

Université de Montréal

**Rôle de la signalisation par ERK et de la sénescence  
cellulaire dans la progression du cancer pancréatique**

Par

Marie-Camille Rowell

Département de Biochimie et médecine moléculaire, Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.) en  
biochimie, option Génétique moléculaire

Juillet 2022

© Marie-Camille Rowell, 2022

Université de Montréal  
Département de Biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

---

*Cette thèse intitulée*

**Rôle de la signalisation par ERK et de la sénescence cellulaire dans la  
progression du cancer pancréatique**

*Présentée par*

Marie-Camille Rowell

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

Dr. Nikolaus Heveker

Président-rapporteur

Dr. Gerardo Ferbeyre

Directeur de recherche

Dr. Éric Lécuyer

Membre du jury

Dr. François-Michel Boisvert

Examineur externe

Dre. Anne-Marie Mes-Masson

Représentante du doyen

## Résumé

Le cancer du pancréas est la quatrième cause de décès par cancer au Canada. Avec des mutations activatrices de KRas présentes dans près de 90% des lésions bénignes et tumeurs, ce cancer arbore une activation de la voie MAPK très tôt dans son développement. Or, peu de littérature existe sur les étapes clés de la progression et sur le rôle précis de cette signalisation dans le passage des lésions bénignes (PanIN) au stade avancé (PDAC). Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse aux kinases ERK1/2, actives en aval de Ras, des acteurs centraux du programme de sénescence cellulaire, soit un programme antitumoral intrinsèque aux cellules. L'hypothèse centrale des présents travaux est donc que les mutations de KRas acquises dès le stade PanIN induisent une sénescence qui agit comme barrière à la progression tumorale, et que l'atténuation du signal de ERK est impliquée dans le contournement de ce mécanisme.

La première partie de cette thèse montrera donc les avancées que nous avons faites sur la caractérisation de la progression entre le stade bénin et le stade avancé, de laquelle l'acquisition d'un caractère souche, la transition épithélio-mésenchymateuse et le développement d'une dépendance mitochondriale semblent être des déterminants. Ensuite, nous présenterons nos découvertes sur le rôle des kinases ERK1/2, de la sénescence cellulaire et du stress nucléolaire dans une nouvelle approche visant à restaurer un mécanisme de suppression tumorale inspiré des lésions bénignes et impliquant une altération de la biogenèse ribosomique. Finalement, pour bonifier cette nouvelle stratégie, nous présenterons les résultats d'un criblage CRISPR-Cas9 génome-entier nous ayant permis d'identifier les composantes d'une stratégie « one-two punch » basée sur l'induction de sénescence dans les cellules PDAC combinée à l'inhibition de la Glutathion peroxydase 4 (GPX4), de façon à promouvoir une sénolyse efficace dans ce contexte.

Dans leur ensemble, les travaux présentés dans cette thèse montrent un avancement significatif dans la compréhension de la biologie des cancers pancréatiques en identifiant à la fois des vulnérabilités intrinsèques et inductibles afin de générer de nouvelles idées thérapeutiques pour ce cancer hautement fatal.

Mots clés : Sénescence, ERK, Cancer du pancréas, CRISPR-Cas9, Biogénèse des ribosomes, RAF1, FOLFIRINOX, Mitochondrie, Metformine, Cellule souche cancéreuse.

## Abstract

Pancreatic cancer is the fourth leading cause of death by cancer in Canada. With frequent activating mutations in KRas in up to 90% of benign lesions and tumors, this cancer possesses an early activation of the MAPK pathway. However, key events of its progression from the PanIN stage to the PDAC stage and the precise role of MAPK signaling in it are still poorly understood.

For many years, our laboratory has taken interest in the ERK1/2 signaling pathway, activated downstream of oncogenic Ras and a key mediator of cellular senescence. Cellular senescence is considered an intrinsic antitumor mechanism due to its ability to stably halt the cell cycle. The central hypothesis of this work is then that KRas mutations that are acquired at the PanIN stage induce cellular senescence which acts as a barrier against tumor development. Still, this powerful mechanism can be circumvented as cells tend to attenuate the ERK1/2 signaling to promote progression and acquisition of more aggressive features.

Thus, the first part of this thesis will present our most recent advances in characterizing the progression events between PanIN and PDAC stages, during which stem cell features acquisition, epithelial-mesenchymal transition and mitochondrial dependency seem to occur. Next, we will present our discoveries regarding the implication of ERK1/2 kinases, cellular senescence and nucleolar stress in a new approach to restore a tumor suppression mechanism inspired by the PanIN stage and based on ribosome biogenesis alteration. Finally, to potentiate this strategy, we will show the results of a genome-wide CRISPR-Cas9 screen that identified the components of a “one-two punch” approach to induce cellular senescence in PDAC cells and to efficiently eliminate them by GPX4 inhibitors-mediated senolysis.

Globally, the work presented in this thesis show significant progress in the field of pancreatic cancer, identifying previously unknown vulnerabilities of those cancer cells and paving the way for the development of new therapeutic combinations.

Keywords: Senescence, ERK, Pancreatic cancer, CRISPR-Cas9, Ribosome biogenesis, RAF1, FOLFIRINOX, Mitochondria, Metformin, Cancer stem cell.



# Table des matières

Résumé .....	3
Abstract .....	4
Table des matières .....	5
Liste des tableaux .....	9
Liste des figures .....	10
Liste des sigles et abréviations .....	13
Remerciements .....	32
1. Introduction.....	40
1.1. Avant-propos.....	40
1.2. Le point de départ de ces travaux : le pancréas .....	41
1.3. L'adénocarcinome canalaire pancréatique.....	42
1.3.1. Progression histologique.....	42
1.3.2. Facteurs de risque et altérations géniques.....	43
1.3.3. Classifications basées sur les signatures moléculaires et l'EMT.....	45
1.3.4. Spécificités métaboliques et dépendance à l'oncogène KRAS.....	47
1.4. La voie des kinases ERK1/2 en aval de l'oncogène RAS .....	52
1.4.1. La voie RTK/RAS/MAPK.....	52
1.4.2. Cibles de la voie canonique ERK1/2 .....	54
1.4.3. Régulation des kinases ERK1/2 : localisation et rétrocontrôles .....	56
1.4.4. Inhibiteurs de la voie ERK/MAPK contre le cancer du pancréas.....	59
1.4.5. Fonctions antitumorales de la voie ERK1/2 .....	60
1.5. La sénescence cellulaire.....	63
1.5.1. Définition générale et modes d'induction.....	63
1.5.2. Arrêt du cycle cellulaire, voies p53/p21 <sup>CIP</sup> et p16 <sup>INK4a</sup> /RB.....	65
1.5.3. Dommages à l'ADN .....	67
1.5.4. Altérations métaboliques et sécrétome .....	68

1.5.5.	Phénotypes nucléaires, profil transcriptionnel, synthèse et dégradation protéique .....	70
1.5.6.	Défauts de biogénèse ribosomique associés à la sénescence .....	73
1.5.6.1.	Biogénèse des ribosomes .....	73
1.5.6.2.	Régulation de la biogénèse ribosomique .....	76
1.5.6.3.	Stress nucléolaire et sénescence.....	79
1.5.7.	Résistance à l'apoptose et approches sénotherapeutiques .....	81
1.6.	Avenues thérapeutiques dans le traitement du cancer du pancréas .....	83
1.7.	Problématique et objectif de la thèse .....	86
2.	Le contournement de la sénescence est associé à des propriétés des cellules souches et à une sensibilité à la metformine. ....	90
2.1.	Mise en contexte de l'article 1 .....	91
2.2.	Contribution à l'article 1 .....	92
2.3.	Article 1 .....	93
2.3.1.	Abstract .....	94
2.3.2.	Introduction.....	94
2.3.3.	Results.....	95
2.3.3.1.	The transition from PanIN to PDAC involves acquisition of stem cell and epithelial-mesenchymal transition gene expression modules.....	95
2.3.3.2.	Mouse and human cells that circumvent OIS express stemness genes.....	100
2.3.3.3.	Bypass from senescence is associated with the emergence of cells with stemness properties .....	103
2.3.3.4.	Pancreatic cancer cells show increased mitochondrial machinery .....	105
2.3.3.5.	Metformin targets reprogrammed pancreatic cancer cells.....	107
2.3.4.	Discussion .....	110
2.3.4.1.	The transition from PanIN .....	111
2.3.5.	Materials and methods .....	113
2.3.6.	Acknowledgments.....	115
2.3.7.	Supplemental material .....	115
2.3.7.1.	Supplementary results.....	115
2.3.7.2.	Supplementary experimental procedures .....	124

3. Cibler la biogénèse ribosomique renforce la sénescence induite par ERK dans le cancer pancréatique .....	134
3.1. Mise en contexte de l'article 2 .....	135
3.2. Contribution à l'article 2 .....	136
3.3. Article 2 .....	137
3.3.1. Abstract .....	138
3.3.2. Introduction .....	139
3.3.3. Results .....	140
3.3.3.1. Downregulation of ERK signaling correlates with progression of human and mouse pancreatic cancer .....	140
3.3.3.2. Restoring high ERK signaling induces senescence in pancreatic cancer cells .....	141
3.3.3.3. ERK dependent tumor suppression is associated to changes in the nucleolar phosphoproteome and nucleolar stress .....	142
3.3.3.4. Drugs targeting rRNA biogenesis improve the senescence response in pancreatic cancer cells.    144	
3.3.3.5. FOLFIRINOX mimics Ras-induced senescence signaling in pancreatic cancer cells           145	
3.3.4. Discussion .....	145
3.3.5. Materials and methods .....	146
3.3.6. Competing interest statement .....	153
3.3.7. Acknowledgments .....	153
3.3.8. Main figures and legends .....	156
3.3.9. Supplemental Material .....	170
3.3.9.1. List of supplemental material .....	170
3.3.9.2. Supplemental methods .....	170
3.3.9.3. Supplementary results .....	176
4. Un criblage CRISPR-Cas9 génome-entier permet l'identification des vulnérabilités des cellules cancéreuses pancréatiques sénescents pour promouvoir la sénolyse .....	185
4.1. Mise en contexte de l'article 3 .....	186

