature Cell Biology* 10 (11): 1333-40. <https://doi.org/10.1038/ncb1792>.
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2000. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell* 100 (1): 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- . 2011. « Hallmarks of Cancer: The next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hanmod, Santosh S., Guan Wang, Holly Edwards, Steven A. Buck, Yubin Ge, Jeffrey W. Taub, et Zhihong Wang. 2015. « Targeting Histone Deacetylases (HDACs) and Wee1 for Treating High-Risk Neuroblastoma ». *Pediatric Blood & Cancer* 62 (1): 52-59. <https://doi.org/10.1002/pbc.25232>.
- He, De, Huilai Miao, Yumin Xu, Longhui Xiong, Yi Wang, Hongxia Xiang, Heng Zhang, et Zhiyong Zhang. 2014. « MiR-371-5p Facilitates Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Decreases Patient Survival ». *PloS One* 9 (11): e112930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112930>.
- He, Gordon H. Y., Caren C. Helbing, Mary J. Wagner, Christoph W. Sensen, et Karl Riabowol. 2005. « Phylogenetic Analysis of the ING Family of PHD Finger Proteins ». *Molecular Biology and Evolution* 22 (1): 104-16. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh256>.
- Hebert, Sadie L., Ian R. Lanza, et K. Sreekumaran Nair. 2010. « Mitochondrial DNA Alterations and Reduced Mitochondrial Function in Aging ». *Mechanisms of ageing and development* 131 (7-8): 451-62. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.03.007>.
- Hell, Kai. 2008. « The Erv1–Mia40 Disulfide Relay System in the Intermembrane Space of Mitochondria ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Redox regulation of protein folding, 1783 (4): 601-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.12.005>.
- Hill, D. Ashley, Jennifer Ivanovich, John R. Priest, Christina A. Gurnett, Louis P. Dehner, David Desruisseau, Jason A. Jarzembowski, et al. 2009. « DICER1 Mutations in Familial Pleuropulmonary Blastoma ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5943): 965. <https://doi.org/10.1126/science.1174334>.
- Hoffman, William H., Siham Biade, Jack T. Zilfou, Jiandong Chen, et Maureen Murphy. 2002. « Transcriptional Repression of the Anti-Apoptotic Survivin Gene by Wild Type P53 ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (5): 3247-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106643200>.
- Holliday, R., et G. W. Grigg. 1993. « DNA Methylation and Mutation ». *Mutation Research* 285 (1): 61-67. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90052-h](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90052-h).
- Horbay, Rostyslav, et Rostyslav Bilyy. 2016. « Mitochondrial Dynamics during Cell Cycling ». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 21 (12): 1327-35. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1295-5>.
- Hornbeck, Peter V., Jon M. Kornhauser, Sasha Tkachev, Bin Zhang, Elzbieta Skrzypek, Beth Murray, Vaughan Latham, et Michael Sullivan. 2012. « PhosphoSitePlus: A Comprehensive Resource for Investigating the Structure and Function of Experimentally Determined Post-Translational Modifications in Man and Mouse ». *Nucleic Acids Research* 40 (Database issue): D261-270. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1122>.

- Hosios, Aaron M., Vivian C. Hecht, Laura V. Danai, Marc O. Johnson, Jeffrey C. Rathmell, Matthew L. Steinhauser, Scott R. Manalis, et Matthew G. Vander Heiden. 2016. « Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells ». *Developmental Cell* 36 (5): 540-49. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.012>.
- Hotchkiss, Richard S, Andreas Strasser, Jonathan E McDunn, et Paul E Swanson. 2009. « Cell Death ». *The New England Journal of Medicine* 361 (16): 1570-83. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0901217>.
- Howe, LeAnn, Thomas Kusch, Nemone Muster, Ranjana Chaterji, John R. Yates, et Jerry L. Workman. 2002. « Yng1p Modulates the Activity of Sas3p as a Component of the Yeast NuA3 Histone Acetyltransferase Complex ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (14): 5047-53. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.14.5047-5053.2002>.
- Hu, Xiao, Yujie Feng, Lin Sun, Linlin Qu, et Chuandong Sun. 2017. « Roles of MicroRNA-330 and Its Target Gene ING4 in the Development of Aggressive Phenotype in Hepatocellular Carcinoma Cells ». *Digestive Diseases and Sciences* 62 (3): 715-22. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4429-2>.
- Israelsen, William J., et Matthew G. Vander Heiden. 2015. « Pyruvate Kinase: Function, Regulation and Role in Cancer ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 43 (juillet): 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.08.004>.
- Jäger, D., E. Stockert, M. J. Scanlan, A. O. Güre, E. Jäger, A. Knuth, L. J. Old, et Y. T. Chen. 1999. « Cancer-Testis Antigens and ING1 Tumor Suppressor Gene Product Are Breast Cancer Antigens: Characterization of Tissue-Specific ING1 Transcripts and a Homologue Gene ». *Cancer Research* 59 (24): 6197-6204.
- Javanmardi, Sanaz, Mahmoud Reza Aghamaali, Samira Sadat Abolmaali, Samaneh Mohammadi, et Ali Mohammad Tamaddon. 2017. « MiR-21, An Oncogenic Target MiRNA for Cancer Therapy: Molecular Mechanisms and Recent Advancements in Chemo and Radio-Resistance ». *Current Gene Therapy* 16 (6): 375-89. <https://doi.org/10.2174/1566523217666170102105119>.
- Jiang, Jian, Yan Liu, Yanxia Zhao, Fei Tian, et Gaoyan Wang. 2019. « MiR-153-3p Suppresses Inhibitor of Growth Protein 2 Expression to Function as Tumor Suppressor in Acute Lymphoblastic Leukemia ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 18 (décembre): 1533033819852990. <https://doi.org/10.1177/1533033819852990>.
- Jiang, Ming, Li-Yang Zhou, Nan Xu, et Qing An. 2018. « Down-Regulation of MiR-500 and MiR-628 Suppress Non-Small Cell Lung Cancer Proliferation, Migration and Invasion by Targeting ING1 ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 108 (décembre): 1628-39. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.145>.
- Jones, David R., Yvette Bultsma, Willem-Jan Keune, Jonathan R. Halstead, Dallila Elouarrat, Shabaz Mohammed, Albert J. Heck, Clive S. D'Santos, et Nullin Divecha. 2006. « Nuclear PtdIns5P as a Transducer of Stress Signaling: An in Vivo Role for PIP4Kbeta ». *Molecular Cell* 23 (5): 685-95. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.07.014>.
- Kadenbach, Bernhard. 2003. « Intrinsic and Extrinsic Uncoupling of Oxidative Phosphorylation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1604 (2): 77-94. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(03\)00027-6](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(03)00027-6).
- Kaguni, Laurie S. 2004. « DNA Polymerase Gamma, the Mitochondrial Replicase ». *Annual Review of Biochemistry* 73: 293-320. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161455>.
- Kamphorst, Jurre J., Michel Nofal, Cosimo Commisso, Sean R. Hackett, Wenyun Lu, Elda Grabocka, Matthew G. Vander Heiden, et al. 2015. « Human Pancreatic Cancer Tumors Are Nutrient Poor and Tumor Cells Actively Scavenge Extracellular Protein ». *Cancer Research* 75 (3): 544-53. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2211>.
- Kanki, Tomotake, Hiroshi Nakayama, Narie Sasaki, Koji Takio, Tanfis Istiaq Alam, Naotaka Hamasaki, et Dongchon Kang. 2004. « Mitochondrial Nucleoid and Transcription Factor A ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1011 (avril): 61-68. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-41088-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-662-41088-2_7).
- Kataoka, Hiromi, Paul Bonnefin, Diego Vieyra, Xiaolan Feng, Yasuo Hara, Yutaka Miura, Takashi Joh, et al. 2003. « ING1 Represses Transcription by Direct DNA Binding and through Effects on P53 ». *Cancer Research* 63 (18): 5785-92.
- Kazak, Lawrence, Aurelio Reyes, et Ian J. Holt. 2012. « Minimizing the Damage: Repair Pathways Keep Mitochondrial DNA Intact ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (10): 659-71. <https://doi.org/10.1038/nrm3439>.
- Kim, Kimberly H., et Charles W. M. Roberts. 2016. « Targeting EZH2 in Cancer ». *Nature Medicine* 22 (2): 128-34. <https://doi.org/10.1038/nm.4036>.

- Kim, Sophia, Senthil Natesan, Gabriel Cornilescu, Samuel Carlson, Marco Tonelli, Urszula L. McClurg, Olivier Binda, et al. 2016. « Mechanism of Histone H3K4me3 Recognition by the Plant Homeodomain of Inhibitor of Growth 3 ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (35): 18326-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.690651>.
- Knudson, A. G. 1971. « Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (4): 820-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820>.
- Kontic, Milica, Iciar Palacios, Ángelo Gámez, Isabel Camino, Zoran Latkovic, Dejan Rasic, Vera Krstic, Vera Bunjevacki, Javier Alonso, et Ángel Pestaña. 2006. « New RB1 Oncogenic Mutations and Intronic Polymorphisms in Serbian Retinoblastoma Patients: Genetic Counseling Implications ». *Journal of Human Genetics* 51 (10): 909-13. <https://doi.org/10.1007/s10038-006-0036-y>.
- Koshiba, Takumi, Scott A. Detmer, Jens T. Kaiser, Hsiuchen Chen, J. Michael McCaffery, et David C. Chan. 2004. « Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5685): 858-62. <https://doi.org/10.1126/science.1099793>.
- Kouzarides, Tony. 2007. « Chromatin Modifications and Their Function ». *Cell* 128 (4): 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.
- Krogan, Nevan J., Gerard Cagney, Haiyuan Yu, Gouqing Zhong, Xinghua Guo, Alexandr Ignatchenko, Joyce Li, et al. 2006. « Global Landscape of Protein Complexes in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Nature* 440 (7084): 637-43. <https://doi.org/10.1038/nature04670>.
- Kulis, Marta, et Manel Esteller. 2010. « DNA Methylation and Cancer ». *Advances in Genetics* 70: 27-56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2>.
- Kumamoto, Kensuke, Kaori Fujita, Reiko Kurotani, Motonobu Saito, Motoko Unoki, Nobutoshi Hagiwara, Hideaki Shiga, et al. 2009. « ING2 Is Upregulated in Colon Cancer and Increases Invasion by Enhanced MMP13 Expression ». *International Journal of Cancer* 125 (6): 1306-15. <https://doi.org/10.1002/ijc.24437>.
- Kuo, Wei-Hung W., Yemin Wang, Ronald P. C. Wong, Eric I. Campos, et Gang Li. 2007. « The ING1b Tumor Suppressor Facilitates Nucleotide Excision Repair by Promoting Chromatin Accessibility to XPA ». *Experimental Cell Research* 313 (8): 1628-38. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.02.010>.
- Kuzmichev, A., Y. Zhang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, et D. Reinberg. 2002. « Role of the Sin3-Histone Deacetylase Complex in Growth Regulation by the Candidate Tumor Suppressor P33(ING1) ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (3): 835-48.
- Lang, B. F., M. W. Gray, et G. Burger. 1999. « Mitochondrial Genome Evolution and the Origin of Eukaryotes ». *Annual Review of Genetics* 33: 351-97. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.351>.
- Lango-Chavarria, M., G. K. Chimal-Ramirez, M. E. Ruiz-Tachiquin, N. A. Espinoza-Sánchez, M. C. Suárez-Arriaga, et E. M. Fuentes-Panana. 2017. « A 22q11.2 Amplification in the Region Encoding MicroRNA-650 Correlates with the Epithelial to Mesenchymal Transition in Breast Cancer Primary Cultures of Mexican Patients ». *International Journal of Oncology* 50 (2): 432-40. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3842>.
- Larrieu, Delphine, Damien Ythier, Romuald Binet, Christian Brambilla, Elisabeth Brambilla, Sagar Sengupta, et Rémy Pedoux. 2009. « ING2 Controls the Progression of DNA Replication Forks to Maintain Genome Stability ». *EMBO Reports* 10 (10): 1168-74. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.180>.
- Larrieu, Delphine, Damien Ythier, Christian Brambilla, et Rémy Pedoux. 2010. « ING2 Controls the G1 to S-Phase Transition by Regulating P21 Expression ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (19): 3984-90.
- Lawrence, Michael S., Petar Stojanov, Paz Polak, Gregory V. Kryukov, Kristian Cibulskis, Andrey Sivachenko, Scott L. Carter, et al. 2013. « Mutational Heterogeneity in Cancer and the Search for New Cancer-Associated Genes ». *Nature* 499 (7457): 214-18. <https://doi.org/10.1038/nature12213>.
- Lee, A. C., X. Xu, E. Blachly-Dyson, M. Forte, et M. Colombini. 1998. « The Role of Yeast VDAC Genes on the Permeability of the Mitochondrial Outer Membrane ». *The Journal of Membrane Biology* 161 (2): 173-81. <https://doi.org/10.1007/s002329900324>.

- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et V. Ambros. 1993. « The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14 ». *Cell* 75 (5): 843-54. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y).
- Leung, Ka Man, Lai See Po, Fan Cheung Tsang, Wai Yi Siu, Anita Lau, Horace T. B. Ho, et Randy Y. C. Poon. 2002. « The Candidate Tumor Suppressor ING1b Can Stabilize P53 by Disrupting the Regulation of P53 by MDM2 ». *Cancer Research* 62 (17): 4890-93.
- Li, Jin, Yuan Wang, Cheng-Gong Zhang, Han-Juan Xiao, Hai-Juan Xiao, Jun-Ming Hu, Jun-Ming Hou, et Jing-Dong He. 2018. « Effect of Long Non-Coding RNA Gas5 on Proliferation, Migration, Invasion and Apoptosis of Colorectal Cancer HT-29 Cell Line ». *Cancer Cell International* 18: 4. <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0478-7>.
- Li, Shouwei, Ailiang Zeng, Qi Hu, Wei Yan, Yanwei Liu, et Yongping You. 2017. « MiR-423-5p Contributes to a Malignant Phenotype and Temozolomide Chemoresistance in Glioblastomas ». *Neuro-Oncology* 19 (1): 55-65. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now129>.
- Li, Yang, Hui Deng, Lei Lv, Cheng Zhang, Liting Qian, Jun Xiao, Weidong Zhao, et al. 2015. « The MiR-193a-3p-Regulated ING5 Gene Activates the DNA Damage Response Pathway and Inhibits Multi-Chemoresistance in Bladder Cancer ». *Oncotarget* 6 (12): 10195-206. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3555>.
- Lim, Albert Z., Robert McFarland, Robert W. Taylor, et Gráinne S. Gorman. 1993. « RRM2B Mitochondrial DNA Maintenance Defects ». In *GeneReviews*®, édité par Margaret P. Adam, Holly H. Arding, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora JH Bean, Ghayda Mirzaa, et Anne Amemiya. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK195854/>.
- Lin, Ching-Kow E., John S. Kaptein, et Javed Sheikh. 2017. « Differential Expression of MicroRNAs and Their Possible Roles in Patients with Chronic Idiopathic Urticaria and Active Hives ». *Allergy & Rhinology (Providence, R.I.)* 8 (2): 67-80. <https://doi.org/10.2500/ar.2017.8.0199>.
- Liu, Juan, Cen Zhang, Wenwei Hu, et Zhaohui Feng. 2019. « Tumor Suppressor P53 and Metabolism ». *Journal of Molecular Cell Biology* 11 (4): 284-92. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy070>.
- Liu, Minghao, Yiqi Du, Jun Gao, Jianqiang Liu, Xiangyu Kong, Yanfang Gong, Zhaoshen Li, Hongyu Wu, et Hui Chen. 2013. « Aberrant Expression MiR-196a Is Associated with Abnormal Apoptosis, Invasion, and Proliferation of Pancreatic Cancer Cells ». *Pancreas* 42 (7): 1169-81. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3182962acb>.
- Liu, Nansong, Jiadong Wang, Jifeng Wang, Rukai Wang, Zhongle Liu, Yao Yu, et Hong Lu. 2013. « ING5 Is a Tip60 Cofactor That Acetylates P53 in Response to DNA Damage ». *Cancer Research* 73 (12): 3749-60. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3684>.
- Loewith, R., M. Meijer, S. P. Lees-Miller, K. Riabowol, et D. Young. 2000. « Three Yeast Proteins Related to the Human Candidate Tumor Suppressor P33(ING1) Are Associated with Histone Acetyltransferase Activities ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (11): 3807-16. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.11.3807-3816.2000>.
- Loewith, R., J. S. Smith, M. Meijer, T. J. Williams, N. Bachman, J. D. Boeke, et D. Young. 2001. « Pho23 Is Associated with the Rpd3 Histone Deacetylase and Is Required for Its Normal Function in Regulation of Gene Expression and Silencing in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (26): 24068-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102176200>.
- Losón, Oliver C., Zhiyin Song, Hsiuchen Chen, et David C. Chan. 2013. « Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 Mediate Drp1 Recruitment in Mitochondrial Fission ». *Molecular Biology of the Cell* 24 (5): 659-67. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-10-0721>.
- Lu, F., D. L. Dai, M. Martinka, V. Ho, et G. Li. 2006. « Nuclear ING2 Expression Is Reduced in Human Cutaneous Melanomas ». *British Journal of Cancer* 95 (1): 80-86. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603205>.
- Lytle, J. Robin, Therese A. Yario, et Joan A. Steitz. 2007. « Target mRNAs Are Repressed as Efficiently by MicroRNA-Binding Sites in the 5' UTR as in the 3' UTR ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (23): 9667-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703820104>.
- Ma, Yuan, Ruijuan Yan, Qiang Wan, Bo Lv, Ying Yang, Tingting Lv, et Wei Xin. 2020. « Inhibitor of Growth 2 Regulates the High Glucose-Induced Cell Cycle Arrest and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Renal Proximal Tubular Cells ». *Journal of Physiology and Biochemistry*, mai. <https://doi.org/10.1007/s13105-020-00743-3>.