4.2.	Contribution à l'article 3 .....	187
4.3.	Article .....	188
4.3.1.	Abstract .....	189
4.3.2.	Introduction.....	190
4.3.3.	Results.....	191
4.3.3.1.	Vulnerable pathways revealed by CRISPR-Cas9 screening in senescent pancreatic cancer cells .....	191
4.3.3.2.	GPX4 inactivation cooperates with RAF induction to block PDAC cells proliferation and induce ferroptosis.....	193
4.3.3.3.	GPX4 inhibition promotes senolysis and prevents escape in FOLFIRINOX-induced senescence of PDAC cells .....	195
4.3.4.	Discussion.....	196
4.3.5.	Material and methods.....	198
4.3.6.	Competing interest statement.....	205
4.3.7.	Acknowledgements.....	205
4.3.8.	Main figures and legends .....	207
4.3.9.	Supplemental material .....	216
4.3.9.1.	List of Supplemental Material .....	216
4.3.9.2.	Supplemental figures and legends .....	218
5.	Discussion générale .....	223
5.1.	Limites de nos modèles cellulaires et génétiques pour étudier la sénescence <i>in vitro</i> 223	
5.2.	Lien entre mitochondries, cellules souches et métabolisme des PDAC .....	228
5.3.	Comment l'activation de ERK permet la sénescence des cellules cancéreuses pancréatiques : hypothèses sur le nucléole .....	232
5.4.	FOLFIRINOX, ERK et sénescence .....	245
6.	Conclusion .....	248
7.	Bibliographie.....	250

**Liste des tableaux**

**Table 1.1. Primers used for qPCR analyses..... 132**  
**Table 2.1 Primers and shRNAs sequences ..... 175**  
**Table 3.1. Primers sequences for cloning, next-generation sequencing, and qPCR. ....217**

## Liste des figures

Figure 1.1. Macro et micro-anatomie du pancréas. ....	42
Figure 1.2. Principales mutations retrouvées dans les lésions précancéreuses et leur étape d'apparition.....	45
Figure 1.3. Principales adaptations métaboliques des cellules cancéreuses pancréatiques...48	
Figure 1.4. Voie de signalisation RAS/MAPK canonique et voies parallèles.....	53
Figure 1.5. Régulateurs négatifs et inhibiteurs pharmacologiques de la voie RAS/ERK.....	58
Figure 1.6. Effet de l'amplitude la signalisation par ERK sur la réponse cellulaire.....	62
Figure 1.7. Inducteurs de sénescence cellulaire.....	64
Figure 1.8. Caractéristiques des cellules sénescents.....	69
Figure 1.9. Vue simplifiée de la biogénèse des ribosomes.....	74
Figure 1.10. Facteurs régulant la synthèse des ARNr par l'ARN polymérase I. ....	76
Figure 1.11. Altérations morphologiques du nucléole en présence de stress nucléolaire. ....	79
Figure 1.12. Vue résumée des travaux présentés dans la thèse.....	89
Figure 2.1. Establishment of an in vitro model of pancreatic cancer progression.....	97
Figure 2.2. Stemness gene expression pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma cells...99	
Figure 2.3. Ras-transformed mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and human primary cells show a reprogrammed gene expression profile associated with dedifferentiation.....	102
Figure 2.4. A subpopulation of cells that bypass senescence have a behavior of cancer stem cells.....	104
Figure 2.5. Increased mitochondrial gene expression in pancreatic cancer cells.....	106
Figure 2.6. Pretreatment with metformin reduces the ability of AH375 pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells to form tumor spheres. ....	109
Figure 2.7. (Fig. S1) Senescence markers of in 1497 PanIN cells in comparison with AH375 PDAC cells. ....	116
Figure 2.8. (Fig. S2) The transition from PanIN to PDAC involves acquisition of stem cell and EMT gene expression modules.....	118
Figure 2.9. (Fig. S3) Ras-induced transformation of mouse embryonic fibroblasts and human primary cells expressing low ERK levels. ....	120

<b>Figure 2.10. (Fig. S4) Stem cell properties of AH7375 cells.</b> .....	121
<b>Figure 2.11. (Fig. S5) Metformin targets reprogrammed pancreatic cancer cells.</b> .....	122
<b>Figure 2.12. (Fig. S6) Effects of metformin on gene expression.</b> .....	123
<b>Figure 3.1. Decreased p-ERK levels correlate with progression of human pancreatic cancer.</b> .....	156
<b>Figure 3.2. Decreased p-ERK levels correlate with tumor initiation in a KRas-driven mouse model of pancreatic cancer.</b> .....	158
<b>Figure 3.3. Reactivation of ERK signaling in PDAC induces a senescent-like phenotype in an ERK-dependent manner.</b> .....	160
<b>Figure 3.4. Phosphoproteomics of Panc-1 cells under high ERK signaling reveal changes associated with nucleolar stress.</b> .....	162
<b>Figure 3.5. ERK-induced senescence is linked to nucleolar stress and senescence-associated nucleolar foci (SANF) formation.</b> .....	164
<b>Figure 3.6. Nucleolar stressors and ERK activation cooperate to arrest the proliferation of pancreatic cancer cells and to promote structural changes in the nucleolus.</b> .....	166
<b>Figure 3.7. FOLFIRINOX efficiently restores high ERK signaling and features of senescence to promote tumor suppression in PDAC cells.</b> .....	168
<b>Figure 3.8. (Fig. S1) Scoring key for human and mouse tissues stained by immunochemistry against p-ERK.</b> .....	176
<b>Figure 3.9. (Fig. S2) Additional characterization of cell lines used in this study.</b> .....	177
<b>Figure 3.10. (Fig. S3) ERK hyperactivation in various PDAC cell lines induces a senescent-like phenotype.</b> .....	178
<b>Figure 3.11. (Fig. S4) ERK activation slows tumor growth in a xenograft model of pancreatic cancer.</b> .....	180
<b>Figure 3.12. (Fig. S5) Knockdown of the RNA polymerase I associated factor TCOF1 induces senescence in pancreatic cancer cells.</b> .....	181
<b>Figure 3.13. (Fig. S6) SANF are a new marker associated with nucleolar stress in oncogene-induced senescence.</b> .....	182
<b>Figure 3.14. (Fig. S7) Characterization of FOLFIRINOX-induced senescence in KP-4 pancreatic cancer cells.</b> .....	183

<b>Figure 4.1. A whole-genome CRISPR-Cas9 screen identifies vulnerabilities of senescent pancreatic cancer cells. ....</b>	<b>207</b>
<b>Figure 4.2. Pathways analysis reveal multiple targets of interest in ribosome biogenesis. .</b>	<b>209</b>
<b>Figure 4.3. CRISPR-mediated inactivation of GPX4 potentiates the response to RAF-induced senescence by promoting ferroptosis. ....</b>	<b>211</b>
<b>Figure 4.4. Partial deletion of GPX4 in clones promotes death by ferroptosis in senescent pancreatic cancer cells. ....</b>	<b>213</b>
<b>Figure 4.5. GPX4 inhibition promotes senolysis in FOLFIRINOX-induced senescence and prevents resistance. ....</b>	<b>214</b>
<b>Figure 4.6. (Fig. S1) USP5 validation following CRISPR-Cas9 screening.....</b>	<b>218</b>
<b>Figure 4.7. (Fig. S2) GPX4 inactivation is a common vulnerability in an additional senescent cancer cell line, related to Figure 4.3.....</b>	<b>219</b>
<b>Figure 4.8. (Fig. S3) GPX4 inhibition promotes senolysis following therapy-induced senescence in KP-4 cells, related to Figure 4.5. ....</b>	<b>221</b>



## Liste des sigles et abréviations

1,6-HD	<i>1,6-Hexanediol</i>
4OHT	<i>4-hydroxytamoxifène</i>
53BP1	<i>TP53-binding protein 1</i>
5-FU	<i>5-Fluorouracile</i>
5'UTR	<i>Région 5' non-traduite</i>
AACR	<i>American association for cancer research</i>
AC	<i>Acinar cells</i>
ACN	<i>Acetonitrile</i>
Actb	<i>Actine B</i>
ActD	<i>Actinomycine D</i>
ADM	<i>Métaplasie acinaire à canalaire (Acinar-to-ductal metaplasia)</i>
ADN	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
ADNr	<i>ADN ribosomique</i>
AGO2	<i>Argonaute RISC Catalytic component 2</i>
AKT/PKB	<i>Protéine kinase B</i>
AMPK	<i>Kinase activée par l'AMP</i>
Angptl2	<i>Angiopoietin-like 2</i>
ANOVA	<i>Analyse de variance (Analysis of Variance)</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APE1	<i>AP endonuclease 1</i>
APEX2	<i>AP endonuclease 2</i>
A-RAF	<i>v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i>
ARID1A	<i>AT-rich interaction domaine 1A</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ARN pol I	<i>Voir Pol I</i>
ARNm	<i>ARN messenger</i>
ARNp	<i>ARN promoteur</i>
ARNr	<i>ARN ribosomique</i>

ARNt	<i>ARN de transfert</i>
ASB14	<i>Ankyrin-repeat and SOCS box-containing 14</i>
ASF1a	<i>Anti-silencing function 1A Histone Chaperone</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATG	<i>Autophagy related</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	<i>Adénosine triphosphate</i>
ATP6V0C	<i>ATPase H<sup>+</sup> Transporting V0 subunit C</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related</i>
AV	<i>Alvéole</i>
B	<i>Bronchiole</i>
B23	<i>Voir NPM1</i>
BALB/c	<i>Bagg Albino/c mouse strain</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BCL-2	<i>BCL2 apoptosis regulator</i>
BD	<i>Becton Dickinson</i>
BF	<i>Bright field</i>
BP	<i>Biological Process</i>
B-RAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BRCA1/2	<i>Breast cancer susceptibility protein 1/2</i>
BRCT	<i>BRCA1 C-terminus domain</i>
BRF1	<i>RNA polymerase III transcription factor subunit B</i>
C/EBPB	<i>CCAAT-enhancer-binding protein beta</i>
C2cd5	<i>C2 calcium dependant domain containing 5</i>
CAF	<i>Fibroblastes associés au cancer</i>
CARF	<i>Cooperates with ARF protein/ CDKN2A-interacting protein</i>
CASP3	<i>Caspase 3</i>
c-CASP3	<i>Caspase 3 clivée</i>
Ccl	<i>Chemokine with motif C-C ligand</i>
CD36	<i>Antigène CD36</i>

Cdc14b/25	<i>Cell division cycle 14b/25</i>
CDEA	<i>Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux</i>
CDIPT	<i>CDP-diacylglycerol-inositol-3 phosphatidyltransferase</i>
CDK	<i>Kinases dépendantes des cyclines</i>
CDKN1A	<i>Inhibiteur 1A des kinases dépendantes des cyclines (CDK inhibitor 1A), protéine p21</i>
CDKN1B	<i>Inhibiteur 1B des kinases dépendantes des cyclines (CDK inhibitor 1B), protéine p27</i>
CDKN2A	<i>Inhibiteur 2A des kinases dépendantes des cyclines (CDK inhibitor 2A), protéine p16</i>
CDKN2B	<i>Inhibiteur 2B des kinases dépendantes des cyclines (CDK inhibitor 2B), protéine p15</i>
CDS	<i>Séquence codante</i>
CENP-A	<i>Protéine centromérique A</i>
c-FOS	<i>Finkel-Biskis-Jinkins murine osteogenic sarcoma virus</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i>
CHD4	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 4</i>
CHK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CHO	<i>Cellules ovariennes de hamster chinois</i>
CHUM	<i>Centre hospitalier de l'Université de Montréal</i>
CI	<i>Confidence interval</i>
CIBC	<i>Banque Canadienne Impériale de Commerce</i>
CIHR	<i>Instituts de recherche en santé du Canada (Canadian Institutes for Health Research)</i>
CK2	<i>Caséine kinase 2</i>
Cldn1	<i>Claudin 1</i>
CMT	<i>Center for Molecular Therapeutics</i>
CNoB	<i>CRM1 Nucleolar Bodies</i>

COX	<i>Cyclooxygénase</i>
CPEB1	<i>Cytoplasmic Polyadenylation Element-Binding protein 1</i>
CPM	<i>Comptes par million</i>
CPT	<i>Camptothécine</i>
C-RAF	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
CRBN	<i>Cereblon</i>
CRCHUM	<i>Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal</i>
Cre	<i>Recombinase Cre</i>
CREB	<i>CAMP responsive element binding protein</i>
CRISPR-Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR associated protein 9</i>
CRM1	<i>Chromosomal maintenance 1 (Exportin 1)</i>
CSB	<i>Cockayne syndrome protein B</i>
CSC	<i>Cellule souche cancéreuse</i>
CTL (CTRL)	<i>Control</i>
CXCL	<i>Chimiokine de la famille CXCL</i>
D	<i>Normal duct</i>
DAB	<i>Di-amine benzidine</i>
DAMP	<i>Patrons moléculaires associés aux dommages (Damage-associated molecular patterns)</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DCP1A	<i>Decapping mRNA 1A</i>
DDR	<i>Voie de réponse aux dommages à l'ADN (DNA damage response)</i>
DDX21/5	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 21 or 5</i>
DFC	<i>Composante fibrillaire dense</i>
DIRE	<i>Distant Regulatory Elements of Co-regulated genes</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Diméthylsulfoxyde</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>

DNA-SCARS	<i>DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence</i>
DNMT1	<i>ADN méthyltransférase 1</i>
dNTP	<i>Désoxyribonucléotide triphosphate</i>
dTMP	<i>Désoxytymidine monophosphate</i>
dUMP	<i>Désoxyuridine monophosphate</i>
DUSP	<i>Phosphatase à double-spécificité</i>
DUT	<i>Désoxyuridine triphosphatase</i>
dUTP	<i>Désoxyuridine triphosphate</i>
E1A	<i>Adenovirus early region 1A</i>
E2F	<i>E2 promoter binding factor</i>
EBP2	<i>EBNA1 binding protein 2</i>
(EBNA1BP2)	
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Facteur de croissance épidermique</i>
EGFP	<i>Enhanced GFP (voir GFP)</i>
EGFR	<i>Récepteur au facteur de croissance épidermique</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
ELDA	<i>Extreme limiting dilution assay</i>
ELK-1	<i>ETS-containing factor ELK-1</i>
EMT	<i>Transition épithélio-mésenchymateuse</i>
ENO1	<i>Énolase 1</i>
eNoSC	<i>Complexe silencieux du nucléole dépendant de l'énergie (energy-dependent nucleolar silencing complex)</i>
ER	<i>Récepteur à l'œstrogène</i>
ERK	<i>Kinase régulée par les signaux extracellulaires (Extracellular-signal regulated kinase)</i>
ES	<i>Enrichment score</i>
ESC	<i>Cellule souche embryonnaire</i>

EtOH	<i>Éthanol</i>
ETS	<i>ETS family of transcription factors</i>
ETS	<i>Espaceur transcrit externe</i>
ETV5	<i>ETS variant transcription factor 5</i>
EU	<i>Éthynyl-uridine</i>
F	<i>FOLFIRINOX</i>
F.L.	<i>Pleine longueur (Full length)</i>
FA	<i>Formic acid</i>
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fam214b	<i>Family with sequence similarity 214 Member B</i>
FBL	<i>Fibrillarine</i>
FC	<i>Centre fibrillaire</i>
FC	<i>Fold change</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FdUMP	<i>Fluoro-désoxyuridine monophosphate</i>
FER-1	<i>Ferrostatine-1</i>
FGF	<i>Facteur de croissance fibroblastique</i>
FOLFIRINOX	<i>Combinaison d'acide FOLinique, 5-Fluorouracile, IRINotécan et Oxaliplatin</i>
Foxn1	<i>Forkhead box N1</i>
FRA1	<i>Fos-related antigen 1</i>
FRQS	<i>Fonds de recherche Québec - Santé</i>
G9a	<i>Euchromatic histone lysine methyltransferase 2</i>
GAP	<i>Protéine activatrice des GTPases</i>
GAPDH	<i>Glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase</i>
GATA6	<i>GATA-binding protein 6</i>
GC	<i>Composante granulaire</i>
GCSH	<i>Glycine cleavage system protein H</i>
gDNA	<i>ADN génomique</i>
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>

GeCKOv2	<i>Genome-wide CRISPR Knock-Out library version 2</i>
GEF	<i>Facteur d'échange de nucléotide guanine</i>
GEMM	<i>Genetically engineered mouse model</i>
GEO	<i>Gene expression omnibus</i>
GFP	<i>Protéine fluorescente verte</i>
GLDC	<i>Glycine décarboxylase</i>
GLUL	<i>Glutamate-ammonia ligase</i>
GLUT1	<i>Glucose transporter 1</i>
GNAS	<i>Guanine nucleotide binding protein G alpha stimulating</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
GOT1	<i>Glutamate-oxaloacétate transaminase 1</i>
GPX4	<i>Glutathione peroxydase 4</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
H&E	<i>Hematoxylin &amp; eosin</i>
H2A.X	<i>Histone variant H2A.X</i>
H3K27me3	<i>Lysine 27 de l'histone H3 triméthylée</i>
H3K9me3	<i>Lysine 9 de l'histone H3 triméthylée</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCD	<i>Higher-energy collisional dissociation</i>
HDAC	<i>Histone désacétylase</i>
HDM2	<i>Human double minute 2</i>
hEGF	<i>Voir EGF (humain)</i>
HEK293	<i>Lignée de rein embryonnaire humain 293</i>
HEK293T	<i>Lignée de rein embryonnaire humain 293 avec antigène grand T</i>
HILPDA	<i>Hypoxia inducible lipid droplet associated</i>
HIRA	<i>Histone repressor A</i>
HMBS	<i>Hydroxymethylbilane synthase</i>
HMEC	<i>Human mammary epithelial cells</i>

HMG	<i>High mobility group</i>
HMG-14	<i>High mobility group nucleosome binding domain 1</i>
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i>
HP1	<i>Heterochromatin protein 1</i>
HPNE	<i>Cellules épithéliales pancréatiques humaines normales (Human pancreatic normal epithelial cells)</i>
HRAS	<i>Harvey Rat Sarcoma Oncogene</i>
HRP	<i>Peroxydase de Raifort (Horseradish peroxydase)</i>
hRRN3	<i>Voir TIF-IA</i>
Hs	<i>Homo sapiens</i>
hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>
HT-KAM	<i>High-Throughput Kinase Activity Mapping</i>
HT-PAM	<i>High-Throughput Phosphatase Activity Mapping</i>
IC50	<i>Concentration inhibitrice à 50%</i>
IDRC	<i>International development research center</i>
IEG	<i>Immediate-early genes</i>
IF	<i>Immunofluorescence</i>
Igfbp4	<i>Insulin-like growth factor binding protein 4</i>
IHC	<i>Immunohistochimie</i>
IL	<i>Interleukine</i>
INB	<i>Corps intranucléolaires (Intranucleolar bodies)</i>
IPMN	<i>Néoplasmes intracanalaires papillaires et mucineux</i>
IQGAP1	<i>IQ motif containing GTPase Activating Protein 1</i>
IRB	<i>Institutional Review Board</i>
IRBC	<i>Point de contrôle de la ribogénèse altérée (Impaired ribosome biogenesis checkpoint)</i>
IRCM	<i>Institut de recherches cliniques de Montréal</i>
ITGB6	<i>Intégrine bêta 6</i>
ITS	<i>Espaceur transcrit interne</i>