- Marchenko, N D, A Zaika, et U M Moll. 2000. « Death Signal-Induced Localization of P53 Protein to Mitochondria. A Potential Role in Apoptotic Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (21): 16202-12.
- Mason, Penelope A., Elizabeth C. Matheson, Andrew G. Hall, et Robert N. Lightowers. 2003. « Mismatch Repair Activity in Mammalian Mitochondria ». *Nucleic Acids Research* 31 (3): 1052-58. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg167>.
- Mathupala, S. P., C. Heese, et P. L. Pedersen. 1997. « Glucose Catabolism in Cancer Cells. The Type II Hexokinase Promoter Contains Functionally Active Response Elements for the Tumor Suppressor P53 ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (36): 22776-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.36.22776>.
- Matoba, Satoaki, Ju-Gyeong Kang, Willmar D. Patino, Andrew Wragg, Manfred Boehm, Oksana Gavrilova, Paula J. Hurley, Fred Bunz, et Paul M. Hwang. 2006. « P53 Regulates Mitochondrial Respiration ». *Science (New York, N.Y.)* 312 (5780): 1650-53. <https://doi.org/10.1126/science.1126863>.
- Mejia, Edgard M., et Grant M. Hatch. 2016. « Mitochondrial Phospholipids: Role in Mitochondrial Function ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 48 (2): 99-112. <https://doi.org/10.1007/s10863-015-9601-4>.
- Mittal, Khush R., Fan Chen, Jian J. Wei, Kiran Rijhvani, Rohini Kurvathi, Deanna Streck, James Dermody, et Gokce A. Toruner. 2009. « Molecular and Immunohistochemical Evidence for the Origin of Uterine Leiomyosarcomas from Associated Leiomyoma and Symplastic Leiomyoma-like Areas ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 22 (10): 1303-11. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.96>.
- Miyamoto, Takafumi, Noriaki Kitamura, Masaya Ono, Yasuyuki Nakamura, Masaki Yoshida, Hiroki Kamino, Ryuya Murai, Tesshi Yamada, et Hirofumi Arakawa. 2012. « Identification of 14-3-3γ as a MIEAP-Interacting Protein and Its Role in Mitochondrial Quality Control ». *Scientific Reports* 2: 379. <https://doi.org/10.1038/srep00379>.
- Moldoveanu, Tudor, Arielle Viacava Follis, Richard W. Kriwacki, et Douglas R. Green. 2014. « Many Players in BCL-2 Family Affairs ». *Trends in Biochemical Sciences* 39 (3): 101-11. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.006>.
- Moreno-Sánchez, Rafael, Alvaro Marín-Hernández, Emma Saavedra, Juan P. Pardo, Stephen J. Ralph, et Sara Rodríguez-Enríquez. 2014. « Who Controls the ATP Supply in Cancer Cells? Biochemistry Lessons to Understand Cancer Energy Metabolism ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 50 (mai): 10-23. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.01.025>.
- Moreno-Sánchez, Rafael, Sara Rodríguez-Enríquez, Alvaro Marín-Hernández, et Emma Saavedra. 2007. « Energy Metabolism in Tumor Cells ». *The FEBS Journal* 274 (6): 1393-1418. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x>.
- Morin, Ryan D., Nathalie A. Johnson, Tesa M. Severson, Andrew J. Mungall, Jianghong An, Rodrigo Goya, Jessica E. Paul, et al. 2010. « Somatic Mutations Altering EZH2 (Tyr641) in Follicular and Diffuse Large B-Cell Lymphomas of Germinal-Center Origin ». *Nature Genetics* 42 (2): 181-85. <https://doi.org/10.1038/ng.518>.
- Mott, Justin L., et Ashley M. Mohr. 2015. « Overview of MicroRNA Biology ». *Seminars in liver disease* 35 (1): 3-11. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1397344>.
- Mouche, Audrey, Jérôme Archambeau, Charles Ricordel, Laura Chaillot, Nicolas Bigot, Thierry Guillaudeux, Muriel Grenon, et Rémy Pedeux. 2019. « ING3 Is Required for ATM Signaling and DNA Repair in Response to DNA Double Strand Breaks ». *Cell Death and Differentiation* 26 (11): 2344-57. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0305-x>.
- Nabbi, Arash, Amal Almami, Satbir Thakur, Keiko Suzuki, Donna Boland, Tarek A. Bismar, et Karl Riabowol. 2015. « ING3 Protein Expression Profiling in Normal Human Tissues Suggest Its Role in Cellular Growth and Self-Renewal ». *European Journal of Cell Biology* 94 (5): 214-22. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.03.002>.
- Nabbi, Arash, Urszula L. McClurg, Subhash Thalappilly, Amal Almami, Mahsa Mobahat, Tarek A. Bismar, Olivier Binda, et Karl T. Riabowol. 2017. « ING3 Promotes Prostate Cancer Growth by Activating the Androgen Receptor ». *BMC Medicine* 15 (1): 103. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0854-0>.
- Nagashima, M., M. Shiseki, K. Miura, K. Hagiwara, S. P. Linke, R. Pedeux, X. W. Wang, J. Yokota, K. Riabowol, et C. C. Harris. 2001. « DNA Damage-Inducible Gene P33ING2 Negatively Regulates Cell Proliferation through Acetylation of P53 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17): 9671-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.161151798>.

- Nagashima, Makoto, Masayuki Shiseki, Remy M. Pedoux, Shu Okamura, Mariko Kitahama-Shiseki, Koh Miura, Jun Yokota, et Curtis C. Harris. 2003. « A Novel PHD-Finger Motif Protein, P47ING3, Modulates P53-Mediated Transcription, Cell Cycle Control, and Apoptosis ». *Oncogene* 22 (3): 343-50. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206115>.
- Negrini, Simona, Vassilis G. Gorgoulis, et Thanos D. Halazonetis. 2010. « Genomic Instability — an Evolving Hallmark of Cancer ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (3): 220-28. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>.
- Nicholls, David G. 2005. « Mitochondria and Calcium Signaling ». *Cell Calcium* 38 (3-4): 311-17. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.011>.
- Nie, Jing, Lin Liu, Min Wu, Guichun Xing, Shan He, Yuxin Yin, Chunyan Tian, Fuchu He, et Lingqiang Zhang. 2010. « HECT Ubiquitin Ligase Smurf1 Targets the Tumor Suppressor ING2 for Ubiquitination and Degradation ». *FEBS Letters* 584 (14): 3005-12. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.033>.
- Nourani, A., Y. Doyon, R. T. Utley, S. Allard, W. S. Lane, et J. Côté. 2001. « Role of an ING1 Growth Regulator in Transcriptional Activation and Targeted Histone Acetylation by the NuA4 Complex ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (22): 7629-40. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.22.7629-7640.2001>.
- Obri, Arnaud, Khalid Ouararhni, Christophe Papin, Marie-Laure Diebold, Kiran Padmanabhan, Martin Marek, Isabelle Stoll, et al. 2014. « ANP32E Is a Histone Chaperone That Removes H2A.Z from Chromatin ». *Nature* 505 (7485): 648-53. <https://doi.org/10.1038/nature12922>.
- Olichon, A., G. Elachouri, L. Baricault, C. Delettre, P. Belenguer, et G. Lenaers. 2007. « OPA1 Alternate Splicing Uncouples an Evolutionary Conserved Function in Mitochondrial Fusion from a Vertebrate Restricted Function in Apoptosis ». *Cell Death and Differentiation* 14 (4): 682-92. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402048>.
- Olsen, Jesper V., Michiel Vermeulen, Anna Santamaria, Chanchal Kumar, Martin L. Miller, Lars J. Jensen, Florian Gnad, et al. 2010. « Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy during Mitosis ». *Science Signaling* 3 (104): ra3. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000475>.
- Oren, Moshe, et Varda Rotter. 2010. « Mutant P53 Gain-of-Function in Cancer ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (2): a001107. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001107>.
- Pakendorf, Brigitte, et Mark Stoneking. 2005. « Mitochondrial Dna and Human Evolution ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 6 (1): 165-83. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162249>.
- Palade, G. E. 1953. « An Electron Microscope Study of the Mitochondrial Structure ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 1 (4): 188-211. <https://doi.org/10.1177/1.4.188>.
- Pan, Y. Q., X. Zhang, D. P. Xu, W. G. Bao, A. F. Lin, H. H. Xu, et W. H. Yan. 2014. « Decreased Expression of ING2 Gene and Its Clinicopathological Significance in Chinese NSCLC Patients ». *Neoplasma* 61 (4): 468-75. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2014\\_058](https://doi.org/10.4149/neo_2014_058).
- Papa, Sergio, Pietro Luca Martino, Giuseppe Capitanio, Antonio Gaballo, Domenico De Rasmio, Anna Signorile, et Vittoria Petruzzella. 2012. « The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria ». In *Advances in Mitochondrial Medicine*, édité par Roberto Scatena, Patrizia Bottoni, et Bruno Giardina, 3-37. Advances in Experimental Medicine and Biology. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_1).
- Park, Ji-Hoon, Jie Zhuang, Jie Li, et Paul M. Hwang. 2016. « P53 as Guardian of the Mitochondrial Genome ». *FEBS Letters* 590 (7): 924-34. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12061>.
- Park, Joon-Young, Ping-Yuan Wang, Takumi Matsumoto, Ho Joong Sung, Wenzhe Ma, Jeong W. Choi, Stasia A. Anderson, et al. 2009. « P53 Improves Aerobic Exercise Capacity and Augments Skeletal Muscle Mitochondrial DNA Content ». *Circulation Research* 105 (7): 705-12, 11 p following 712. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.205310>.
- Park, Kyoung-Mi, Jian-Peng Teoh, Yongchao Wang, Zuzana Broskova, Ahmed S. Bayoumi, Yaoliang Tang, Huabo Su, Neal L. Weintraub, et Il-Man Kim. 2016. « Carvedilol-Responsive MicroRNAs, MiR-199a-3p and -214 Protect Cardiomyocytes from Simulated Ischemia-Reperfusion Injury ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 311 (2): H371-383. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00807.2015>.
- Pavlidis, Stephanos, Diana Whitaker-Menezes, Remedios Castello-Cros, Neal Flomenberg, Agnieszka K. Witkiewicz, Philippe G. Frank, Mathew C. Casimiro, et al. 2009. « The Reverse Warburg Effect: Aerobic Glycolysis in Cancer Associated



- Fibroblasts and the Tumor Stroma ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (23): 3984-4001. <https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10238>.
- Pedeux, Remy, Sagar Sengupta, Jiang Cheng Shen, Oleg N Demidov, Shin'ichi Saito, Hitoshi Onogi, Kensuke Kumamoto, et al. 2005. « ING2 Regulates the Onset of Replicative Senescence by Induction of P300-Dependent P53 Acetylation ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (15): 6639-48. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.15.6639-6648.2005>.
- Peña, Pedro V, Foteini Davrazou, Xiaobing Shi, Kay L Walter, Vladislav V Verkhusha, Or Gozani, Rui Zhao, et Tatiana G Kutateladze. 2006. « Molecular Mechanism of Histone H3K4me3 Recognition by Plant Homeodomain of ING2 ». *Nature* 442 (7098): 100-103. <https://doi.org/10.1038/nature04814>.
- Pereira-Nunes, Andreia, Julieta Afonso, Sara Granja, et Fátima Baltazar. 2020. « Lactate and Lactate Transporters as Key Players in the Maintenance of the Warburg Effect ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1219: 51-74. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-34025-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-34025-4_3).
- Pfeiffer, T., S. Schuster, et S. Bonhoeffer. 2001. « Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways ». *Science (New York, N.Y.)* 292 (5516): 504-7. <https://doi.org/10.1126/science.1058079>.
- Pfister, Sophia X., Enni Markkanen, Yanyan Jiang, Sovan Sarkar, Mick Woodcock, Giulia Orlando, Ioanna Mavrommati, et al. 2015. « Inhibiting WEE1 Selectively Kills Histone H3K36me3-Deficient Cancers by DNTP Starvation ». *Cancer Cell* 28 (5): 557-68. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.015>.
- Pietrzak, Maciej, et Monika Puzianowska-Kuznicka. 2008. « P53-Dependent Repression of the Human MCL-1 Gene Encoding an Anti-Apoptotic Member of the BCL-2 Family: The Role of Sp1 and of Basic Transcription Factor Binding Sites in the MCL-1 Promoter ». *Biological Chemistry* 389 (4): 383-93. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.039>.
- Pleasance, Erin D., Philip J. Stephens, Sarah O'Meara, David J. McBride, Alison Meynert, David Jones, Meng-Lay Lin, et al. 2010. « A Small-Cell Lung Cancer Genome with Complex Signatures of Tobacco Exposure ». *Nature* 463 (7278): 184-90. <https://doi.org/10.1038/nature08629>.
- Pospisilik, J. Andrew, Claude Knauf, Nicholas Joza, Paule Benit, Michael Orthofer, Patrice D. Cani, Ingo Ebersberger, et al. 2007. « Targeted Deletion of AIF Decreases Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Protects from Obesity and Diabetes ». *Cell* 131 (3): 476-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.047>.
- Prakash, Aishwarya, et Sylvie Doublé. 2015. « Base Excision Repair in the Mitochondria ». *Journal of Cellular Biochemistry* 116 (8): 1490-99. <https://doi.org/10.1002/jcb.25103>.
- Pursell, Zachary F., J. Tyson McDonald, Christopher K. Mathews, et Thomas A. Kunkel. 2008. « Trace Amounts of 8-Oxo-DGTP in Mitochondrial DNTP Pools Reduce DNA Polymerase Gamma Replication Fidelity ». *Nucleic Acids Research* 36 (7): 2174-81. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn062>.
- Raho, G., C. Miranda, E. Tamborini, M. A. Pierotti, et A. Greco. 2007. « Detection of Novel mRNA Splice Variants of Human ING4 Tumor Suppressor Gene ». *Oncogene* 26 (36): 5247-57. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210335>.
- Ramachandran, Aparna, Urmimala Basu, Shemaila Sultana, Divya Nandakumar, et Smita S. Patel. 2017. « Human Mitochondrial Transcription Factors TFAM and TFB2M Work Synergistically in Promoter Melting during Transcription Initiation ». *Nucleic Acids Research* 45 (2): 861-74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1157>.
- Rao, Mahadev, Nachimuthu Chinnasamy, Julie A. Hong, Yuwei Zhang, Mary Zhang, Sichuan Xi, Fang Liu, Victor E. Marquez, Richard A. Morgan, et David S. Schrupp. 2011. « Inhibition of Histone Lysine Methylation Enhances Cancer-Testis Antigen Expression in Lung Cancer Cells: Implications for Adoptive Immunotherapy of Cancer ». *Cancer Research* 71 (12): 4192-4204. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2442>.
- Reinstein, Eyal, et Aaron Ciechanover. 2006. « Narrative Review: Protein Degradation and Human Diseases: The Ubiquitin Connection ». *Annals of Internal Medicine*, novembre. <https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/0003-4819-145-9-200611070-00010>.
- Rice, Judd C, et C. David Allis. 2001. « Histone Methylation versus Histone Acetylation: New Insights into Epigenetic Regulation ». *Current Opinion in Cell Biology* 13 (3): 263-73. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00208-8](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00208-8).