I $\kappa$ Ba	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Jun	<i>Jun proto-oncogene</i>
Kb	<i>Kilobase</i>
KDM6A	<i>Lysine déméthylase 6A</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Kras	<i>Kirsten Rat Sarcoma oncogene</i>
KSR	<i>Kinase suppressor of Ras</i>
Ku70/80	<i>X-ray repair cross-complementing protein 6 (Ku70) or 5 (Ku80)</i>
LAD	<i>Domaines associés à la lamina</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LKB1	<i>Liver kinase B1 (STK11)</i>
LLPS	<i>Séparation de phase liquide-liquide</i>
Log	<i>Logarithme</i>
L-OHP	<i>Oxaliplatin</i>
LoNA	<i>Nucleolar-specific long non-coding RNA</i>
LONP1	<i>Lon protéase 1</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LSL	<i>Lox-Stop-Lox</i>
LSU	<i>Large subunit</i>
MacroH2A	<i>Histone, variant Macro H2A</i>
MAF1	<i>MAF1 homolog, negative regulator of RNA polymerase III</i>
MAP2K	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK)</i>
MAP3K	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK)</i>
MAPK	<i>Kinase activée par les mitogènes (Mitogen activated protein kinase)</i>
MAPKAPK	<i>MAPK-activated protein kinase</i>
MAX	<i>MYC associated factor X</i>
MCL-1	<i>MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member</i>
MCM3/6/7	<i>Minichromosome maintenance complex component 3/6/7</i>

MCN	<i>Néoplasmes kystiques mucineux</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MCT1/4	<i>Monocarboxylic acid transporter 1/4</i>
MDC1	<i>Mediator of damage checkpoint 1</i>
MDH1	<i>Malate déshydrogénase 1</i>
Mdm2	<i>Mouse double minute 2</i>
ME1	<i>Enzyme malique 1</i>
MEF	<i>Fibroblastes embryonnaires de souris</i>
MEGM	<i>Mammary Epithelial Cell Growth Medium</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MET	<i>Transition mésenchymale vers épithéliale</i>
Méthyle-THF	<i>Méthyle-tétrahydrofolate</i>
MiDAS	<i>Mitochondrial dysfunction associated senescence</i>
MIT	<i>Massachusetts's Institute of Technology</i>
MITF	<i>Melanocyte inducing transcription factor</i>
MKK4	<i>JNK-activating kinase 1 (MAP2K4)</i>
MKK7	<i>JNK-activating kinase 2 (MAP2K7)</i>
MKP	<i>Phosphatase de MAP kinase</i>
MLL1	<i>Lysine méthyltransférase 2A</i>
Mm	<i>Mus musculus</i>
MMP	<i>Métalloprotéinase matricielle</i>
MNK	<i>MAPK-interacting Serine/Threonine kinase</i>
MOI	<i>Multipllicité d'infection</i>
MS	<i>Mouse stroma</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MSK	<i>Nuclear Mitogen- and Stress-activated protein kinase</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of Rapamycin kinase</i>
mTORC1	<i>mTOR complex 1</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MYBBP1A	<i>Myb-binding protein 1A</i>

MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
nab-paclitaxel	<i>Nanoparticle albumin-bound paclitaxel</i>
NAC	<i>N-acétylcystéine</i>
NAD+	<i>Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé</i>
NADH	<i>Nicotinamide adénine dinucléotide réduit</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit</i>
NAMPT	<i>Nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>
NBS1	<i>Nibrin 1</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
ND	<i>Not detectable</i>
NDF	<i>Nucleolus-derived foci</i>
NEB	<i>New England Biolabs</i>
Nec-1	<i>Nécrostatine-1</i>
NES	<i>Normalized enrichment score</i>
NF1	<i>Neurofibromine 1</i>
NF-KB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
NLS	<i>Signal de localisation nucléaire</i>
NM	<i>Nucléométhyline</i>
NOC2L	<i>Nucleolar complex associated 2 homolog</i>
NOLC1	<i>Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1</i>
NOR	<i>Région organisatrice du nucléole</i>
NoRC	<i>Complexe remodeleur du nucléole</i>
NPM1	<i>Nucléophosmine 1</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS oncogene</i>
NS	<i>Not significant</i>
NS	<i>Nucleostemin</i>

NTS	<i>Signal de translocation nucléaire</i>
NuRD	<i>Nucleosome remodeling and deacetylase complex</i>
OD	<i>Optical density</i>
OIS	<i>Sénescence induite par les oncogènes</i>
p110	<i>Sous-unité catalytique de PI3K</i>
p14ARF	<i>p14 Alternative reading frame</i>
p15INK4b	<i>Voir CDKN2B</i>
p16INK4A	<i>Voir CDKN2A</i>
p21	<i>Voir CDKN1A</i>
p21CIP	<i>Voir CDKN1A</i>
p27KIP	<i>Voir CDKN1B</i>
p38	<i>Mitogen-activated protein kinase p38</i>
p53	<i>Voir TP53</i>
PA28 $\gamma$	<i>Proteasome activator complex subunit 3 (PSME3)</i>
PAF53/49	<i>Polymerase I associated factor 53/49</i>
PALB2	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PanIN	<i>Néoplasie intraépithéliale du pancréas (Pancreatic intraepithelial neoplasia)</i>
PAPAS	<i>Promoter and pre-rRNA antisense long non-coding RNA</i>
PARP	<i>Polymérase de poly-ADP-ribose</i>
PBS	<i>Tampon phosphate salin (Phosphate buffered saline)</i>
PC	<i>Pancreatic cancer</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Amplification en chaîne par polymérase</i>
PDAC	<i>Adénocarcinome canalaire pancréatique (Pancreatic ductal adenocarcinoma)</i>
PDGF	<i>Facteur de croissance dérivé des plaquettes</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependant kinase-1</i>
PDX	<i>Patient-derived xenograft</i>
PDX1	<i>Pancreatic and Duodenal Homeobox 1</i>
PEA-15	<i>Proliferation and apoptosis adaptor protein 15</i>

PES1	<i>Pescadillo 1</i>
PFA	<i>Paraformaldéhyde</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-3-kinase</i>
PIC	<i>Complexe de pré-initiation</i>
PKCdelta	<i>Protéine kinase C delta</i>
Plk3	<i>Polo-like kinase 3</i>
Plxna3	<i>Plexin A3</i>
PML	<i>Promyelocytic leukemia protein</i>
PNB	<i>Prenucleolar bodies</i>
PoI I	<i>ARN polymérase I</i>
PP1	<i>Protein phosphatase 1</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
PPM1G	<i>Protein Phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> Dependent 1G</i>
PRIDE	<i>Proteomic Identification Database EMBL-EBI</i>
PROTAC	<i>PROteolysis TArgeting Chimeras</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
qPCR	<i>PCR quantitatif</i>
R	<i>Ras</i>
RAF1	<i>Voir C-RAF</i>
RAF-ER	<i>Fusion du domaine C-terminal de RAF1 au domaine de liaison au ligand du récepteur à l'œstrogène</i>
Ral	<i>Ras-like protein</i>
RalGDS	<i>Ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>
Raptor	<i>Regulatory associated protein of mTOR complex 1</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RasGRP	<i>RAS guanyl releasing protein</i>
RB	<i>Retinoblastoma protein</i>
RBBP5	<i>Retinoblastoma binding protein 5</i>
RBM10	<i>RNA binding motif protein 10</i>

RCPG	<i>Récepteur couplé aux protéines G</i>
RelA	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A</i>
RFC1	<i>Replication factor C subunit 1</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RKIP	<i>RAF kinase inhibitory protein</i>
RMA	<i>Robust Multiarray Average Algorithm</i>
RON	<i>Macrophage-stimulating protein receptor</i>
ROS	<i>Espèce réactives de l'oxygène</i>
RPA12	<i>RNA polymerase I subunit A12.2</i>
RPA194	<i>RNA polymerase I subunit A, 194 kDa</i>
RPL	<i>Protéine ribosomique de la grande sous-unité</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RPS	<i>Protéine ribosomique de la petite sous-unité</i>
rRNA	<i>ARN ribosomique</i>
RSK	<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>
RSL1D1	<i>Ribosomal L1 domain containing 1</i>
RSL3	<i>Ras-synthetic lethal compound 3</i>
RTK	<i>Récepteur à activité tyrosine kinase</i>
RT-qPCR	<i>PCR quantitative en temps réel</i>
S	<i>Spleen</i>
S6K1	<i>Ribosomal protein S6 kinase 1</i>
SA-B-Gal	<i>Activité Beta-galactosidase associée à la sénescence</i>
SAHF	<i>Foci d'hétérochromatine associés à la sénescence</i>
SAMMSON	<i>Survival associated mitochondrial melanoma specific oncogenic non-coding RNA</i>
SANF	<i>Foci nucléolaire associés à la sénescence</i>
SAPD	<i>Dégradation protéique associée à la sénescence</i>
SAPK	<i>Protéines kinases activées par le stress</i>
SARD	<i>Défauts de ribogénèse associés à la sénescence</i>
SASP	<i>Phénotype sécrétoire associé à la sénescence</i>

SCH	<i>SCH772984 (Inhibiteur de ERK)</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS-PAGE	<i>Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SERPINB4	<i>Protéase à sérine de la famille B, membre 4</i>
SETDB1	<i>Set domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1</i>
SF2/ASF (SRSF1)	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 1</i>
SF3B1	<i>Splicing factor 3B subunit 1</i>
sgARN/sgRNA	<i>Petit ARN guide</i>
shARN/shRNA	<i>Petit ARN en épingle à cheveux (Short hairpin RNA)</i>
shCTR	<i>shARN Contrôle</i>
SHMT2	<i>Serine hydroxymethyltransferase 2</i>
shNTC	<i>Voir shCTR (Non-targeting shRNA)</i>
SIN3B	<i>SIN3 transcription regulator family member B</i>
Sir2p	<i>Silent information regulator 2 protein (S. cerevisiae, homolog to human SIRT1)</i>
SIRT	<i>Sirtuine</i>
SL1	<i>Facteur de sélectivité 1</i>
SLC7A11	<i>Solute carrier family 7 member 11</i>
SLERT	<i>(snoRNA)-ended long noncoding RNA (lncRNA) that enhances pre-rRNA transcription</i>
SMAD4	<i>Mother against decapentaplegic homolog 4</i>
Snai1	<i>Snail family transcriptional repressor 1</i>
SNF2H	<i>SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 5</i>
snoARN	<i>Petit ARN nucléolaire</i>
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoprotein</i>

Sos1	<i>Son of Sevenless homolog 1</i>
SP1	<i>Transcription factor Sp1</i>
Sparc	<i>Secreted protein acidic and cysteine rich</i>
SPATA5	<i>Spermatogenesis associated 5</i>
SPRED1	<i>Sprouty-related protein with EVH-1</i>
Spry2	<i>Sprouty 2</i>
SRF	<i>Facteur de réponse au sérum</i>
SSU	<i>Small subunit</i>
STAT3/5	<i>Signal transducer and activator of transcription 3/5</i>
STING	<i>Stimulator of interferon response CGAMP Interactor</i>
STK11	<i>Sérine-Thréonine kinase 11 (LKB1)</i>
SUV39H1	<i>Suppressor of variegation 39 homolog 1</i>
SWI/SNF	<i>SWItch/Sucrose Non-Fermentable subfamily of ATP-dependant chromatin remodeling complex</i>
SYK	<i>Spleen-associated tyrosine kinase</i>
T	<i>Tumor</i>
Tam	<i>Tamoxifen</i>
TBP	<i>Tata-binding protein</i>
TBS-T	<i>Tampon Tris salin avec Tween 20 (Tris buffered saline with Tween 20)</i>
TCA	<i>Cycle des acides tricarboxyliques</i>
TCEP	<i>Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride</i>
TCF	<i>Ternary complex factor</i>
TCOF1	<i>Treacher-Collins associated factor 1</i>
TEAD2	<i>TEA domaine transcription factor 2</i>
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TF	<i>Transcription factor</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
TGF-B	<i>Tumor growth factor beta</i>
TIF-IA	<i>RNA polymerase I transcription initiation factor IA</i>
TIP5	<i>Bromodomain Adjacent to Zinc Finger Domain 2A</i>



TIS	<i>Sénescence induite par la thérapie</i>
TNF $\alpha$	<i>Facteur de nécrose tumorale alpha</i>
TOMM70A	<i>Translocase de la membrane externe mitochondriale 70A</i>
TOP mRNA	<i>ARN messenger à séquence oligopyrimidine</i>
TOPBP1	<i>Topoisomerase (DNA) II binding protein 1</i>
TopoI	<i>Topoisomérase I</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
Trdmt1	<i>tRNA aspartic acid methyltransferase 1</i>
TrypLE	<i>Trypsine-like enzyme</i>
TS	<i>Thymidylate synthase</i>
TSC2	<i>Tuberous Sclerosis protein 2</i>
Tspan13	<i>Tetraspanin 13</i>
TSS	<i>Site de départ de la transcription (Transcription start site)</i>
TTF1	<i>Facteur de terminaison de la transcription 1</i>
Tukey HSD	<i>Tukey (Honest significant difference) statistical test</i>
U2AF1	<i>U2 Small nuclear RNA Auxiliary factor 1</i>
U3 snoRNP	<i>Petite particule nucléolaire ribonucléoprotéique U3</i>
UBF	<i>Upstream binding factor</i>
UdeM	<i>Université de Montréal</i>
URBC-NARILIS	<i>Unité de recherche en biologie cellulaire - Namur Research Institute for Life Science</i>
U2AF65	<i>U2 snRNA auxiliary factor 65 kDa subunit</i>
USP5	<i>Ubiquitin-specific peptidase 5</i>
UTP	<i>U-three (U3) protein</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
V	<i>Vecteur ou véhicule</i>
VEGF	<i>Facteur de croissance endothélial vasculaire</i>
Veh	<i>Véhicule</i>
Vim	<i>Vimentine</i>
WDR74	<i>WD-repeat protein 74</i>

WNT	<i>Wingless type</i>
WT	<i>Type sauvage (Wild type)</i>
XRCC4	<i>X-Ray Repair Cross Complementing 4</i>
XRN2	<i>5'-3' exoribonucléase 2</i>
YAP1	<i>Yes-associated protein 1</i>
yH2A.X	<i>Histone variant H2A.X phospho-Ser 139</i>
ZNF185	<i>Zinc finger protein 185</i>
ZNRD1	<i>Zinc ribbon domain containing 1 (voir RPA12)</i>
Z-VAD	<i>Z-VAD-FMK (inhibiteur d'apoptose)</i>

Notes importantes :

- 1- Le préfixe *p-* ou *phospho-* devant le nom d'une protéine dénote son statut phosphorylé (e.g. p-H3 S10: Histone H3 phosphorylée en sérine 10).
- 2- Le préfixe *sh* devant le nom d'un gène dénote l'utilisation d'un petit ARN en épingle à cheveux (shARN) contre ce gène (e.g. shERK, shARN ciblant ERK), tandis que le préfixe *sg* dénote l'utilisation d'un petit ARN guide CRISPR contre le gène en question (e.g. sgGPX4: petit ARN guide ciblant GPX4).
- 3- Les mutations d'un gène sont indiquées en exposant de celui-ci (e.g. KRas<sup>G12D</sup>, où la glycine 12 est remplacée par l'acide aspartique; ou encore RAS<sup>V12</sup> où la position 12 est mutée pour une valine).
- 4- De façon générale, l'utilisation de minuscules dans le nom d'un gène désigne la forme de souris, tandis que l'utilisation de majuscules dénote la forme humaine ou le gène en général indépendamment de son origine.

*Aux membres du labo Ferbeyre, pour avoir  
stimulé ma curiosité scientifique et l'envie de  
la recherche*

*À ma famille et Stéphane, mes racines et mes  
ailes, qui m'ont donné la force de persévérer*

*À mes collègues du Collège de Rosemont, qui  
m'ont portée pendant les derniers kilomètres  
de ce marathon*

## Remerciements

J'adresserai mes premiers remerciements à Gerardo, mon directeur de thèse. Gerardo, quand je vous ai choisi pour mon doctorat, je l'ai fait car j'ai reconnu plusieurs valeurs dans votre façon de travailler et de gérer votre laboratoire que je partage. J'y ai vu la rigueur et l'intégrité, mais aussi la passion et la recherche du dépassement de soi. J'ai vu un leader positif qui encourage ses étudiants et qui les amène à donner le meilleur d'eux-mêmes. J'ai vu quelqu'un qui m'aiderait à atteindre les objectifs multiples que j'avais en tête pour mon doctorat, soit apprendre la biochimie et me développer comme étudiante-chercheuse, m'épanouir dans l'enseignement et dans la communauté départementale, m'ouvrir des portes pour faire un stage à l'étranger et pour présenter mes résultats dans des congrès internationaux, puis me permettre de grandir en tant que personne. Et tout ça s'est concrétisé grâce à votre présence et votre support. Merci de m'avoir montré à maintes reprises votre confiance envers moi, en me laissant diriger mon projet vers ce qui m'intéressait, en me permettant de prendre en charge le déménagement et la gestion de plusieurs facettes du nouveau laboratoire au CRCHUM, en me laissant la latitude nécessaire pour compléter en même temps que mon doctorat mon microprogramme en enseignement, ou encore en me confiant vos étudiants du BCM1531. Merci d'avoir été un modèle pour moi. Peut-être que dans une autre vie, Stéphane et moi aurions suivi vos pas à Véronique et vous, pour devenir une super équipe dans la vie comme au travail... J'avoue qu'on y a souvent pensé!

Chère Véronique... j'ai tellement appris grâce à toi! Si tous les labos avaient une Véro, la recherche avancerait beaucoup plus vite! Tu es la définition même de la compétence, tu as su régler tellement de mes problèmes avec tes connaissances et ta débrouillardise. Souvent, je me prends à penser : « Qu'est-ce que Véro ferait dans une telle situation...? » Merci d'avoir été une maman pour le labo à bien des moments! Mais surtout, tu es une brillante chercheuse et un modèle inspirant pour les femmes en recherche! Merci pour tes enseignements et ta présence!