- Robbins, J., S. M. Dilworth, R. A. Laskey, et C. Dingwall. 1991. « Two Interdependent Basic Domains in Nucleoplasmin Nuclear Targeting Sequence: Identification of a Class of Bipartite Nuclear Targeting Sequence ». *Cell* 64 (3): 615-23. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90245-t](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90245-t).
- Robertson, Keith D. 2005. « DNA Methylation and Human Disease ». *Nature Reviews Genetics* 6 (8): 597-610. <https://doi.org/10.1038/nrg1655>.
- Rofstad, Einar K., Berit Mathiesen, Kristil Kindem, et Kanthi Galappathi. 2006. « Acidic Extracellular PH Promotes Experimental Metastasis of Human Melanoma Cells in Athymic Nude Mice ». *Cancer Research* 66 (13): 6699-6707. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0983>.
- Romero-Garcia, Susana, María Maximina B. Moreno-Altamirano, Heriberto Prado-Garcia, et Francisco Javier Sánchez-García. 2016. « Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance ». *Frontiers in Immunology* 7: 52. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00052>.
- Rous, P. 1973. « Transmission of a Malignant New Growth by Means of a Cell-Free Filtrate ». *Connecticut Medicine* 37 (10): 526.
- Sage, Jay M, Otto S Gildemeister, et Kendall L Knight. 2010. « Discovery of a Novel Function for Human Rad51: Maintenance of the Mitochondrial Genome ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (25): 18984-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.099846>.
- Saito, A., T. Furukawa, S. Fukushige, S. Koyama, M. Hoshi, Y. Hayashi, et A. Horii. 2000. « P24/ING1-ALT1 and P47/ING1-ALT2, Distinct Alternative Transcripts of P33/ING1 ». *Journal of Human Genetics* 45 (3): 177-81. <https://doi.org/10.1007/s100380050206>.
- Saito, Motonobu, Kensuke Kumamoto, Ana I Robles, Izumi Horikawa, Bungo Furusato, Shu Okamura, Akiteru Goto, et al. 2010. « Targeted Disruption of Ing2 Results in Defective Spermatogenesis and Development of Soft-Tissue Sarcomas ». *PLoS One* 5 (11): e15541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015541>.
- Sanchez, Roberto, et Ming-Ming Zhou. 2011. « The PHD Finger: A Versatile Epigenome Reader ». *Trends in Biochemical Sciences* 36 (7): 364-72. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.005>.
- San-Millán, Iñigo, et George A. Brooks. 2017. « Reexamining Cancer Metabolism: Lactate Production for Carcinogenesis Could Be the Purpose and Explanation of the Warburg Effect ». *Carcinogenesis* 38 (2): 119-33. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw127>.
- Sarker, Krishna P., Hiromi Kataoka, Angela Chan, Stuart J. Netherton, Isabelle Pot, Mai Anh Huynh, Xiaolan Feng, Azad Bonni, Karl Riabowol, et Shirin Bonni. 2008. « ING2 as a Novel Mediator of Transforming Growth Factor-Beta-Dependent Responses in Epithelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (19): 13269-79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708834200>.
- Satpathy, Shankha, Claire Guérillon, Tae-Sun Kim, Nicolas Bigot, Satbir Thakur, Shirin Bonni, Karl Riabowol, et Rémy Pedeux. 2014. « SUMOylation of the ING1b Tumor Suppressor Regulates Gene Transcription ». *Carcinogenesis* 35 (10): 2214-23. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu126>.
- Satpathy, Shankha, Arash Nabbi, et Karl Riabowol. 2013. « RegulatING Chromatin Regulators: Post-Translational Modification of the ING Family of Epigenetic Regulators ». *The Biochemical Journal* 450 (3): 433-42. <https://doi.org/10.1042/BJ20121632>.
- Scarpulla, Richard C. 2011. « Metabolic Control of Mitochondrial Biogenesis through the PGC-1 Family Regulatory Network ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1813 (7): 1269-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.019>.
- Schieber, Michael, et Navdeep S. Chandel. 2014. « ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress ». *Current Biology* 24 (10): R453-62. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.
- Schmidt, Lars Henning, Tilmann Spieker, Steffen Koschmieder, Julia Humberg, Dominik Jungen, Etmar Bulk, Antje Hascher, et al. 2011. « The Long Noncoding MALAT-1 RNA Indicates a Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer and Induces Migration and Tumor Growth ». *Journal of Thoracic Oncology* 6 (12): 1984-92. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182307eac>.

- Schmidt, Oliver, Nikolaus Pfanner, et Chris Meisinger. 2010. « Mitochondrial Protein Import: From Proteomics to Functional Mechanisms ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (9): 655-67. <https://doi.org/10.1038/nrm2959>.
- Schneider, Günter, Marc Schmidt-Supprian, Roland Rad, et Dieter Saur. 2017. « Tissue-specific tumorigenesis – Context matters ». *Nature reviews. Cancer* 17 (4): 239-53. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.5>.
- Schuster-Böckler, Benjamin, et Ben Lehner. 2012. « Chromatin Organization Is a Major Influence on Regional Mutation Rates in Human Cancer Cells ». *Nature* 488 (7412): 504-7. <https://doi.org/10.1038/nature11273>.
- Schwartzenberg-Bar-Yoseph, Fabiana, Michal Armoni, et Eddy Karnieli. 2004. « The Tumor Suppressor P53 Down-Regulates Glucose Transporters GLUT1 and GLUT4 Gene Expression ». *Cancer Research* 64 (7): 2627-33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-0846>.
- Scott, M., F. M. Boisvert, D. Vieyra, R. N. Johnston, D. P. Bazett-Jones, et K. Riabowol. 2001. « UV Induces Nucleolar Translocation of ING1 through Two Distinct Nucleolar Targeting Sequences ». *Nucleic Acids Research* 29 (10): 2052-58. <https://doi.org/10.1093/nar/29.10.2052>.
- Scott, M., P. Bonnefin, D. Vieyra, F. M. Boisvert, D. Young, D. P. Bazett-Jones, et K. Riabowol. 2001. « UV-Induced Binding of ING1 to PCNA Regulates the Induction of Apoptosis ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 19): 3455-62.
- Semenza, Gregg L. 2008. « Tumor Metabolism: Cancer Cells Give and Take Lactate ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (12): 3835-37. <https://doi.org/10.1172/JCI37373>.
- Sena, Laura A., et Navdeep S. Chandel. 2012. « Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species ». *Molecular Cell* 48 (2): 158-67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>.
- Seyfried, Thomas N., Roberto E. Flores, Angela M. Poff, et Dominic P. D'Agostino. 2014. « Cancer as a Metabolic Disease: Implications for Novel Therapeutics ». *Carcinogenesis* 35 (3): 515-27. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt480>.
- Shen, Hui, et Peter W. Laird. 2013. « Interplay between the Cancer Genome and Epigenome ». *Cell* 153 (1): 38-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.008>.
- Shi, Xiaobing, Tao Hong, Kay L. Walter, Mark Ewalt, Eriko Michishita, Tiffany Hung, Dylan Carney, et al. 2006. « ING2 PHD Domain Links Histone H3 Lysine 4 Methylation to Active Gene Repression ». *Nature* 442 (7098): 96-99. <https://doi.org/10.1038/nature04835>.
- Shi, Xiaobing, Ioulia Kachirskaia, Kay L. Walter, Jen-Hao A. Kuo, Aimee Lake, Foteini Davrazou, Steve M. Chan, et al. 2007. « Proteome-Wide Analysis in *Saccharomyces Cerevisiae* Identifies Several PHD Fingers as Novel Direct and Selective Binding Modules of Histone H3 Methylated at Either Lysine 4 or Lysine 36 ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (4): 2450-55. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600286200>.
- Shiao, Y. H., J. H. Resau, K. Nagashima, L. M. Anderson, et G. Ramakrishna. 2000. « The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Targets to Mitochondria ». *Cancer Research* 60 (11): 2816-19.
- Shimada, Y., A. Saito, M. Suzuki, E. Takahashi, et M. Horie. 1998. « Cloning of a Novel Gene (ING1L) Homologous to ING1, a Candidate Tumor Suppressor ». *Cytogenetics and Cell Genetics* 83 (3-4): 232-35. <https://doi.org/10.1159/000015188>.
- Shimizu, K., M. Goldfarb, Y. Suard, M. Perucho, Y. Li, T. Kamata, J. Feramisco, E. Stavnezer, J. Fogh, et M. H. Wigler. 1983. « Three Human Transforming Genes Are Related to the Viral Ras Oncogenes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (8): 2112-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.8.2112>.
- Shiseki, Masayuki, Makoto Nagashima, Remy M. Pedoux, Mariko Kitahama-Shiseki, Koh Miura, Shu Okamura, Hitoshi Onogi, et al. 2003. « P29ING4 and P28ING5 Bind to P53 and P300, and Enhance P53 Activity ». *Cancer Research* 63 (10): 2373-78.
- Sironi, Elena, Amilcare Cerri, Dario Tomasini, Silvia Maria Sirchia, Giovanni Porta, Franca Rossella, Francesca Romana Grati, et Giuseppe Simoni. 2004. « Loss of Heterozygosity on Chromosome 4q32-35 in Sporadic Basal Cell Carcinomas: Evidence for the Involvement of P33ING2/ING1L and SAP30 Genes ». *Journal of Cutaneous Pathology* 31 (4): 318-22.
- Sjöblom, Tobias, Siân Jones, Laura D. Wood, D. Williams Parsons, Jimmy Lin, Thomas D. Barber, Diana Mandelker, et al. 2006. « The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers ». *Science (New York, N.Y.)* 314 (5797): 268-74. <https://doi.org/10.1126/science.1133427>.

- Skowrya, D., M. Zeremski, N. Neznanov, M. Li, Y. Choi, M. Uesugi, C. A. Hauser, W. Gu, A. V. Gudkov, et J. Qin. 2001. « Differential Association of Products of Alternative Transcripts of the Candidate Tumor Suppressor ING1 with the MSin3/HDAC1 Transcriptional Corepressor Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (12): 8734-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007664200>.
- Smirnova, E., L. Griparic, D. L. Shurland, et A. M. van der Bliek. 2001. « Dynamin-Related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 12 (8): 2245-56. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245>.
- Smith, Karen T., Skylar A. Martin-Brown, Laurence Florens, Michael P. Washburn, et Jerry L. Workman. 2010. « Deacetylase Inhibitors Dissociate the Histone-Targeting ING2 Subunit from the Sin3 Complex ». *Chemistry & Biology* 17 (1): 65-74. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.12.010>.
- Soussi, T., et K. G. Wiman. 2015. « TP53: An Oncogene in Disguise ». *Cell Death and Differentiation* 22 (8): 1239-49. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.53>.
- Souza-Pinto, Nadja C de, Curtis C Harris, et Vilhelm A Bohr. 2004. « P53 Functions in the Incorporation Step in DNA Base Excision Repair in Mouse Liver Mitochondria ». *Oncogene* 23 (39): 6559-68. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207874>.
- Stehelin, D., R. V. Guntaka, H. E. Varmus, et J. M. Bishop. 1976. « Purification of DNA Complementary to Nucleotide Sequences Required for Neoplastic Transformation of Fibroblasts by Avian Sarcoma Viruses ». *Journal of Molecular Biology* 101 (3): 349-65. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90152-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90152-2).
- Stein, Alexis, Lidza Kalifa, et Elaine A. Sia. 2015. « Members of the RAD52 Epistasis Group Contribute to Mitochondrial Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *PLoS Genetics* 11 (11): e1005664. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005664>.
- Stein, Alexis, et Elaine A. Sia. 2017. « Mitochondrial DNA Repair and Damage Tolerance ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 22 (janvier): 920-43. <https://doi.org/10.2741/4525>.
- Steinmetz, Lars M., Curt Scharfe, Adam M. Deutschbauer, Dejana Mokranjac, Zelek S. Herman, Ted Jones, Angela M. Chu, et al. 2002. « Systematic Screen for Human Disease Genes in Yeast ». *Nature Genetics* 31 (4): 400-404. <https://doi.org/10.1038/ng929>.
- Sugars, K. L., V. Budhram-Mahadeo, G. Packham, et D. S. Latchman. 2001. « A Minimal Bcl-x Promoter Is Activated by Brn-3a and Repressed by P53 ». *Nucleic Acids Research* 29 (22): 4530-40. <https://doi.org/10.1093/nar/29.22.4530>.
- Sun, Guoming, Shunqian Jin, et R. Baskaran. 2009. « MMR/c-Abl-Dependent Activation of ING2/P73alpha Signaling Regulates the Cell Death Response to N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine ». *Experimental Cell Research* 315 (18): 3163-75. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.09.010>.
- Suzuki, Shinnosuke, Yusuke Nozawa, Satoshi Tsukamoto, Takehito Kaneko, Hiroshi Imai, et Naojiro Minami. 2013. « ING3 Is Essential for Asymmetric Cell Division during Mouse Oocyte Maturation ». *PLoS One* 8 (9): e74749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074749>.
- Tadi, Satish Kumar, Robin Sebastian, Sumedha Dahal, Ravi K. Babu, Bibha Choudhary, et Sathees C. Raghavan. 2016. « Microhomology-Mediated End Joining Is the Principal Mediator of Double-Strand Break Repair during Mitochondrial DNA Lesions ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (2): 223-35. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0260>.
- Takeda, Hironori, Akihisa Tsutsumi, Tomohiro Nishizawa, Caroline Lindau, Jon V. Busto, Lena-Sophie Wenz, Lars Ellenrieder, et al. 2021. « Mitochondrial Sorting and Assembly Machinery Operates by  $\beta$ -Barrel Switching ». *Nature* 590 (7844): 163-69. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03113-7>.
- Tan, An S., James W. Baty, Lan-Feng Dong, Ayenachew Bezawork-Geleta, Berwini Endaya, Jacob Goodwin, Martina Bajzikova, et al. 2015. « Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells without Mitochondrial DNA ». *Cell Metabolism* 21 (1): 81-94. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.003>.
- Tanaka, Noriaki, Ameeta A. Patel, Lin Tang, Natalie L. Silver, Antje Lindemann, Hideaki Takahashi, Roman Jaksik, et al. 2017. « Replication Stress Leading to Apoptosis within the S-Phase Contributes to Synergism between Vorinostat and AZD1775 in HNSCC Harboring High-Risk TP53 Mutation ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 23 (21): 6541-54. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0947>.

- Tao, Xuan-Chen, Xin-Yu Zhang, Shi-Bo Sun, et De-Quan Wu. 2019. « MiR-92a Contributes to Cell Proliferation, Apoptosis and Doxorubicin Chemoresensitivity in Gastric Carcinoma Cells ». *Oncology Reports* 42 (1): 313-20. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7168>.
- Temel, Metin, Arif Turkmen, Recep Dokuyucu, Cengiz Cevik, Serdar Oztuzcu, Beyhan Cengiz, et Mehmet Mutaf. 2015. « A Novel Tumor Suppressor Gene in Basal Cell Carcinoma: Inhibition of Growth Factor-2 ». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36 (6): 4611-16. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3108-9>.
- Terziyska, Nadia, Thomas Lutz, Christian Kozany, Dejana Mokranjac, Nikola Mesecke, Walter Neupert, Johannes M. Herrmann, et Kai Hell. 2005. « Mia40, a Novel Factor for Protein Import into the Intermembrane Space of Mitochondria Is Able to Bind Metal Ions ». *FEBS Letters* 579 (1): 179-84. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.072>.
- Thorslund, Tina, Morten Sunesen, Vilhelm A. Bohr, et Tinna Stevnsner. 2002. « Repair of 8-OxoG Is Slower in Endogenous Nuclear Genes than in Mitochondrial DNA and Is without Strand Bias ». *DNA Repair* 1 (4): 261-73. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(02\)00003-4](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(02)00003-4).
- Thyagarajan, B., R. A. Padua, et C. Campbell. 1996. « Mammalian Mitochondria Possess Homologous DNA Recombination Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (44): 27536-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27536>.
- Unoki, Motoko, Kensuke Kumamoto, Ana I Robles, Jiang Cheng Shen, Zhi-Ming Zheng, et Curtis C Harris. 2008. « A Novel ING2 Isoform, ING2b, Synergizes with ING2a to Prevent Cell Cycle Arrest and Apoptosis ». *FEBS Letters* 582 (28): 3868-74. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.10.024>.
- Unoki, Motoko, Jiang Cheng Shen, Zhi-Ming Zheng, et Curtis C. Harris. 2006. « Novel Splice Variants of ING4 and Their Possible Roles in the Regulation of Cell Growth and Motility ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (45): 34677-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606296200>.
- Vahsen, Nicola, Céline Candé, Jean-Jacques Brière, Paule Bénit, Nicholas Joza, Nathanael Larochette, Pier Giorgio Mastroberardino, et al. 2004. « AIF Deficiency Compromises Oxidative Phosphorylation ». *The EMBO Journal* 23 (23): 4679-89. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600461>.
- Vander Heiden, Matthew G., Lewis C. Cantley, et Craig B. Thompson. 2009. « Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation ». *Science (New York, N.Y.)* 324 (5930): 1029-33. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
- Végran, Frédérique, Romain Boidot, Carine Michiels, Pierre Sonveaux, et Olivier Feron. 2011. « Lactate Influx through the Endothelial Cell Monocarboxylate Transporter MCT1 Supports an NF-KB/IL-8 Pathway That Drives Tumor Angiogenesis ». *Cancer Research* 71 (7): 2550-60. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2828>.
- Velculescu, V E, et W S El-Deiry. 1996. « Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene ». *Clinical Chemistry* 42 (6): 858-68. <https://doi.org/10.1093/clinchem/42.6.858>.
- Ventura, Andrea, Amanda G. Young, Monte M. Winslow, Laura Lintault, Alex Meissner, Stefan J. Erkeland, Jamie Newman, et al. 2008. « Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the MiR-17 through 92 Family of MiRNA Clusters ». *Cell* 132 (5): 875-86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.019>.
- Wang, Huan-Qiang, Cong-Ying Yang, Si-Yuan Wang, Tian Wang, Jing-Ling Han, Kai Wei, Fu-Cun Liu, Ji-da Xu, Xian-Zhen Peng, et Jian-Ming Wang. 2018. « Cell-Free Plasma Hypermethylated CASZ1, CDH13 and ING2 Are Promising Biomarkers of Esophageal Cancer ». *Journal of Biomedical Research* 32 (5): 424-33. <https://doi.org/10.7555/JBR.32.20170065>.
- Wang, Jing, Mei Yieng Chin, et Gang Li. 2006. « The Novel Tumor Suppressor P33ING2 Enhances Nucleotide Excision Repair via Inducement of Histone H4 Acetylation and Chromatin Relaxation ». *Cancer Research* 66 (4): 1906-11. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3444>.
- Wang, Jue, Weicong Huang, Yihe Wu, Jianfeng Hou, Yu Nie, Haiyong Gu, Jun Li, Shengshou Hu, et Hao Zhang. 2012. « MicroRNA-193 pro-Proliferation Effects for Bone Mesenchymal Stem Cells after Low-Level Laser Irradiation Treatment through Inhibitor of Growth Family, Member 5 ». *Stem Cells and Development* 21 (13): 2508-19. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0695>.
- Wang, Yemin, et Gang Li. 2006. « ING3 Promotes UV-Induced Apoptosis via Fas/Caspase-8 Pathway in Melanoma Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (17): 11887-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511309200>.

- Wang, Yemin, Jing Wang, et Gang Li. 2006. « Leucine Zipper-like Domain Is Required for Tumor Suppressor ING2-Mediated Nucleotide Excision Repair and Apoptosis ». *FEBS Letters* 580 (16): 3787-93. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.065>.
- Warburg, O. 1956. « On the Origin of Cancer Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 123 (3191): 309-14. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
- Warburg, Otto. 1924. « Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle ». *Naturwissenschaften* 12 (50): 1131-37. <https://doi.org/10.1007/BF01504608>.
- Webb, Chaille T., Michael A. Gorman, Michael Lazarou, Michael T. Ryan, et Jacqueline M. Gulbis. 2006. « Crystal Structure of the Mitochondrial Chaperone TIM9.10 Reveals a Six-Bladed Alpha-Propeller ». *Molecular Cell* 21 (1): 123-33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.010>.
- White, Eileen, Janice M. Mehnert, et Chang S. Chan. 2015. « Autophagy, Metabolism, and Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (22): 5037-46. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0490>.
- Wisnovsky, Simon, Sae Rin Jean, et Shana O. Kelley. 2016. « Mitochondrial DNA Repair and Replication Proteins Revealed by Targeted Chemical Probes ». *Nature Chemical Biology* 12 (7): 567-73. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2102>.
- Wolff, Sonja, Susan Erster, Gustavo Palacios, et Ute M. Moll. 2008. « P53's Mitochondrial Translocation and MOMP Action Is Independent of Puma and Bax and Severely Disrupts Mitochondrial Membrane Integrity ». *Cell Research* 18 (7): 733-44. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.62>.
- Wong, Tuck Seng, Sridharan Rajagopalan, Stefan M. Freund, Trevor J. Rutherford, Antonina Andreeva, Fiona M. Townsley, Miriana Petrovich, et Alan R. Fersht. 2009. « Biophysical Characterizations of Human Mitochondrial Transcription Factor A and Its Binding to Tumor Suppressor P53 ». *Nucleic Acids Research* 37 (20): 6765-83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp750>.
- Xiaoli, Zhang, Wu Jiyong, et Luan Yepeng. 2017. « Tip60: Main Functions and Its Inhibitors ». *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 17 (8): 675-82.
- Xie, Xuhua, Xiaopei Xu, Changyu Sun, et Zujiang Yu. 2018. « Hepatitis B Virus X Protein Promotes Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells by Upregulating MiR-181b by Targeting ING5 ». *Biological Chemistry* 399 (6): 611-19. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0178>.
- Xin, He, Chuazhuo Wang, Yuan Chi, et Zhaoyu Liu. 2020. « MicroRNA-196b-5p Promotes Malignant Progression of Colorectal Cancer by Targeting ING5 ». *Cancer Cell International* 20: 119. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01200-3>.
- Yakovlev, Alexander G., Simone Di Giovanni, Geping Wang, Wenfan Liu, Bogdan Stoica, et Alan I. Faden. 2004. « BOK and NOXA Are Essential Mediators of P53-Dependent Apoptosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (27): 28367-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313526200>.
- Yan, An, Chunyu Yang, Zhibo Chen, Chunhong Li, et Li Cai. 2015. « MiR-761 Promotes Progression and Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting ING4 and TIMP2 ». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 37 (1): 55-66. <https://doi.org/10.1159/000430333>.
- Yang, D., Y. Oyaizu, H. Oyaizu, G. J. Olsen, et C. R. Woese. 1985. « Mitochondrial Origins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (13): 4443-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.13.4443>.
- Yang, Hai-Yan, Hao-Ling Liu, Lan-Tian Tian, Rui-Peng Song, Xuan Song, Da-Long Yin, Ying-Jian Liang, et al. 2012. « Expression and Prognostic Value of ING3 in Human Primary Hepatocellular Carcinoma ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 237 (4): 352-61. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011346>.
- Ye, Pei, Xueping Ke, Xuehui Zang, Hui Sun, Zhixing Dong, Jun Lin, Lihui Wang, et al. 2018. « Up-Regulated MiR-27-3p Promotes the G1-S Phase Transition by Targeting Inhibitor of Growth Family Member 5 in Osteosarcoma ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 101 (mai): 219-27. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.066>.
- Yeh, Edward T. H. 2009. « SUMOylation and De-SUMOylation: Wrestling with Life's Processes \* ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (13): 8223-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800050200>.

- Yoshida, Yoichiro, Hiroto Izumi, Takayuki Torigoe, Hiroshi Ishiguchi, Hideaki Itoh, Dongchon Kang, et Kimitoshi Kohno. 2003. « P53 Physically Interacts with Mitochondrial Transcription Factor A and Differentially Regulates Binding to Damaged DNA ». *Cancer Research* 63 (13): 3729-34.
- Ythier, D., D. Larrieu, R. Binet, O. Binda, C. Brambilla, S. Gazzeri, et R. Pedeux. 2010. « Sumoylation of ING2 Regulates the Transcription Mediated by Sin3A ». *Oncogene* 29 (44): 5946-56. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.325>.
- Ythier, Damien, Elisabeth Brambilla, Romuald Binet, Damien Nissou, Aurélien Vesin, Florence de Fraipont, Denis Moro-Sibilot, et al. 2010. « Expression of Candidate Tumor Suppressor Gene ING2 Is Lost in Non-Small Cell Lung Carcinoma ». *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 69 (2): 180-86. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.11.006>.
- Yu, Lisa, Satbir Thakur, Rebecca Yy Leong-Quong, Keiko Suzuki, Andy Pang, Jeffrey D. Bjorge, Karl Riabowol, et Donald J. Fujita. 2013. « Src Regulates the Activity of the ING1 Tumor Suppressor ». *PLoS One* 8 (4): e60943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060943>.
- Zhang, Bin, Ting Lin, et Hong He. 2015. « Comparative Analysis of Blood and Saliva Expression Profiles in Chronic and Refractory Periodontitis Patients ». *BMC Oral Health* 15 (décembre): 166. <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0150-3>.
- Zhang, Huakun, Haiqing Ma, Qijing Wang, Minshan Chen, Desheng Weng, Hui Wang, Jun Zhou, et al. 2010. « Analysis of Loss of Heterozygosity on Chromosome 4q in Hepatocellular Carcinoma Using High-Throughput SNP Array ». *Oncology Reports* 23 (2): 445-55.
- Zhang, Hua-kun, Ke Pan, Hui Wang, De-sheng Weng, Hai-feng Song, Jun Zhou, Wei Huang, Jian-jun Li, Min-shan Chen, et Jian-chuan Xia. 2008. « Decreased Expression of ING2 Gene and Its Clinicopathological Significance in Hepatocellular Carcinoma ». *Cancer Letters* 261 (2): 183-92. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.11.019>.
- Zhang, Xin, Ke-Sheng Wang, Zhi-Qin Wang, Lu-Sheng Xu, Qing-Wan Wang, Fei Chen, Dong-Zhi Wei, et Ze-Guang Han. 2005. « Nuclear Localization Signal of ING4 Plays a Key Role in Its Binding to P53 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331 (4): 1032-38. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.023>.
- Zhang, Xing J., Hua Ye, Cheng W. Zeng, Bo He, Hua Zhang, et Yue Q. Chen. 2010. « Dysregulation of MiR-15a and MiR-214 in Human Pancreatic Cancer ». *Journal of Hematology & Oncology* 3 (novembre): 46. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-46>.
- Zhang, Ziwen, Chaojun Fu, Quanyu Xu, et Xiaoli Wei. 2017. « Long Non-Coding RNA CASC7 Inhibits the Proliferation and Migration of Colon Cancer Cells via Inhibiting MicroRNA-21 ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 95 (novembre): 1644-53. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.052>.
- Zhao, Shuang, Xue-Feng Yang, Wen-Feng Gou, Hang Lu, Hua Li, Zhi-Tu Zhu, Hong-Zhi Sun, et Hua-Chuan Zheng. 2016. « Expression Profiles of Inhibitor of Growth Protein 2 in Normal and Cancer Tissues: An Immunohistochemical Screening Analysis ». *Molecular Medicine Reports* 13 (2): 1881-87. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4723>.
- Zhao, Song, Long Wang, Chunmei Zhang, Yu Deng, Bai Zhao, Yuxin Ren, Yingmei Fu, et Xianzhi Meng. 2018. « Inhibitor of Growth 3 Induces Cell Death by Regulating Cell Proliferation, Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Blocking the PI3K/AKT Pathway ». *Cancer Gene Therapy* 25 (9-10): 240-47. <https://doi.org/10.1038/s41417-018-0023-4>.
- Zhou, Ruiyao, Anand Rotte, Gang Li, Xiaolei Chen, Guangdi Chen, et Madhuri Bhandaru. 2020. « Nuclear Localization of ING3 Is Required to Suppress Melanoma Cell Migration, Invasion and Angiogenesis ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 527 (2): 418-24. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.056>.
- Zhuang, Jie, Ping-yuan Wang, Xinglu Huang, Xiaoyuan Chen, Ju-Gyeong Kang, et Paul M Hwang. 2013. « Mitochondrial Disulfide Relay Mediates Translocation of P53 and Partitions Its Subcellular Activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (43): 17356-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310908110>.
- Zinovkina, L. A. 2018. « Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals ». *Biochemistry. Biokhimiia* 83 (3): 233-49. <https://doi.org/10.1134/S0006297918030045>.
- Zu, Xin Lin, et Michael Guppy. 2004. « Cancer Metabolism: Facts, Fantasy, and Fiction ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (3): 459-65. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.136>.

# ANNEXES



Review

# Exploiting ING2 Epigenetic Modulation as a Therapeutic Opportunity for Non-Small Cell Lung Cancer

Alice Blondel <sup>1</sup>, Amine Benberghout <sup>1</sup> , Rémy Pedoux <sup>1</sup>  and Charles Ricordel <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U1242, Chemistry Oncogenesis Stress and Signaling, CLCC Eugène Marquis, 35033 Rennes, France; alice.blondel@univ-rennes1.fr (A.B.); benberghout.amine@gmail.com (A.B.); remy.pedoux@univ-rennes1.fr (R.P.)

<sup>2</sup> CHU Rennes, Service de Pneumologie, Université de Rennes 1, 35033 Rennes, France

\* Correspondence: charles.ricordel@chu-rennes.fr; Tel.: +33-(0)2-9928-3738; Fax: +33-(0)2-9928-2480

Received: 29 September 2019; Accepted: 11 October 2019; Published: 21 October 2019



**Abstract:** Non-small cell lung cancer (NSCLC) has been the leading cause of cancer-related death worldwide, over the last few decades. Survival remains extremely poor in the metastatic setting and, consequently, innovative therapeutic strategies are urgently needed. Inhibitor of Growth Gene 2 (ING2) is a core component of the mSin3A/Histone deacetylases complex (HDAC), which controls the chromatin acetylation status and modulates gene transcription. This gene has been characterized as a tumor suppressor gene and its status in cancer has been scarcely explored. In this review, we focused on ING2 and other mSin3A/HDAC member statuses in NSCLC. Taking advantage of existing public databases and known pharmacological properties of HDAC inhibitors, finally, we proposed a therapeutic model based on an ING2 biomarker-guided strategy.