Emma, ma première superviseuse de stage à vie! Te rappelles-tu, j'étais tellement stressée à ma première journée de stage que j'ai été malade et je l'ai manquée... La première semaine, on a fait des pull-down pendant lesquels j'ai aspiré et jeté toutes les billes... Oups! Puis, tranquillement, en un été, j'ai beaucoup cheminé et appris, grâce à toi! Merci pour ta patience et tes enseignements rigoureux. En plus de m'avoir appris ce que tu savais au labo, tu m'as initiée

aux rudiments de la randonnée, ce que je continuerai certainement à faire! Tu m'as aussi montré que c'était possible d'avoir un super parcours scientifique tout en vivant des expériences riches en parallèle, comme enseigner, faire partie d'un ensemble musical, voyager et profiter de la nature! Te côtoyer m'a certainement fait grandir tant sur le plan scientifique que personnel. Je suis vraiment contente d'avoir pu développer cette belle amitié avec toi avec les années. Merci pour tout!

Benjamin, merci de m'avoir coaché pendant le début de mon doctorat. Tu as été un super pédagogue! Ta patience pour me montrer à travailler avec les souris m'a beaucoup aidée aussi. J'ai eu beaucoup de chance d'être formée au doctorat par quelqu'un d'aussi compétent. Merci pour le temps que tu as investi pour moi, merci de m'avoir inculqué une bonne façon de travailler mais aussi une bonne façon de réfléchir scientifiquement!

Xavier, merci de m'avoir permis de travailler sur un si beau projet qui était le tiens! Tu fais partie de ceux qui, dès mon baccalauréat, ont su déclencher chez moi la passion pour la biochimie, avec ton implication dans les travaux pratiques, tes rétroactions pertinentes, tes midi-conférences super intéressants et ta défense de thèse exemplaire qui lançait le début de mon aventure au labo Ferbeyre! Merci aussi pour le conseil que tu m'as donné quand j'ai débuté mon doc, tu t'en rappelles? Il m'a suivi tout au long de mon doctorat!

Ana, ma camarade depuis le tout début! Nous avons partagé tellement de moments mémorables, à stresser ensemble au « décollage » de l'ultracentrifugeuse, à s'entraider au labo, à visiter Boston ensemble, à goûter les meilleurs mets à Athènes et à Malaga, à faire la fête avec l'association étudiante ou au ICSA Montréal! Sans toi, le labo aurait certainement été moins animé (et moins bien rangé aussi, je dois avouer). Félicitations pour ton doctorat, pour toutes tes ceintures de karaté, et pour ta persévérance avec le projet ASB14! On a partagé des années extraordinaires ensemble et saches qu'il y aura toujours un foyer prêt à t'accueillir quand tu seras de passage à Montréal!

Paloma, quel plaisir ça a été de partager ces années avec toi! J'ai eu le privilège de te montrer un peu de ce que je savais, à ton arrivée au labo, et en retour tu as su renforcer mon intérêt pour l'enseignement à tellement de reprises! Tu as une personnalité sans pareil, ta gentillesse, ta générosité et ta grandeur d'âme sont inspirantes! Notre amitié est très précieuse pour moi! Se

Ricardo e tu decidirem ficar em Québec, sera um prazer para nossos futuros filhos crescerem juntos! Obrigada para todos! Beijinhos!

Fred, ces quelques années à te côtoyer ont mené à bien des apprentissages! Merci de m'avoir donné la piquêre de la biogénèse des ribosomes, d'avoir paranoïé avec moi en mettant au point les Northern, et d'avoir réussi à trouver des bandes encourageantes sur mes films de western blot peu prometteurs! Tu as été un modèle de rigueur, de persévérance et de sagesse. Continue à transmettre autour de toi ta passion pour la recherche et à raconter tes mêmes vieilles blagues et histoires, ça fait de toi la personne incroyable que tu es!

Lian, merci pour ces supers moments partagés au labo et en dehors. Tu as une personnalité incroyable et tu m'impressionnes, autant par la qualité de ton travail scientifique que par tes mille autres talents (de trapéziste, de randonneuse, et +). Tes labmeetings express vont me manquer, tout comme la belle complicité qu'on a eu pendant ces années! J'ai déjà hâte à nos prochains hikes!

Camille, ma petite sœur du labo! J'ai beaucoup aimé le temps passé avec toi au labo et dans nos sorties de groupes, à discuter de la vie, en ayant les mêmes références de la Rive-Sud, et en disant souvent la même chose en même temps. Tellement de beaux moments! Merci d'avoir étiré un peu tes heures de lunch pour qu'on ait le temps de jaser quand je venais faire de la microscopie à l'UdeM! J'espère qu'on gardera notre belle amitié et notre complicité! Je te souhaite bon succès dans ta carrière en conseil génétique! Tu seras excellente, comme dans tout ce que tu entreprends!

Maxime, j'ai aimé travailler sur le projet metformine avec toi pendant ces années. Ça nous a fait de super (longues) discussions riches et passionnantes sur le métabolisme des PDAC! Je garderai de bons souvenirs de notre congrès AACR à Chicago, de nos dumplings dans Chinatown et de ces bières partagées (dont les excellentes que tu avais toi-même brassées!). Je te souhaite le meilleur pour la suite!

Sebastian, ta progression au labo avec les années est impressionnante! Tu as travaillé très fort et je suis certaine que tu pourras en récolter les fruits sous peu! Je te souhaite que tes articles puissent t'offrir la carrière que tu poursuis. Si jamais tu cherchais d'autres projets, je suis certaine que tes connaissances sur toutes les techniques de labo te permettraient de lancer une toute nouvelle

version du Sambrook (Igelmann?)! Tes questions pertinentes au labmeeting et au labo sur mon projet m'ont bien aidé à progresser et je t'en remercie!

Youssef, mon premier stagiaire... Je ne sais pas pour toi, mais moi j'ai eu beaucoup de fun pendant cet été de stage! Tu étais curieux, volontaire, souriant et motivé! Tu nous as bien ramené les pieds sur Terre avec ton commentaire (maintenant célèbre!) en voyant les travaux de Fred : « Tout ça pour une flèche? ». Tu sais que pendant cet été de stage, si on avait eu un bon anticorps pour la Pol I, on aurait fait ensemble la plus grande découverte de mon doc !? C'est venu plus tard finalement, mais la piste qu'on avait explorée ensemble était pourtant la bonne! Merci pour ce super été et d'avoir été un stagiaire extra!

Geneviève, Mariana, Neylen, merci pour les années partagées ensemble, de mon stage à ces années de mon doctorat. Vous avez été de super modèles pour moi! Gen, tellement efficace... on arrivait le matin au labo et tu étais déjà en train de faire ton transfert de protéines. Je vais me rappeler de tes expressions légendaires (e.g. bactos!). Mariana, so generous and kind! Thanks for your patience showing me how to do the IHC, the competent bacteria, and many more techniques. Thanks for all the love too! Neylen, super scientifique et party girl! Merci de m'avoir montré de belles techniques comme les purifs de ribosome et pour les belles soirées de karaoké et de danse avec l'asso et le labo! J'espère que la vie vous redonnera à toutes les trois tout ce que vous m'avez apporté et plus!

Jordan, la relève du labo! Merci pour toutes les séances de brainstorming sur mon projet, pour ta contribution intellectuelle et technique dans celui-ci, et pour tous les bons moments passés entre amis. Je suis contente que tu nous aies choisi comme labo d'accueil, saches que ta présence et ton aura sont stimulantes pour chacun de nous. Je te souhaite de grands succès dans ton post-doctorat et dans ta carrière!

Tony, c'était super de te côtoyer au labo! Tu as été un excellent « partner » de bactos compétentes! Conserve ta bonne humeur, ton humour, et ta conviction qu'on va trouver un remède au vieillissement! Avec toute cette énergie positive, je suis certaine que tu feras de grandes choses!

Rose, thanks for listening to me when I was lacking courage for my PhD and for sharing a bit of your PhD-life experience. Thanks for our nice wedding discussions and shopping trip. I wish

you good luck with your project and career; I give you approximately 23 years to find a good remedy for menopause! Et courage avec l'apprentissage du français, tu vas y arriver, j'en suis sûre!

Bianca, l'autre relève du labo! On est entre bonnes mains! Merci pour ces moments partagés, pique-niques et camping, et plus. Je te souhaite beaucoup de succès pour ta maîtrise et de belles aventures avec le labo Ferbeyre!

Merci à Guillaume, Audrey, Andreea et tout le labo Schmitzer! Nos collaborations ont été une expérience vraiment enrichissante pendant mon doctorat. Vous êtes tous impressionnants par votre capacité à maîtriser tous ces détails de chimie et de biochimie à la fois! Avoir su plus tôt que je me dirigerais vers l'enseignement de la chimie, je serais venue passer plus de temps dans votre labo! Merci pour tous les bons moments!

J'aimerais remercier également les membres de l'association étudiante de biochimie pour les super activités que vous avez et qu'on a co-organisées! Samuel, Julien, Alix, Max, Fadi, Émilie, Dom, Lionel, Yulemi, Jacob, Nassim, ... et tous ceux du labo Ferbeyre, on en a eu de belles soirées! Le chalet de ski à l'Aubergine, le chalet d'été à Sainte-Agathe, les soirées Bière et Smoke Meat, les Fêtes des Papiers, les barbecues (merci spécial au chef Seb!), les déjeuners, les karaokés, les partys de Noël et d'Halloween, etc... Des souvenirs incroyables!

Merci à Audrey Noël... Audrey, merci pour ton support constant et pour ton apport immense à la vie départementale. Grâce à toi, j'ai eu de très belles années comme auxiliaire d'enseignement et comme doctorante au département de biochimie.

Un merci spécial aussi à Philippe Lampron... Phil, tu as été important dans mon parcours en biochimie, depuis mon cégep à mon doctorat! Au départ, je t'avais contacté pour des protocoles d'isolation d'ADN quand je faisais mon projet intégrateur de cégep... et tu as réussi à me convaincre de rester pour un doctorat en biochimie! Et ça décrit assez bien la personne que tu es, je trouve, soit quelqu'un dont la passion et la bonne humeur sont contagieuses, une personne super impliquée dans la vie de programme et de département qui nous donne envie de faire de même, bref un leader positif et bienveillant! Merci pour tes conseils, ta confiance et tes encouragements, ils m'ont portée pendant ce long parcours!