**Keywords:** ING2; ING1; ING3; ING4; ING5; non-small cell lung cancer; NSCLC; mSin3A/HDAC complex; chromatin remodeling; HDAC inhibitors; therapeutic approach

## 1. Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide. Among the different subtypes of lung cancer, non-small cell lung cancer (NSCLC) is the prevailing subtype, accounting for about 80% to 85% of cases. The prognosis of NSCLC is poor with a 5-year survival rate of 15% [1]. Although great therapeutic advances have been made during the last decades, patients are often diagnosed with advanced stage disease, where only palliative chemotherapy or immunotherapy is recommended. In this context, deciphering biological relevance of tumor suppressor genes in cancer, such as the inhibitor of growth gene (*ING*) family, is an attractive approach to develop new therapeutic breakthrough. Among this protein family of chromatin readers, ING2 and ING1 allow the recruitment of mSin3A/HDAC chromatin remodeling complex on Histone H3 trimethylated on lysine 4 marks (H3K4me3) [2–4]. Histone deacetylases enzymes could promote adjacent histones deacetylation that would in turn result in chromatin remodeling and regulation of gene transcription, mainly inducing transcription repression [5]. In addition, as part of the p53 pathway, ING2 is involved in diverse cellular processes that are recognized as hallmarks of cancer [6–8] and its deletion in mice led to spontaneous soft tissue sarcomas formation [9]. ING2 is now characterized as a tumor suppressor gene and as such, its expression is frequently altered in human tumors. In this review, we assess literature and public databases to evaluate ING2 and other mSin3A/HDAC member statuses in NSCLC, in an effort to uncover new therapeutic opportunities.

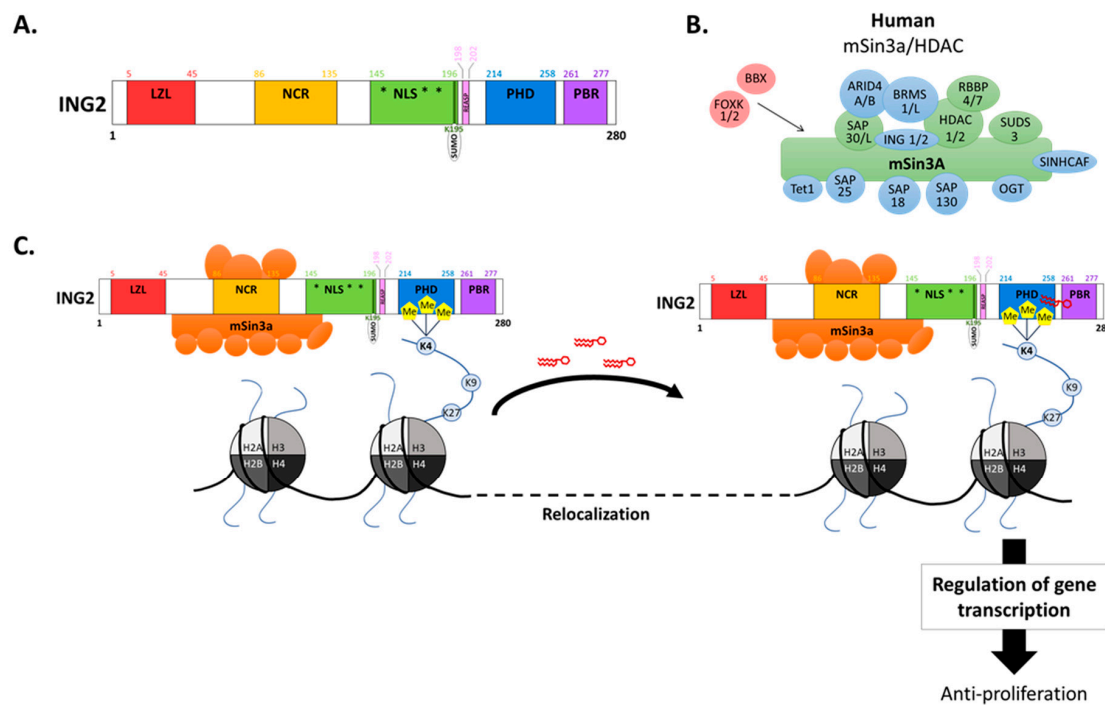
## 2. ING2 Modulates Transcriptional Activity Through Chromatin Remodeling

The first member of the inhibitor of growth gene (*ING*) family, *ING1*, was initially discovered through an in vivo screen based on subtractive hybridization that aimed to identify tumor suppressor genes [10]. Subsequently, an in silico sequence homology search with *ING1* allowed the identification of four other members of the *ING* family—*ING2* [11,12], *ING3* [13], *ING4* and *ING5* [14].

*ING* genes are made up of multiple exons, resulting in numerous transcribed variants, thanks to alternative mRNA splicing. The *ING2* gene is composed of three exons (1a, 1b, and 2) that can be alternatively spliced, thus, leading to two isoforms—*ING2a* and *ING2b* [15]. Using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) to examine *ING2a* and *ING2b* expression level in different tissues, Unoki and colleagues found that both isoforms were ubiquitously expressed, albeit *ING2a* isoform expression was predominant. Moreover, as *ING2b* expression has only been detected at the RNA level and was never detected at the protein level, we focused this review on *ING2a*, which is thereafter referred to as *ING2*.

The nucleosome, which is the fundamental chromatin subunit, consists of two pairs of each histones H2A, H2B, H3, and H4 with DNA wrapped around this octamer. The N-terminal tail of each histones, which emerges between the gyres of the DNA superhelix [16], contains highly conserved lysine residues that are the sites for various covalent modifications, including methylation [17]. These lysine methylations form binding sites for transcriptional regulator proteins [18]. More specifically, histone H3 trimethylated on lysine 4 (H3K4me3) has been reported to be exclusively associated with active transcription, while H3K4 dimethylated (H3K4me2) occurs at both inactive and active genes [19,20]. *ING2* is able to bind to these marks of active transcription, with more affinity for H3K4me3 than for H3K4me2 [2].

The biological roles of *ING2* are related to its various domains (Figure 1, panel A) and more particularly, to its plant homeodomain (PHD), which is characterized by a Cys<sup>4</sup>-His-Cys<sup>3</sup> zinc-binding motif that allows *ING2* stabilization at active chromatin, through the binding to H3K4me3 [2,3]. The PHD motif of *ING2* acts as a dual-specificity module that binds to phosphatidylinositol 5-phosphate (PI(5)P) [21], in addition to H3K4me3. PI(5)P also requires the polybasic region (PBR) that is located immediately after the PHD domain (Figure 1, panel A) to bind efficiently to *ING2* [22] and this binding is suggested to change the *ING2* sub-nuclear distribution, in order to localize it at target gene promoters [23]. This targeting is crucial for recruiting *ING2*-associated HDAC activity to target gene promoters. Indeed, *ING2* is part of the mSin3A-HDAC complex [4], thanks to its interaction with SAP30, mSin3A, and HDAC1 [24]. This interaction is due to its 40–140 N-terminal motif [25], which is involved in chromatin remodeling. Depicting all the mSin3A/HDAC complex members illustrates this mechanism (Figure 1, panel B). Indeed, this multiprotein complex with mSin3A being its core component, is associated with HDAC 1 and 2 [26], that constitutes the major catalytic subunits. An additional core mSin3A/HDAC protein, AT-rich interactive domain-containing protein 4B (ARID4B), is believed to function as a linker between the mSin3A/HDAC complex and the nucleosome, thus, stabilizing their interaction [27]. Some other members of the complex are involved in the recruitment of the HDAC activity, such as BRMS1/L or SAP30/L [28,29], whereas factors as SIN3A Corepressor Complex Component (SUDDS3) [30] and O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) [31] specifically stabilizes HDAC within the complex, while Sin3A Associated Protein 18 (SAP18) [26] and SIN3-HDAC Complex Associated Factor (SINHCAF) [32] help tethering the complex to the target gene promoter, thereby allowing HDAC to regulate gene transcription (Figure 1, panel C). Finally, SAP130 enables the modulation of mSin3A/HDAC transcriptional repression activity by binding a coactivator [33]. Of note, it has been shown that the sumoylation of *ING2* at Lysine 195 enhances *ING2* association with the mSin3A/HDAC complex [25]. As this lysine residue belongs to a phosphorylation-dependent SUMO modification (PDSM) consensus sequence, some authors suggest phosphorylation could modulate this interaction [25], but it remains to be demonstrated experimentally.



**Figure 1.** ING2 regulation of gene transcription through its interaction with H3K4me3 and the transcriptional regulator complex mSin3A/HDAC. (A) Protein structure of Human ING2. LZL—leucine zipper-like region; NCR—novel conserved region; NLS—nuclear localization signal, \*within the NLS three short regions act as a nucleolar targeting signal (NTS); REASP—binding motif; PHD—plant homeodomain; PBR—polybasic region. ING2 structure was built according to UniProtKB ING2\_Human (Q9H160). (B) Mammalian Sin3A/HDAC complex members. The core Sin3A subunits are depicted in green, the Sin3A associated proteins are depicted in blue, and the transcription factors are depicted in red. The names given for each complex member is the one approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). (C) Schematic representation of ING2/H3K4me3/Sin3A formation regulating gene transcription. ING2 PHD domain recognizes trimethylated H3K4 (H3K4me3) as well as phosphatidylinositol 5-phosphate (PI(5)P) while the ING2 N-terminal part is detected by the transcriptional regulator complex mSin3-histone deacetylase. The ING2 sumoylation at Lysine 195 increases its association with this complex. An elevation in PI(5)P nuclear level triggers ING2/mSin3A complex relocalization to novel chromatin sites to regulate the transcription of target genes.

Altogether, mSin3A/HDAC chromatin remodeling complex has been originally reported to massively repress the transcription of a number of genes [5,24,34,35]. Nevertheless, the same complex was recently shown to activate some genes [5,24,36], although this capacity seems limited to a small number of genes. Indeed, in a study based on the comparison of gene expression levels in wild-type versus SIN3-deficient cells in *Drosophila* using full-genome oligonucleotide microarrays, a 10-fold difference was found between the number of activated and repressed genes [5]. Hence, ING2 functions as a bridge to link mSin3A/HDAC complex to H3K4me3, thereby, promoting the deacetylation of adjacent acetylated histone residues, which in turn allows chromatin remodeling and regulation of gene transcription (Figure 1, panel C). Of note, ING1 and ING2 are mutually exclusive in the mSin3A/HDAC complex [37] and the binding affinity for H3K4me3 is greater for ING2 compared to the one of ING1 [3].

Another key role for ING2 involves the p53 pathway as ING2 promoter contains two p53 binding sites [38]. Furthermore, the expression of ING2 results in p53 acetylation at Lysine 382 through the histone acetyltransferase p300 [12]. This enhanced acetylation led to p53 activation, ultimately preventing cell proliferation through induction of either senescence [39], apoptosis [40,41], or cell-cycle arrest in G1 [42]. Hence, ING2 is involved in multiple cellular processes, most of which are recognized hallmarks of tumorigenesis (cell-cycle regulation, replicative senescence [7], DNA repair [8], and DNA

replication [6]). Moreover, a study conducted on *ING2* knockout mice indicates that *ING2* deficiency spontaneously increases soft tissue sarcoma formation [9].

All of these facts highlight *ING2* as a tumor suppressor gene, playing a critical role against tumor development and cancer, notably through the regulation of mSin3A/HDAC-mediated epigenetic functions.

### 3. *ING2* Status in Human Tumors

#### 3.1. *ING2* Alterations in Human Tumors

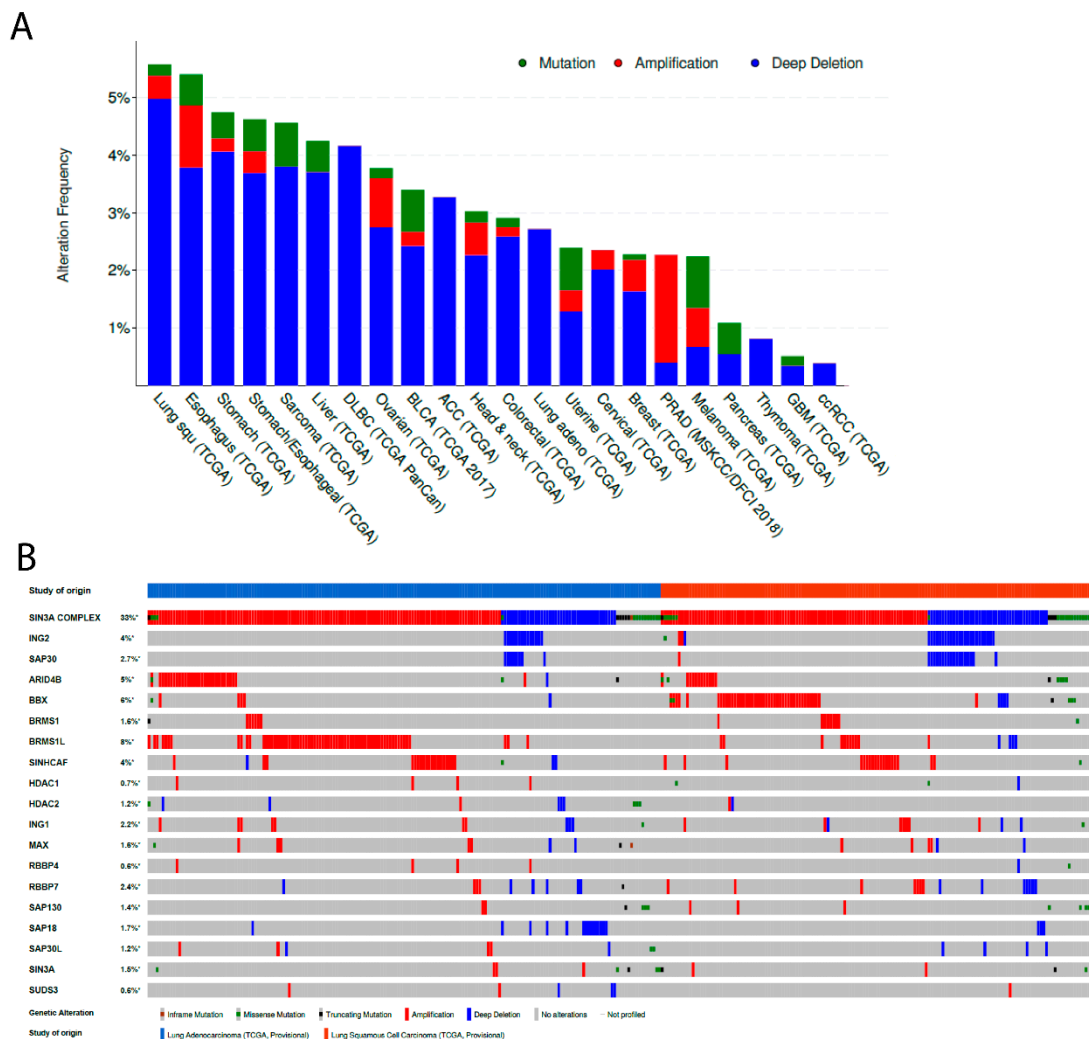
As a tumor suppressor gene, several studies have explored *ING2* gene status in different types of human tumors, whether at the genomic, transcriptomic or protein level. Using immunohistochemistry assay, it has been reported that *ING2* protein expression was decreased in patients with melanoma, breast cancer, hepatocellular carcinoma (16/29 and 44/84) and osteosarcoma [43–45]. This downregulation was correlated with tumor size, histological and pathological classification, alpha-fetoprotein serum level, and the overall survival in hepatocellular carcinoma [44], whereas it only correlated with the overall survival in patients with osteosarcoma [46]. Conversely, overexpression of the *ING2* protein was found in patients with endometrial carcinoma and hepatocellular carcinoma (40/84) [44,45]. Moreover, studies on tumor cell lines also found that *ING2* was overexpressed in cervical carcinoma, colon cancer, and acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell lines [36,45,47]. However, the precise mechanism by which *ING2* expression is altered was not fully elucidated in most studies. Nevertheless, some authors found that miR-153-3p represses *ING2* expression in ALL cells by binding to the 3'-UTR site, and that miR-153-3p is downregulated in ALL cells [47], leading to *ING2* overexpression. Additionally, NF- $\kappa$ B can bind to the *ING2* promoter region and activate *ING2* transcription in colon cancer. Finally, other authors have suggested that activation of NF- $\kappa$ B lead to the upregulation of *ING2* [36].

At the transcriptomic level, studies found that *ING2* mRNA was downregulated in several tumor types including basal cell carcinoma (75/75), hepatocellular carcinoma and osteosarcoma [44,46,48]. *ING2* downregulation has also been reported in breast, lung, ovarian, pancreatic, and prostate cancer cell lines [49,50]. On one hand, *ING2* upregulation at the mRNA level was reported in patients with colon cancer (18/34) [36], even if the underlying mechanism was not investigated in this study. On the other hand, one publication suggested that the *ING2* gene could be targeted on its 3'-UTR site by miR-8084, which showed tumor-promoting properties in breast cancer [51]. This post-translational regulation of the *ING2* gene expression might explain the discrepancies observed in many publications between *ING2* mRNA level and *ING2* protein expression [52].

Finally, at the genomic level, loss of heterozygosity (LOH) of the *ING2* chromosomal region has been reported in ameloblastoma (14/28), head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) (30/55) (4q35.1), hepatocellular carcinoma (41.2%) (4q34–35.2), and basal cell carcinoma (3/11) (4q32–35) [53–57]. Moreover, LOH of the 4q35.1 region in HNSCC was correlated with tumor stage and disease-free survival but not with node status or overall survival [54], whereas no correlation has been found in hepatocellular carcinoma [55]. Additionally, deletion of the chromosomal region 4q34–35.2 containing the *ING2* gene has also been reported in uterine leiomyosarcoma (3/6) [58], and hypermethylation of the seven CpG sites in multiple intronic regions of the *ING2* gene has been shown in patients with esophageal squamous cell carcinoma. This was also observed in matched plasma cell-free DNA samples [59], even if the biological consequence of this intronic methylation on *ING2* expression remains unknown.

To explore further *ING2* status in cancer, we used The Cancer Genome Atlas database [60,61] to analyze alterations of the *ING2* gene and the members of the mSin3A/HDAC complex. This analysis revealed that 221 out of 9,892 (2.23%) human cancer samples included in the TCGA Pancancer study presented an alteration of *ING2* gene and 161 of these 221 (73%) alterations were deletions. Moreover, 2,384 out of 9,892 (24.1%) tumor samples presented an alteration in at least one member of the Sin3a

HDAC complex. Interestingly, one of the tumor types with the most frequent alteration in *ING2* was the lung squamous cell carcinoma, comprising 5.54% of the tumors involved (Figure 2, panel A).



**Figure 2.** Despite *ING2* being rarely altered at the genomic level in cancers, genomic alteration of at least one member of the mSin3A/HDAC complex is frequent. (A) Bar graph showing the alteration frequency according to pathology (from the TCGA database). Blue represents gene deletion, red represents gene amplification, and green represents gene mutation. (B) Heatmap representing genomic alterations of mSin3A/HDAC members, according to NSCLC subtype (adenocarcinoma or squamous cell carcinoma) (from the TCGA database). First line is a pool of all mSin3A/HDAC member genomic alterations. Of note, specimens without any genomic alteration concerning the mSin3A/HDAC members are not depicted in the figure.

### 3.2. *ING2* Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer

*ING2* has also been reported to be altered in NSCLC at the protein, transcriptomic, and genomic level. Indeed, two independent studies showed that *ING2* expression levels were decreased at the protein level (independent of the p53 status). A study observed the loss of *ING2* expression in 70 out of 120 (58.3%) NSCLC [62] (Table 1), and was more frequent in adenocarcinoma than in squamous cell carcinoma (68% and 45%, respectively). However, no correlation was observed between *ING2* expression in NSCLC and age, gender, disease stage, or patient survival [62]. Another study, conducted on Chinese patient specimens, showed that the *ING2* expression was lost in 21 of 64 (32.8%) NSCLC and more frequently in ADK than in SCC (45.8% and 26.3%, respectively) (Table 1). *ING2* loss was



correlated with lymph node metastasis status and TNM stage in squamous cell carcinoma, but not in adenocarcinoma [63]. Whether these discrepancies between these two studies are due to antibody specificity or ethnic disparities (notably, oncogenic driver mutational status was unknown in both studies), remains to be elucidated.

**Table 1.** ING2a status in human lung cancer.

Tissue Type	Origin	Mutation Type/Expression Change	Methods	Position	Coding	Frequency	Ref.
Lung cancer	Cell lines	Downregulation	RT-QPCR	LZL (13)	Ala -> Ala	7/8	[49]
	Patient	Substitution	PCR-SSCP, Sequencing			6/31	
	Patient	Substitution	PCR-SSCP, Sequencing	6bp downstream exon 1		6/31	
Lung cancer	Cell lines	Downregulation	Q-PCR			2/2	[50]
Lung cancer	Patient	Downregulation	IHC			70/120	[62]
	Patient	No LOH	MM			0/12	
	Patient	Substitution	Sequencing	39	Ala -> Ala	21/22	
	Patient	Downregulation	Q-PCR			15/22	
NSCLC	Patient	No change	Q-PCR			6/22	
		Upregulation	Q-PCR			1/22	
		Downregulation, aberrantly localization	IHC, RT-PCR, WB			21/64 (32.8%)	[63]
Adenocarcinoma	Patient	Downregulation, aberrantly localization	IHC, RT-PCR, WB			11/24 (45.8%)	
Squamous cell carcinoma	Patient	Downregulation, aberrantly localization	IHC, RT-PCR, WB			10/38 (26.3%)	
NSCLC	Patient	Chromosomal deletion	cDNA Microarray	4q34.2–q35.1		2/10 (20%)	[64]

Abbreviations: IHC—Immunohistochemistry; LOH—Loss of Heterozygosity; LZL—Leucine Zipper Like domain; MM—Microsatellite Marker; NSCLC—Non Small Cell Lung Carcinoma; PCR-SSCP—Polymerase Chain Reaction—Single Strand Conformation Polymorphism; RT-PCR—Retro transcription—Polymerase Chain Reaction; Q-PCR—Quantitative-Polymerase Chain Reaction; and WB—Western Blot.

Moreover, some study supports a transcriptional control of *ING2* expression in NSCLC showing a correlation with *ING2* mRNA decrease and low protein expression [62]. Consistently, studies also reported that *ING2* was downregulated at the mRNA level in lung cancer cell lines [49,50]. Nevertheless, contradictory results have been found when analyzing TCGA and The Human Protein Atlas (THPA) databases, as the authors did not find any correlation between *INGs* mRNA and protein expression [52]. It is worth noticing that *ING2* degradation has been shown to be mediated by Smad 1 ubiquitination regulatory factor 1 (Smurf 1) [65], a protein highly expressed in lung cancer [66]. Therefore, this mechanism could participate to the contradictory observation made between *ING2* mRNA level and protein expression in lung cancer.

Another alteration frequently occurring in NSCLC is the chromosomal deletion of the 4q35.1 region, which includes *ING2* gene. Indeed, it has been reported that the chromosomal region 4q34.2–35.1 was deleted in 2 out of 10 patients with NSCLC [64] (Table 1). However, further investigations on larger samples of patients need to be performed to confirm this observation. Additionally, this chromosomal region contains not only *ING2* gene but also many other genes such as *SAP30* and micro-RNAs (miR-6082; miR-548T; miR-4276; miR-1305; miR-3945; and miR-4455). Therefore, it is still unclear if the deletion of *ING2* alone or the whole chromosomal region is implicated in promoting tumorigenesis. Concerning *ING2* mutations, only silent ones have been found in NSCLC. As an example, a study reported a substitution (C to T) in exon 1 at codon 13 in 6 out of 31 lung cancer (without any change of the encoded amino acid (Alanine) [49]) was likely to be a polymorphism (Table 1).

Interestingly, the analysis of the mSin3A/HDAC complex member alterations in NSCLC via the TCGA database revealed that *ING2* was altered in 20 out of 408 (4.9%) NSCLC and was found to be higher in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma (6.7% and 2.6%, respectively) (Figure 2, panel A). Moreover, the *ING2* gene deep deletion was the most frequent alteration with 17 out of 408 (3.54%) NSCLC and was found to be higher in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma (6.18% and 2.61%, respectively). Only one missense mutation (E204Q) of *ING2* of unknown significance was reported out of the 408 NSCLC samples. Focusing on all members of the mSin3A/HDAC complex, data revealed that 152 of the 408 (37.3%) NSCLC presented an alteration in at least one member of the mSin3A/HDAC complex, occurring in 38.8% of squamous cell carcinoma specimens and 36.1% of adenocarcinoma specimens (Figure 2, panel B). Notably, we found that patients presenting an alteration in at least one member of the mSin3A/HDAC complex had a higher probability of prolonged overall survival, in comparison with patients without any alteration of the complex in lung squamous cell carcinoma ( $p = 0.0451$ ) (data not shown).

In summary, the tumor suppressor protein *ING2* was found to be altered in human tumors, especially in NSCLC, mainly at the protein level (varying from 32.8% to 58.3% according to different studies). *ING2* gene alterations in NSCLC are predominantly deletion, but still remain a rare event (less than 3%). Strikingly, genomic alteration of at least one component of the mSin3A/HDAC complex appears to be relatively common in human cancers and NSCLC (24.1% and 33%, respectively) (Figure 2, panel B).

#### 4. Potential Role of the *ING2* Epigenetic Modulation in Lung Cancer Treatment

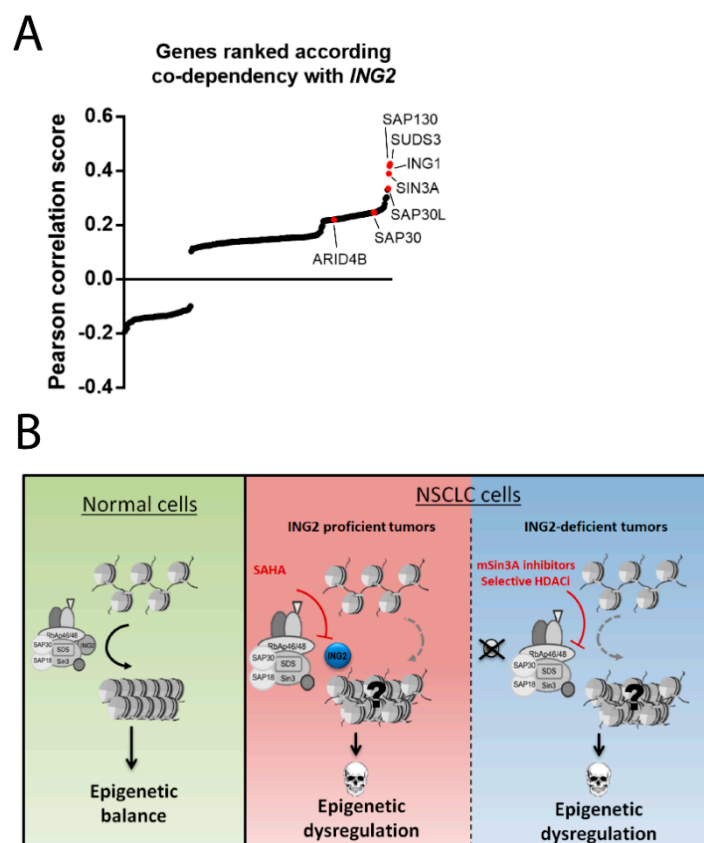
NSCLC is a deadly disease and the leading cause of cancer-related death worldwide. Even if great advances in the field have been made during the last decade, notably thanks to the emergence of targeted therapies and immunotherapies, survival remains poor in the metastatic setting. In this context, developing new therapeutic approaches based on predictive biomarkers is still an active area of research [67]. As discussed above, *ING2* genomic alterations are rare in non-small cell lung cancer, and loss at the protein level has been reported within a large proportion range. Even though the number of studies that investigate the expression of *ING2* protein are limited in lung cancer, its potential use as a diagnosis biomarker has been suggested by some authors [68].

##### 4.1. Exploring *ING2* Dependencies in Cancer Cells

Recently, lot of great efforts have been made to uncover genetic vulnerabilities in cancer, notably taking advantage of the emergent CrispR-screening methods. The Cancer Dependency Map project, led by the Broad Institute, is a systematic high-throughput screening of genotype-specific cancer vulnerabilities in tumor cell lines [69]. According to the latest dataset (CrispR AVANA public 19Q2), many mSin3A/HDAC members are found among the top *ING2* gene co-dependencies in cancer cell lines (Figure 3, panel A). These results suggest that many tumor cells lines are dependent on a functionally active mSin3A/HDAC complex for proliferation. Consequently, we speculate that it could be utilized as an “Achilles’ heel”, potentially leading to a biomarker-guided therapeutic model (Figure 3, panel B).

Moreover, multiple studies support the important biological role of the mSin3A-HDAC complex in tumors. Of note, it was originally shown that mSin3A/B recruitment was necessary to antagonize c-MYC induced transcriptional activation [70]. *SIN3A*-knockout studies using multiples physiological models demonstrate that a reduction of the mSin3A levels correlates with a loss of proliferative abilities [71,72]. Interestingly, *mSin3A* loss of expression in mouse foregut endoderm lead to severe defect in lung morphogenesis and development [73], underlying its biological role in lung epithelial cells. In cancer cells, whether the mSin3A/HDAC complex as a whole show more tumor suppressive or oncogenic properties, is still under debate [74]. However, the relative high frequencies of genomic alteration concerning at least one member of the mSin3A/HDAC complex in NSCLC TCGA samples, notably gene amplification (23.6% of adenocarcinoma and 17.53% of squamous cell carcinoma) (Figure 2, Panel B), clearly pledges for a “gain-of-function” phenotype predisposing tumors cells to a selective advantage.

Additionally, small molecule inhibitors targeting Paired Amphipathic Helix 2 (PAH2) domain of mSin3A was shown to induce transcriptional reprogramming, impairment of clonogenic abilities, inhibition of proliferation, and metastasis in triple negative breast cancer models [75]. Coherently, the Cancer Dependency Map project database characterizes *SIN3A* gene as a “common essential” gene in a vast majority of cancer cell lines. It is of note that *SIN3A*-knockout mice embryos stop developing after 6.5 weeks [76]. Consequently, targeting mSin3A itself, or specific partners of the complex, appears to be an attractive therapeutic strategy in cancer. Conversely, it is hard to conciliate the fact that ING2 is a recognized tumor suppressor protein belonging to a multi-protein complex that tends to proffer oncogenic properties in cancer cells. However, some could argue that many non-epigenetic functions of ING2 favor its tumor suppressive activity (DNA repair, DNA replication, cell cycle progression, etc.) but it still remains an unresolved issue to date.



**Figure 3.** Co-dependency between *ING2* and mSin3A/HDAC complex members in tumor cell lines. (A) Graph depicting ranked Pearson correlation score between the CERES dependency score for each tested gene in the Cancer Dependency Map Project and the *ING2* CERES dependency score. (B) Working model for a *ING2* biomarker-based therapeutic strategy in NSCLC. Tumors expressing *ING2* are more likely to depend on the oncogenic properties of mSin3A/HDAC for survival and could be targeted by suberoyl anilide hydroxamic acid (SAHA). Tumors that lose *ING2* expression cannot be treated by SAHA, but can be treated by mSin3A direct inhibitors (mSin3Ai) or HDAC1/2 inhibitors (s.HDACi).