Merci à Nikolaus, pour la confiance et les bons moments passés en BCM3513. En quatre ans, cette expérience de co-enseignement a fait grandir mon intérêt pour l'enseignement et a forgé ma confiance en mes capacités. Merci d'avoir soutenu cet apprentissage de ma part et d'avoir été un modèle pour moi. On a fait un bon duo!

Merci à tous les membres des labos Desgroseillers, Chartrand et Roy, pour les équipements, les réactifs au fil des années, l'entraide et la camaraderie les soirs et les fins de semaine au 5<sup>ème</sup> étage. Ça a été précieux!

Merci à Christian Trahan et au labo Oeffinger à l'IRCM pour m'avoir enseigné à faire des Northern Blot presque aussi beaux que les tiens, Christian!

Merci aux labos Routy, Grandvaux, Stagg, Rodier, Bourgeois-Daigneault, Parker et plus, pour l'accueil au CRCHUM! On a pris un peu de temps pour faire notre deuil du changement d'Institut et la pandémie n'a pas aidé les choses... Mais j'espère que lorsque la vie sociale du CRCHUM reprendra pour vrai, nous pourrons continuer à forger des liens entre nos labos en créant l'environnement chaleureux qui nous porte tous dans nos doctorats, même entre ces murs blancs de bâtiment tout neuf.

Un merci spécial à des motivateurs sans pareil, Robert à l'UdeM et Constantin au CRCHUM. Vous ne réalisez probablement pas toute l'importance que vous avez au quotidien dans nos vies de doctorants... Vous êtes des soleils dans nos journées, et vous nous donnez le courage de faire ce qu'on fait! Merci!

Merci à tous les autres pour le soutien technique et administratif, à l'UdeM : Ginette, Monique, Nicolas, Louise, Benoît, Élane, Lorraine, Kathie, Pascale; au CRCHUM : Jessica, Daniel, Marie-Claude, Karine, et tous les autres. Ça a toujours été un grand plaisir de vous côtoyer!

Many thanks also to Nabeel and all the Bardeesy lab members! Thank you Nabeel for the warm welcome and for providing so many occasions for me to learn through the labmeetings, journal clubs, seminars, discussions and to let me attend the meeting in Cape Cod. My internship in Boston was such an incredible life experience! Special thanks to Filippas for your mentoring, your patience, and your kindness! Thank you, Krishna, and Yasutaka, for teaching me how to do organoid models. Thank you, Vu, for showing me how the PDXs were done. Many thanks to

Krushna for the scientific advice and all the life lessons. Merci à Iulia pour la camaraderie et les occasions de luncher ensemble et de s'entraider en français! Thanks to all of you for including me in the 5K run for pancreatic cancer and all the practices. This event has been meaningful for the pursuit of my PhD. I will keep great memories of this summer with you all!

Merci aux membres de mon comité de thèse, Dr. Moreau et Dr. Meloche. Vos commentaires critiques mais bienveillants m'ont grandement aidée à progresser scientifiquement, à gérer mes priorités, et à explorer de nouvelles avenues.

Merci à mes parents, Madeleine et Vincent, et ma sœur Justine. Votre support et votre amour inconditionnel m'ont soutenue à toutes les étapes de ce cheminement. À chaque fois que j'avais du mal à voir la lumière, vous étiez là pour me redonner du courage et trouver de nouvelles solutions pour moi. Vous avez toujours été des modèles de sagesse, d'intelligence, de générosité, de persévérance et d'engagement. Je suis fière des valeurs que vous m'avez transmises, elles m'ont bien servie pendant ce cheminement. Ce diplôme est le vôtre aussi. Je vous aime très fort!

Merci aussi à mes beaux-parents, Trindade et Gil, pour votre soutien constant. Cette relation que nous avons bâtie ensemble ces dernières années est très précieuse pour moi, et vos attentions constantes ont contribué à ma réussite bien au-delà de ce que vous pouvez imaginer. Merci pour tout!

À Stéphane, mon collègue... Please, essaie de ne pas casser le CHUM quand je serai partie! Sans blague, je suis vraiment heureuse d'avoir pu travailler dans le même labo que toi pendant toutes ces années! Merci pour ces années stimulantes intellectuellement et pour ta solidarité même dans les moments difficiles. Ton esprit scientifique m'a toujours impressionnée, depuis le bac où tu étais le seul de ta cohorte à lire (et comprendre!) des articles scientifiques pour le plaisir. Je me surprends encore quand tu places tout naturellement dans tes conversations : « Avez-vous vu l'article sorti aujourd'hui dans *Nature* sur ... [n'importe quel sujet incroyable qui n'a même pas de lien avec ton PhD] ? ». Tu es une machine à idées scientifiques, tu as une grande maîtrise autant des détails moléculaires que des aspects physiologiques de tes projets (et de ceux des autres...), tu arrives à gérer 4000 projets en même temps, tu es rigoureux, honnête, résilient et passionné! Je n'ai aucun doute qu'une brillante carrière t'attend, et j'espère pouvoir continuer à être un témoin privilégié de toutes tes belles réussites. À Stéphane, mon fiancé, merci d'être la plus

belle chose qui soit arrivée dans ma vie. Grâce à toi, je m'épanouis dans toutes les sphères de ma vie. Tu es mon roc (mon pic, mon cap...), tu es mon port, ma famille à moi. Je t'aime... même (surtout?) quand tu es... so weird!

# 1. Introduction

## 1.1. Avant-propos

Au Canada, le cancer est la première cause de décès, devant les maladies du cœur, les accidents et les maladies cérébrovasculaires (1). Les statistiques nationales sur le cancer estiment qu'un Canadien sur deux développera un cancer au cours de sa vie, tandis qu'un sur quatre en décèdera (2). Il s'agit donc d'une maladie qui nous touche tous, de près ou de loin. Malgré les efforts de recherche biomédicale qui ont permis de prolonger l'espérance de vie post-diagnostic pour plusieurs cancers, notamment certains cancers du sein et de la prostate; pour d'autres cancers, il semble toujours s'agir d'une fatalité. Le cancer du pancréas en est un bon exemple. Il est difficile à détecter tôt dû à son emplacement rétro-péritonéal et provoque des symptômes trop vagues pour l'identifier. Généralement associé au vieillissement, c'est un cancer qui évolue lentement depuis le stade bénin, mais dont le diagnostic est rarement possible avant le stade avancé. Toutefois, lorsqu'il atteint le stade malin, sa progression est fulgurante, de sorte que le nombre de décès annuels par cancer du pancréas est presque égal au nombre de diagnostics et que la survie médiane des patients diagnostiqués n'est que de 4-6 mois. La biologie du cancer du pancréas et son microenvironnement singulier le rendent aussi particulièrement réfractaire aux traitements de chimio-, radio-, voire d'immunothérapie. En bref, ce qui fonctionne cliniquement pour d'autres cancers ne fonctionne que rarement contre le cancer du pancréas. Ces caractéristiques font de lui un objet de recherche important, complexe, et captivant.

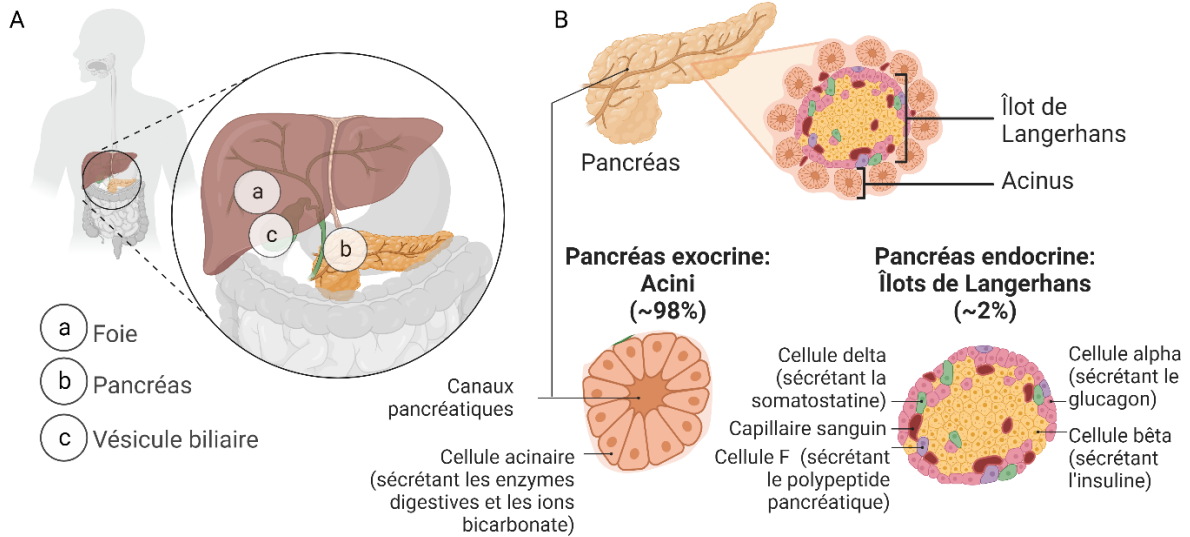
Dans ce premier chapitre, nous ferons un survol de l'état des connaissances issues de la recherche sur le cancer pancréatique, en décrivant les mutations qui mènent à son développement et comment celles-ci influencent son métabolisme et sa différenciation. Nous mettrons l'accent sur les événements moléculaires impliqués dans la progression du cancer pancréatique depuis le stade bénin, où la sénescence cellulaire agit comme barrière à la progression tumorale. Nous décrirons également l'importance de la signalisation par les kinases ERK1/2 dans ce phénotype sénescence, de même que l'implication du stress nucléolaire et des altérations de la biogénèse ribosomique dans la sénescence. Puis, il sera question des thérapies actuelles ou potentielles pour le traitement du cancer pancréatique, à la suite de quoi, s'enchaîneront dans les chapitres

subséquents, les travaux effectués durant ma thèse et ayant permis de faire avancer les connaissances sur chacun de ces aspects.