#### 4.2. Targeting *SIN3A*-Mediated *ING2* Functions in Cancer Cells

Suberoyl anilide hydroxamic acid (SAHA), also called vorinostat, a class I, II, and IV HDAC inhibitor (HDACi), was described as a potent inhibitor of the mSin3A/HDAC complex-mediated functions [37]. More precisely, *ING2* protein interaction with the mSin3A-HDAC complex was abrogated in HEK 293T cells treated with SAHA [77]. Interestingly, HDAC inhibitor induced dissociation of *ING2* with the mSin3A/HDAC complex was independent from the PHD domain of *ING2*, suggesting that this drug effect was not dependent on the *ING2* chromatin fixation. Similar observations were



made with other HDACi molecules (trichostatin A and apicidin). Notably, ING2 and mSin3A/HDAC complex occupancy on the tumor suppressor *p21* promoter was reduced in SAHA treated HEK 293T. Consequently, authors hypothesized that ING2 disruption lead to the induction of *p21* transcription, as it was observed, upon HDACi treatment [78]. Conversely, an independent study showed that *p21* expression was reduced in ING2-downregulated U2OS cells, leading to cell cycle progression, in a p53-independent manner [79]. These contradictory findings might be explained by the broader cellular effects of SAHA, a pan-HDAC inhibitor [80], or by the potential impact of SAHA on ING2 post-translational modification. Notably, as already mentioned above, ING2 sumoylation on Lysine 195 has been described to enhance its interaction with mSin3A [25]. Therefore, whether ING2 disruption induced by SAHA is dependent on its sumoylation status is an interesting question that needs to be explored. Nevertheless, the use of SAHA represents an attractive approach to target ING2-mediated mSin3A/HDAC epigenetic functions.

Interestingly, the Cancer Dependency Map also uncovered a co-dependency between ING1 and ING2 in multiple cancer cell lines (data not shown) suggesting a potential crosstalk between the protein's functions. Coherently, these two members of the ING family share an important structural homology, except for the N-terminal part, and are both stable and exclusive components of the mSin3A/HDAC complex. However, the subscription of ING1 and ING2 to this complex is highly conserved throughout evolution [81], suggesting that some ING1 and ING2 mSin3A/HDAC-mediated functions are biologically important but not redundant. In line with this hypothesis, *ING1* and *ING2* double knock-out mice show embryonic lethality (not published), but not their single knock-out counterparts, which shows distinct phenotypes [9,82]. In terms of therapeutic approach, HDAC inhibitors do not disturb ING1 interaction to mSin3A/HDAC [77], and it is, therefore, unknown if HDAC inhibitors could impact ING1 epigenetic functions. Finally, to our knowledge no study to date has concomitantly explored the status of ING1 and ING2 proteins in human cancers. Altogether, more experimental data are needed to precisely decipher the potential redundant or exclusive mSin3A/HDAC-mediated roles relying on ING1 and ING2.

During the last two decades, many HDAC inhibitors have been developed and were tested in clinical trials due to their pleiotropic antineoplastic properties [83]. Indeed, in various types of cancer, histone deacetylation was found to deeply impact cellular fate [84]. Of note, studies claiming to inactivate mSin3A as a therapeutic target in leukemia are limited to the use of non-selective HDAC inhibitors that do not target mSin3A directly. To date, HDAC inhibitors have only been approved for T cell-lymphoma (vorinostat, romidepsin, and belinostat) and multiple myeloma (panobinostat), but many clinical trials are ongoing in solid tumors [85]. As the specificity of HDAC inhibitors have greatly improved over the last decades, deciphering the biological consequences of these treatments on ING2 epigenetic function is of prime interest in order to explore new therapeutic strategies.

Altogether, these findings lead us to hypothesize a biomarker-based therapeutic strategy, involving ING2 as a tumor predictive factor for SAHA sensitivity in NSCLC (Figure 3, Panel B). In light of the observation of a high frequency of mSin3A/HDAC complex-alteration in cancer, determining if such genomic alteration could make ING2-expressing cells more prone to HDAC inhibitors efficacy is a very interesting hypothesis to elucidate. Conversely, in ING2-non-expressing cells, as this "target" could not be disrupted by SAHA, small molecules that directly inhibit mSin3A or more specific HDAC inhibitors, could represent a more convenient way to circumvent this issue. Experimental studies are actually ongoing to explore this working hypothesis.

## 5. Conclusions

ING2 protein is a chromatin reader and a stable component of the mSin3A/HDAC complex. Several tumor suppressive functions have been described for ING2 in cancer cell lines, and in accordance with these observations, ING2 expression is lost in many cancer subtypes. Interestingly, genomic alterations of mSin3A/HDAC members occur frequently in NSCLC, mainly through gene amplification. Recent experimental data have revealed that a vast majority of tumor cell lines depend on a functionally

active mSin3A/HDAC complex to proliferate. As ING2 can be pharmacologically disrupted from the mSin3A/HDAC complex by SAHA, we built a model based on an ING2 biomarker-guided therapeutic hypothesis. Further research is still warranted to confirm the predictive value of ING2 in clinical practice of NSCLC.

**Author Contributions:** A.B. (Alice Blondel), A.B. (Amine Benberghout), and C.R. were responsible for literature review and manuscript writing. A.B. (Alice Blondel) and C.R. were responsible for editing the figures. A.B. (Amine Benberghout) was responsible for editing the tables. R.P. was responsible for manuscript design and review. All authors approved the final version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Ligue contre le Cancer Grand Ouest and Fondation Novartis (DEQ20180339169).

**Acknowledgments:** A.B. (Alice Blondel) is a recipient of the doctoral fellowship ARED/INSERM (région Bretagne). C.R. is a recipient of the FHU Camin (CHU Rennes) and Nuovo-Soldati Foundation (CHU Genève) fellowships.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Molina, J.R.; Yang, P.; Cassivi, S.D.; Schild, S.E.; Adjei, A.A. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* **2008**, *83*, 584–594. [[CrossRef](#)]
2. Shi, X.; Hong, T.; Walter, K.L.; Ewalt, M.; Michishita, E.; Hung, T.; Carney, D.; Peña, P.; Lan, F.; Kaadige, M.R.; et al. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **2006**, *442*, 96–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Peña, P.V.; Davrazou, F.; Shi, X.; Walter, K.L.; Verkhusha, V.V.; Gozani, O.; Zhao, R.; Kutateladze, T.G. Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* **2006**, *442*, 100–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Doyon, Y.; Cayrou, C.; Ullah, M.; Landry, A.-J.; Côté, V.; Selleck, W.; Lane, W.S.; Tan, S.; Yang, X.-J.; Côté, J. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol. Cell* **2006**, *21*, 51–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Pile, L.A.; Spellman, P.T.; Katzenberger, R.J.; Wassarman, D.A. The SIN3 deacetylase complex represses genes encoding mitochondrial proteins: Implications for the regulation of energy metabolism. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 37840–37848. [[CrossRef](#)]
6. Larrieu, D.; Ythier, D.; Binet, R.; Brambilla, C.; Brambilla, E.; Sengupta, S.; Pedoux, R. ING2 controls the progression of DNA replication forks to maintain genome stability. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1168–1174. [[CrossRef](#)]
7. Pedoux, R.; Sengupta, S.; Shen, J.C.; Demidov, O.N.; Saito, S.; Onogi, H.; Kumamoto, K.; Wincovitch, S.; Garfield, S.H.; McMenamin, M.; et al. ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 6639–6648. [[CrossRef](#)]
8. Wang, J.; Chin, M.Y.; Li, G. The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1906–1911. [[CrossRef](#)]
9. Saito, M.; Kumamoto, K.; Robles, A.I.; Horikawa, I.; Furusato, B.; Okamura, S.; Goto, A.; Yamashita, T.; Nagashima, M.; Lee, T.-L.; et al. Targeted disruption of Ing2 results in defective spermatogenesis and development of soft-tissue sarcomas. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15541. [[CrossRef](#)]
10. Garkavtsev, I.; Kazarov, A.; Gudkov, A.; Riabowol, K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat. Genet.* **1996**, *14*, 415–420. [[CrossRef](#)]
11. Shimada, Y.; Saito, A.; Suzuki, M.; Takahashi, E.; Horie, M. Cloning of a novel gene (ING1L) homologous to ING1, a candidate tumor suppressor. *Cytogenet. Cell Genet.* **1998**, *83*, 232–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Nagashima, M.; Shiseki, M.; Miura, K.; Hagiwara, K.; Linke, S.P.; Pedoux, R.; Wang, X.W.; Yokota, J.; Riabowol, K.; Harris, C.C. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9671–9676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Nagashima, M.; Shiseki, M.; Pedoux, R.M.; Okamura, S.; Kitahama-Shiseki, M.; Miura, K.; Yokota, J.; Harris, C.C. A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* **2003**, *22*, 343–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Shiseki, M.; Nagashima, M.; Pedoux, R.M.; Kitahama-Shiseki, M.; Miura, K.; Okamura, S.; Onogi, H.; Higashimoto, Y.; Appella, E.; Yokota, J.; et al. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2373–2378.
15. Unoki, M.; Kumamoto, K.; Robles, A.I.; Shen, J.C.; Zheng, Z.-M.; Harris, C.C. A novel ING2 isoform, ING2b, synergizes with ING2a to prevent cell cycle arrest and apoptosis. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3868–3874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Luger, K.; Mäder, A.W.; Richmond, R.K.; Sargent, D.F.; Richmond, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **1997**, *389*, 251–260. [[CrossRef](#)]
17. Murray, K. The occurrence of epsilon-n-methyl lysine in histones. *Biochemistry* **1964**, *3*, 10–15. [[CrossRef](#)]
18. Fischle, W.; Franz, H.; Jacobs, S.A.; Allis, C.D.; Khorasanizadeh, S. Specificity of the chromodomain Y chromosome family of chromodomains for lysine-methylated ARK(S/T) motifs. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 19626–19635. [[CrossRef](#)]
19. Bernstein, B.E.; Kamal, M.; Lindblad-Toh, K.; Bekiranov, S.; Bailey, D.K.; Huebert, D.J.; McMahon, S.; Karlsson, E.K.; Kulbokas, E.J.; Gingeras, T.R.; et al. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **2005**, *120*, 169–181. [[CrossRef](#)]
20. Santos-Rosa, H.; Schneider, R.; Bannister, A.J.; Sherriff, J.; Bernstein, B.E.; Emre, N.C.T.; Schreiber, S.L.; Mellor, J.; Kouzarides, T. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **2002**, *419*, 407–411. [[CrossRef](#)]
21. Gozani, O.; Karuman, P.; Jones, D.R.; Ivanov, D.; Cha, J.; Lugovskoy, A.A.; Baird, C.L.; Zhu, H.; Field, S.J.; Lessnick, S.L.; et al. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **2003**, *114*, 99–111. [[CrossRef](#)]
22. Kaadige, M.R.; Ayer, D.E. The polybasic region that follows the plant homeodomain zinc finger 1 of Pfl is necessary and sufficient for specific phosphoinositide binding. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 28831–28836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bua, D.J.; Martin, G.M.; Binda, O.; Gozani, O. Nuclear phosphatidylinositol-5-phosphate regulates ING2 stability at discrete chromatin targets in response to DNA damage. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ohkouchi, C.; Kumamoto, K.; Saito, M.; Ishigame, T.; Suzuki, S.-I.; Takenoshita, S.; Harris, C.C. ING2, a tumor associated gene, enhances PAI-1 and HSPA1A expression with HDAC1 and mSin3A through the PHD domain and C-terminal. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 7367–7374. [[CrossRef](#)]
25. Ythier, D.; Larrieu, D.; Binet, R.; Binda, O.; Brambilla, C.; Gazzeri, S.; Pedoux, R. Sumoylation of ING2 regulates the transcription mediated by Sin3A. *Oncogene* **2010**, *29*, 5946–5956. [[CrossRef](#)]
26. Zhang, Y.; Iratni, R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Reinberg, D. Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* **1997**, *89*, 357–364. [[CrossRef](#)]
27. Parthun, M.R.; Widom, J.; Gottschling, D.E. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: Links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **1996**, *87*, 85–94. [[CrossRef](#)]
28. Laherty, C.D.; Billin, A.N.; Lavinsky, R.M.; Yochum, G.S.; Bush, A.C.; Sun, J.M.; Mullen, T.M.; Davie, J.R.; Rose, D.W.; Glass, C.K.; et al. SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors. *Mol. Cell* **1998**, *2*, 33–42. [[CrossRef](#)]
29. Zhang, Y.; Sun, Z.W.; Iratni, R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Hampsey, M.; Reinberg, D. SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. *Mol. Cell* **1998**, *1*, 1021–1031. [[CrossRef](#)]
30. Alland, L.; David, G.; Shen-Li, H.; Potes, J.; Muhle, R.; Lee, H.-C.; Hou, H.; Chen, K.; DePinho, R.A. Identification of mammalian Sds3 as an integral component of the Sin3/histone deacetylase corepressor complex. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 2743–2750. [[CrossRef](#)]
31. Yang, X.; Zhang, F.; Kudlow, J.E. Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: Coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell* **2002**, *110*, 69–80. [[CrossRef](#)]
32. Muñoz, I.M.; MacArtney, T.; Sanchez-Pulido, L.; Ponting, C.P.; Rocha, S.; Rouse, J. Family with sequence similarity 60A (FAM60A) protein is a cell cycle-fluctuating regulator of the SIN3-HDAC1 histone deacetylase complex. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 32346–32353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fleischer, T.C.; Yun, U.J.; Ayer, D.E. Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 3456–3467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Li, J.; Lin, Q.; Wang, W.; Wade, P.; Wong, J. Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 687–692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Peinado, H.; Ballestar, E.; Esteller, M.; Cano, A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 306–319. [[CrossRef](#)]
36. Kumamoto, K.; Fujita, K.; Kurotani, R.; Saito, M.; Unoki, M.; Hagiwara, N.; Shiga, H.; Bowman, E.D.; Yanaihara, N.; Okamura, S.; et al. ING2 is upregulated in colon cancer and increases invasion by enhanced MMP13 expression. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 1306–1315. [[CrossRef](#)]
37. Sardi, M.E.; Smith, K.T.; Groppe, B.D.; Gilmore, J.M.; Saraf, A.; Egidy, R.; Peak, A.; Seidel, C.W.; Florens, L.; Workman, J.L.; et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)-induced dynamics of a human histone deacetylase protein interaction network. *Mol. Cell Proteomics* **2014**, *13*, 3114–3125. [[CrossRef](#)]
38. Kumamoto, K.; Spillare, E.A.; Fujita, K.; Horikawa, I.; Yamashita, T.; Appella, E.; Nagashima, M.; Takenoshita, S.; Yokota, J.; Harris, C.C. Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 3193–3203. [[CrossRef](#)]
39. 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* **1997**, *88*, 593–602. [[CrossRef](#)]
40. Lotem, J.; Sachs, L. Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. *Blood* **1993**, *82*, 1092–1096. [[CrossRef](#)]
41. Yonish-Rouach, E.; Resnitzky, D.; Lotem, J.; Sachs, L.; Kimchi, A.; Oren, M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **1991**, *352*, 345–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Di Leonardo, A.; Linke, S.P.; Clarkin, K.; Wahl, G.M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* **1994**, *8*, 2540–2551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lu, F.; Dai, D.L.; Martinka, M.; Ho, V.; Li, G. Nuclear ING2 expression is reduced in human cutaneous melanomas. *Br. J. Cancer* **2006**, *95*, 80–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zhang, H.; Pan, K.; Wang, H.; Weng, D.; Song, H.; Zhou, J.; Huang, W.; Li, J.; Chen, M.; Xia, J. Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **2008**, *261*, 183–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zhao, S.; Yang, X.-F.; Gou, W.-F.; Lu, H.; Li, H.; Zhu, Z.-T.; Sun, H.-Z.; Zheng, H.-C. Expression profiles of inhibitor of growth protein 2 in normal and cancer tissues: An immunohistochemical screening analysis. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13*, 1881–1887. [[CrossRef](#)]
46. Han, X.-R.; Bai, X.-Z.; Sun, Y.; Yang, Y. Nuclear ING2 expression is reduced in osteosarcoma. *Oncol. Rep.* **2014**, *32*, 1967–1972. [[CrossRef](#)]
47. Jiang, J.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Tian, F.; Wang, G. miR-153-3p Suppresses Inhibitor of Growth Protein 2 Expression to Function as Tumor Suppressor in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2019**, *18*, 1533033819852990. [[CrossRef](#)]
48. Temel, M.; Turkmen, A.; Dokuyucu, R.; Cevik, C.; Oztuzcu, S.; Cengiz, B.; Mutaf, M. A novel tumor suppressor gene in basal cell carcinoma: Inhibition of growth factor-2. *Tumour Biol.* **2015**, *36*, 4611–4616. [[CrossRef](#)]
49. Okano, T.; Gemma, A.; Hosoya, Y.; Hosomi, Y.; Nara, M.; Kokubo, Y.; Yoshimura, A.; Shibuya, M.; Nagashima, M.; Harris, C.C.; et al. Alterations in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. *Oncol. Rep.* **2006**, *15*, 545–549. [[CrossRef](#)]
50. Walzak, A.A.; Veldhoen, N.; Feng, X.; Riabowol, K.; Helbing, C.C. Expression profiles of mRNA transcript variants encoding the human inhibitor of growth tumor suppressor gene family in normal and neoplastic tissues. *Exp. Cell Res.* **2008**, *314*, 273–285. [[CrossRef](#)]
51. Gao, Y.; Ma, H.; Gao, C.; Lv, Y.; Chen, X.; Xu, R.; Sun, M.; Liu, X.; Lu, X.; Pei, X.; et al. Tumor-promoting properties of miR-8084 in breast cancer through enhancing proliferation, suppressing apoptosis and inducing epithelial-mesenchymal transition. *J. Transl. Med.* **2018**, *16*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Gournay, M.; Paineau, M.; Archambeau, J.; Pedoux, R. Regulat-INGs in tumors and diseases: Focus on ncRNAs. *Cancer Lett.* **2019**, *447*, 66–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sironi, E.; Cerri, A.; Tomasini, D.; Sirchia, S.M.; Porta, G.; Rossella, F.; Grati, F.R.; Simoni, G. Loss of heterozygosity on chromosome 4q32-35 in sporadic basal cell carcinomas: Evidence for the involvement of p33ING2/ING1L and SAP30 genes. *J. Cutan. Pathol.* **2004**, *31*, 318–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



54. Borkosky, S.S.; Gunduz, M.; Nagatsuka, H.; Beder, L.B.; Gunduz, E.; Ali, M.A.L.S.; Rodriguez, A.P.; Cilek, M.Z.; Tominaga, S.; Yamanaka, N.; et al. Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2009**, *135*, 703–713. [[CrossRef](#)]
55. Zhang, H.; Ma, H.; Wang, Q.; Chen, M.; Weng, D.; Wang, H.; Zhou, J.; Li, Y.; Sun, J.; Chen, Y.; et al. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 4q in hepatocellular carcinoma using high-throughput SNP array. *Oncol. Rep.* **2010**, *23*, 445–455. [[PubMed](#)]
56. Borkosky, S.S.; Gunduz, M.; Beder, L.; Tsujigiwa, H.; Tamamura, R.; Gunduz, E.; Katase, N.; Rodriguez, A.P.; Sasaki, A.; Nagai, N.; et al. Allelic loss of the ING gene family loci is a frequent event in ameloblastoma. *Oncol. Res.* **2010**, *18*, 509–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Cetin, E.; Cengiz, B.; Gunduz, E.; Gunduz, M.; Nagatsuka, H.; Bekir-Beder, L.; Fukushima, K.; Pehlivan, D.; Nishizaki, K.; Shimizu, K.; et al. Deletion mapping of chromosome 4q22-35 and identification of four frequently deleted regions in head and neck cancers. *Neoplasma* **2008**, *55*, 299–304.
58. Mittal, K.R.; Chen, F.; Wei, J.J.; Rijnhvani, K.; Kurvathi, R.; Streck, D.; Dermody, J.; Toruner, G.A. Molecular and immunohistochemical evidence for the origin of uterine leiomyosarcomas from associated leiomyoma and symplastic leiomyoma-like areas. *Mod. Pathol.* **2009**, *22*, 1303–1311. [[CrossRef](#)]
59. Wang, H.-Q.; Yang, C.-Y.; Wang, S.-Y.; Wang, T.; Han, J.-L.; Wei, K.; Liu, F.-C.; Xu, J.; Peng, X.-Z.; Wang, J.-M. Cell-free plasma hypermethylated CASZ1, CDH13 and ING2 are promising biomarkers of esophageal cancer. *J. Biomed. Res.* **2018**, *32*, 424–433.
60. Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [[CrossRef](#)]
61. Gao, J.; Aksoy, B.A.; Dogrusoz, U.; Dresdner, G.; Gross, B.; Sumer, S.O.; Sun, Y.; Jacobsen, A.; Sinha, R.; Larsson, E.; et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal* **2013**, *6*, p11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ythier, D.; Brambilla, E.; Binet, R.; Nissou, D.; Vesin, A.; de Fraipont, F.; Moro-Sibilot, D.; Lantuejoul, S.; Brambilla, C.; Gazzeri, S.; et al. Expression of candidate tumor suppressor gene ING2 is lost in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* **2010**, *69*, 180–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Pan, Y.Q.; Zhang, X.; Xu, D.P.; Bao, W.G.; Lin, A.F.; Xu, H.H.; Yan, W.H. Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in Chinese NSCLC patients. *Neoplasma* **2014**, *61*, 468–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Al Zeyadi, M.; Dimova, I.; Ranchich, V.; Rukova, B.; Nesheva, D.; Hamude, Z.; Georgiev, S.; Petrov, D.; Toncheva, D. Whole genome microarray analysis in non-small cell lung cancer. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29*, 111–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Nie, J.; Liu, L.; Wu, M.; Xing, G.; He, S.; Yin, Y.; Tian, C.; He, F.; Zhang, L. HECT ubiquitin ligase Smurf1 targets the tumor suppressor ING2 for ubiquitination and degradation. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 3005–3012. [[CrossRef](#)]
66. Li, H.; Xiao, N.; Wang, Y.; Wang, R.; Chen, Y.; Pan, W.; Liu, D.; Li, S.; Sun, J.; Zhang, K.; et al. Smurf1 regulates lung cancer cell growth and migration through interaction with and ubiquitination of PIPKIγ. *Oncogene* **2017**, *36*, 5668–5680. [[CrossRef](#)]
67. Tan, W.-L.; Jain, A.; Takano, A.; Newell, E.W.; Iyer, N.G.; Lim, W.-T.; Tan, E.-H.; Zhai, W.; Hillmer, A.M.; Tam, W.-L.; et al. Novel therapeutic targets on the horizon for lung cancer. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, e347–e362. [[CrossRef](#)]
68. Smolle, E.; Fink-Neuboeck, N.; Lindenmann, J.; Smolle-Juettner, F.; Pichler, M. The Biological and Clinical Relevance of Inhibitor of Growth (ING) Genes in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 1118. [[CrossRef](#)]
69. Tsherniak, A.; Vazquez, F.; Montgomery, P.G.; Weir, B.A.; Kryukov, G.; Cowley, G.S.; Gill, S.; Harrington, W.F.; Pantel, S.; Krill-Burger, J.M.; et al. Defining a Cancer Dependency Map. *Cell* **2017**, *170*, 564–576. [[CrossRef](#)]
70. Laherty, C.D.; Yang, W.M.; Sun, J.M.; Davie, J.R.; Seto, E.; Eisenman, R.N. Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* **1997**, *89*, 349–356. [[CrossRef](#)]
71. Cowley, S.M.; Iritani, B.M.; Mendrysa, S.M.; Xu, T.; Cheng, P.F.; Yada, J.; Liggitt, H.D.; Eisenman, R.N. The mSin3A chromatin-modifying complex is essential for embryogenesis and T-cell development. *Mol. Cell Biol.* **2005**, *25*, 6990–7004. [[CrossRef](#)]

72. Dannenberg, J.-H.; David, G.; Zhong, S.; van der Torre, J.; Wong, W.H.; Depinho, R.A. mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 1581–1595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Yao, C.; Carraro, G.; Konda, B.; Guan, X.; Mizuno, T.; Chiba, N.; Kostelny, M.; Kurkciyan, A.; David, G.; McQualter, J.L.; et al. Sin3a regulates epithelial progenitor cell fate during lung development. *Development* **2017**, *144*, 2618–2628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Bansal, N.; David, G.; Farias, E.; Waxman, S. Emerging Roles of Epigenetic Regulator Sin3 in Cancer. *Adv. Cancer Res.* **2016**, *130*, 113–135. [[PubMed](#)]
75. Kwon, Y.-J.; Petrie, K.; Leibovitch, B.A.; Zeng, L.; Mezei, M.; Howell, L.; Gil, V.; Christova, R.; Bansal, N.; Yang, S.; et al. Selective Inhibition of SIN3 Corepressor with Avermectins as a Novel Therapeutic Strategy in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 1824–1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. McDonel, P.; Demmers, J.; Tan, D.W.M.; Watt, F.; Hendrich, B.D. Sin3a is essential for the genome integrity and viability of pluripotent cells. *Dev. Biol.* **2012**, *363*, 62–73. [[CrossRef](#)]
77. Smith, K.T.; Martin-Brown, S.A.; Florens, L.; Washburn, M.P.; Workman, J.L. Deacetylase inhibitors dissociate the histone-targeting ING2 subunit from the Sin3 complex. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 65–74. [[CrossRef](#)]
78. Richon, V.M.; Sandhoff, T.W.; Rifkind, R.A.; Marks, P.A. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10014–10019. [[CrossRef](#)]
79. Larrieu, D.; Ythier, D.; Brambilla, C.; Pedoux, R. ING2 controls the G1 to S-phase transition by regulating p21 expression. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 3984–3990. [[CrossRef](#)]
80. Jones, P.A.; Issa, J.-P.J.; Baylin, S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 630–641. [[CrossRef](#)]
81. Loewith, R.; Meijer, M.; Lees-Miller, S.P.; Riabowol, K.; Young, D. Three yeast proteins related to the human candidate tumor suppressor p33(ING1) are associated with histone acetyltransferase activities. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 3807–3816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Kichina, J.V.; Zeremski, M.; Aris, L.; Gurova, K.V.; Walker, E.; Franks, R.; Nikitin, A.Y.; Kiyokawa, H.; Gudkov, A.V. Targeted disruption of the mouse ing1 locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene* **2006**, *25*, 857–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Roca, M.S.; Di Gennaro, E.; Budillon, A. Implication for Cancer Stem Cells in Solid Cancer Chemo-Resistance: Promising Therapeutic Strategies Based on the Use of HDAC Inhibitors. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Patra, S.; Panigrahi, D.P.; Praharaj, P.P.; Bhol, C.S.; Mahapatra, K.K.; Mishra, S.R.; Behera, B.P.; Jena, M.; Bhatia, S.K. Dysregulation of histone deacetylases in carcinogenesis and tumor progression: A possible link to apoptosis and autophagy. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 3263–3282. [[CrossRef](#)]
85. Eckschlager, T.; Plch, J.; Stiborova, M.; Hrabeta, J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1414. [[CrossRef](#)]





## Les protéines ING2 et ING3 : identification de nouvelles fonctions et implication en cancérologie

**Mots clés :** ING2 – ING3 –suppresseur de tumeur – oncogène – mitochondrie

**Résumé :** Les protéines ING2 et ING3 sont des protéines suppressives de tumeurs appartenant à la famille des INGs (INhibitor of Growth). Cette famille comprend cinq membres, dont les rôles suppresseurs de tumeur sont de mieux en mieux décrits depuis leur découverte. Le travail de ma thèse a porté sur l'identification de nouvelles fonctions pour les protéines ING2 et ING3. Le premier axe de recherche était centré sur la compréhension du rôle de la protéine ING2 dans le compartiment mitochondrial. Nous avons démontré que la protéine ING2 était importée dans la fraction interne de la mitochondrie et que le système d'import par relais de ponts disulfures était impliqué. Nous avons identifié une interaction entre ING2 et TFAM en relation avec l'ADN mitochondrial. La perte de l'expression d'ING2 modifie l'ultrastructure mitochondriale et protège les cellules tumorales d'une inhibition de la phosphorylation oxydative. En conséquence, nous proposons une nouvelle fonction suppressive de tumeur « gatekeeper » pour ING2, en lien avec l'adaptation métabolique de la cellule tumorale.

Le deuxième axe de mon travail s'est concentré sur l'établissement du statut d'expression d'ING2 dans les cancers bronchiques. Nous avons pu démontrer l'importance pronostique de l'expression de la protéine ING2 dans les différents compartiments cellulaires. Puis nous avons démontré que la perte d'expression de ING2 entraînait une sensibilité à l'inhibition de WEE1. Nos résultats suggèrent l'existence d'un contrôle transcriptionnel de ING2 sur la protéine CHK1, activateur principal de la kinase WEE1. Nous établissons donc pour la première fois l'existence d'une vulnérabilité thérapeutique dépendante de l'expression d'une protéine ING dans un modèle tumoral. Le dernier axe de ma thèse s'articulait autour de la meilleure compréhension du rôle de ING3 dans le contexte spécifique du cancer prostatique. Nos travaux confèrent un rôle oncogénique à la protéine ING3 dont l'origine est liée au contrôle d'un réseau transcriptionnel complexe intéressant des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la réponse aux androgènes. Ainsi, nous proposons de modifier le nom de la protéine ING3 au profit de l'appellation « INducer of Growth 3 ».

## ING2 and ING3 proteins: identification of new functions and implication in oncology

**Keywords :** ING2 – ING3 – tumor suppressor – oncogene – mitochondria

**Abstract :** ING2 and ING3 are tumor suppressor proteins belonging to the ING (INhibitor of Growth) family. Tumor suppressor roles have been extensively described since the discovery of its five different members. My thesis focused on the identification of new functions for ING2 and ING3 proteins. The first objective was to understand the role of ING2 protein in the mitochondrial compartment. We demonstrated that ING2 protein is imported into the internal mitochondrial fraction, and that the disulfide relay system was involved in this process. We identified an interaction between ING2 and TFAM in relation with mitochondrial DNA. Loss of ING2 expression alters the mitochondrial ultrastructure, and protects tumor cells from oxidative phosphorylation inhibition. We proposed a new « gatekeeper » tumor suppressive function for ING2, in connection with the metabolic adaptation of tumor cells.

The second part of my work was dedicated to the description of ING2 expression status in lung cancer. We demonstrated the prognosis significance of ING2 expression in the different cell compartments. We then shown that loss of ING2 expression resulted in susceptibility to WEE1 inhibition. Our results suggest a transcriptional control of ING2 on the CHK1 protein, main activator of WEE1 kinase. We therefore establish for the first time a therapeutic vulnerability dependent on the expression of an ING protein in a tumor model. The last objective of my thesis was to explore the role of ING3 in the specific context of prostate cancer. Our results confers a new oncogenic role for ING3. Its origin is due to a complex transcriptional network dependant on ING3, involving genes that regulates the cell cycle and the response to androgens. We therefore propose to modify the initial name of the ING3 protein in favor of "INducer of Growth 3".