## **1.2. Le point de départ de ces travaux : le pancréas**

Le pancréas est un organe du système digestif. Il s'agit d'une glande avec d'une part, des cellules endocrines regroupées au sein des îlots de Langerhans, capables de sécréter diverses hormones dans la circulation sanguine (3). Parmi celles-ci, les cellules bêta sécrètent l'insuline pour diminuer la glycémie et les cellules alpha sécrètent le glucagon pour augmenter la glycémie (3). Les cellules delta quant à elles sécrètent la somatostatine qui régule la sécrétion de l'insuline et du glucagon par les cellules voisines, tandis que les cellules epsilon sécrètent la ghréline, une hormone stimulant l'appétit (3). La portion endocrine du pancréas représente seulement 1-2% de la masse de celui-ci et se trouve impliquée dans les désordres affectant la glycémie comme le diabète de type I (3). Les tumeurs qui tirent leur origine des cellules endocrines représentent moins de 5% des cancers pancréatiques et sont relativement faciles à diagnostiquer car elles sont très symptomatiques puisqu'elles impliquent une hypersécrétion d'une des hormones pancréatiques (4). Ces tumeurs sont aussi généralement peu invasives (4).

D'autre part, la portion exocrine du pancréas, formée d'un système d'acini produisant des sucs digestifs et d'un réseau de canaux dans lesquels se déversent ces enzymes, représente la majorité de la masse du pancréas (**Figure 1.1**) (5). Les cellules acinaires sécrètent notamment l'amylase pancréatique, la lipase pancréatique et diverses protéases, ces enzymes étant impliquées respectivement dans la digestion des sucres, des lipides et des protéines (5). Les sucs pancréatiques contiennent également des ions bicarbonates qui rendent le pH alcalin, ce qui permet, une fois le mélange déversé dans la portion de l'intestin à la sortie de l'estomac, soit le duodénum, de neutraliser le contenu arrivant de l'estomac et de favoriser la digestion (5). La plupart des cancers pancréatiques tirent leur origine des cellules exocrines. Deux principaux types de cancers peuvent émerger de ces cellules, soit les néoplasmes kystiques mucineux (MCN) (6) et l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) qui représente la forme la plus courante, avec environ 90% des cas, et aussi la plus agressive. Les travaux présentés dans cette thèse portent sur les cancers pancréatiques de type PDAC, et c'est à ceux-ci que nous référerons par l'appellation cancer du pancréas pour la suite sauf si mentionné autrement.



**Figure 1.1. Macro et micro-anatomie du pancréas.**

A) Le pancréas est une glande du système digestif qui est positionnée de façon rétro-péritonéale, sous l'estomac. B) Portions exocrine et endocrine du pancréas, incluant la structure d'un acinus et d'un îlot de Langherans. Le cancer pancréatique origine des cellules acinaires qui se redifférencient en cellules canalaire et progressent jusqu'à la formation d'un adénocarcinome canalaire pancréatique. Figure réalisée avec BioRender.

## 1.3. L'adénocarcinome canalaire pancréatique

### 1.3.1. Progression histologique

La plupart des cancers pancréatiques suivent une évolution similaire au niveau tissulaire. Ils émergent des cellules exocrines acinaires qui effectuent une métaplasie en cellules canalaire. Pour ce faire, les cellules acinaires se dédifférencient (7) puis acquièrent de nouvelles propriétés de cellules canalaire dans un processus nommé ADM (acinar-ductal-metaplasia). Puis, ces nouvelles cellules canalaire vont envahir la lumière du canal dans un processus à plusieurs étapes. Celles-ci se nomment PanIN-1 à PanIN-3, soit des néoplasmes intraépithéliaux du pancréas (PanIN) de stade 1 à 3 (8). Les stades PanIN-1A, 1B et 2 sont considérés comme des lésions bénignes, et peuvent rester durant plus d'une décennie chez un patient sans progresser. Le stade PanIN-3 évolue quant à lui le plus fréquemment vers le stade avancé: l'adénocarcinome canalaire pancréatique. Histologiquement, on peut reconnaître les lésions PanIN-1 par l'apparence allongée des cellules canalaire. Elles adoptent une forme de papille, tandis que les cellules normales ont plutôt l'apparence d'un épithélium cuboïde (9,10). Au stade PanIN-2, les cellules peuvent subir une perte de polarité cellulaire, des anomalies nucléaires et l'on peut observer un empilement multicouche (9,10). Dès le stade PanIN-3, des mitoses sont fréquemment observables en histologie

et les cellules semblent envahir la lumière du canal (9,10). Finalement, le stade PDAC démontre une croissance invasive des cellules cancéreuses ainsi qu'un stroma abondant facilement reconnaissable (9,10). Pour voir des exemples d'images histologiques à chaque stade, voir (9-11).

Alternativement à la progression via les stades PanIN, certaines lésions pré-cancéreuses prennent la forme de néoplasmes intracanaux papillaires et mucineux (IPMN), qui tirent leur origine directement des cellules canaux (12). Bien que menant au même type de cancer, les PDAC, les événements moléculaires qui mènent au développement des IPMN peuvent inclure des mutations activatrices de GNAS ou de KRAS (12), tandis que les PanIN sont majoritairement KRAS-mutants.

Étant donné le caractère foudroyant de l'adénocarcinome canalaire pancréatique et l'agressivité sans parallèle de ces cellules, beaucoup d'efforts ont été investis dans la communauté scientifique pour comprendre leur biologie et identifier leurs vulnérabilités. Ainsi, leur fonctionnement moléculaire sera abordé dans la section suivante, tandis que les avenues thérapeutiques seront discutées à la section 1.6.

### **1.3.2. Facteurs de risque et altérations géniques**

Au niveau de l'étiologie de l'adénocarcinome canalaire pancréatique, il a été observé que l'âge avancé, le tabagisme (13) et la surcharge pondérale (14) constituaient des facteurs de risque, de même que la présence d'une pancréatite chronique (15) ou de diabète (16). De plus, il semble y avoir une composante héréditaire où les antécédents familiaux de cancer du pancréas sont un facteur de risque (17), de même que la transmission d'allèles mutants de BRCA1/2 (18). À l'opposé, être atteint d'allergies semble plutôt protecteur à cet effet (19).

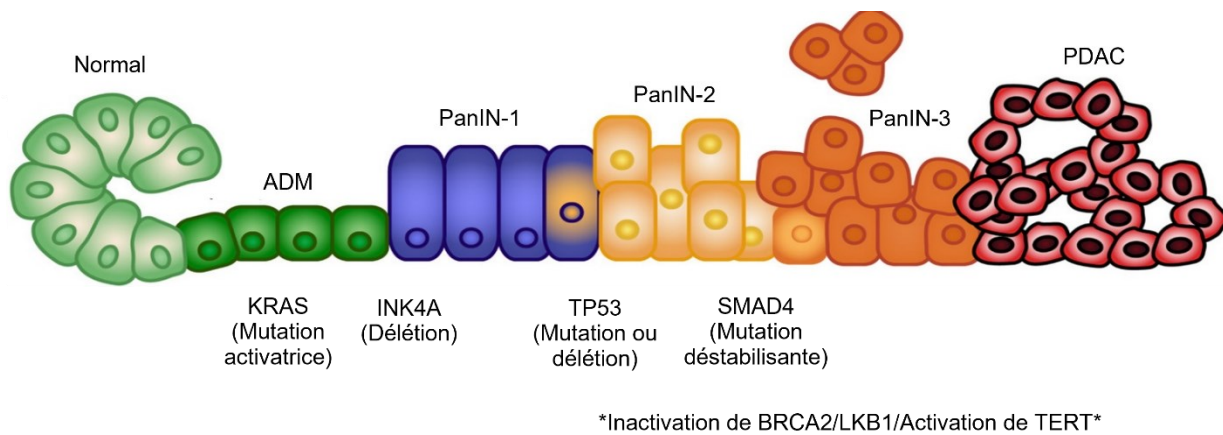
Néanmoins, les modifications géniques sporadiques semblent être la cause majoritaire menant au développement de ce cancer. Les principales incluent les mutations activatrices de l'oncogène KRAS et la délétion ou la mutation inactivatrice des suppresseurs de tumeurs TP53, CDKN2A et SMAD4, altérations retrouvées respectivement dans >90%, ~50-70%, ~20-30% et ~10-30% des tumeurs (20-22). L'activation de la petite GTPase RAS sous toutes ses formes (KRAS, NRAS ou HRAS) est commune à environ 30% de tous les cancers humains. Parmi les voies de signalisation engagées par une activation de RAS, la voie des kinases activées par les

mitogènes (MAPK) dont les acteurs sont RAF/MEK/ERK, et la voie de la kinase de phosphoinositides (PI3K), composée de PI3K/AKT/mTOR, sont les principales. Ensemble, elles permettent de stimuler la prolifération cellulaire indépendamment des signaux mitogéniques, favorisent la survie et la croissance cellulaire, puis permettent le remodelage du métabolisme énergétique de la cellule. Le facteur de transcription p53, quant à lui, est un régulateur clé de l'arrêt du cycle cellulaire, de la réparation de dommages à l'ADN et il permet l'induction de l'apoptose ou de la sénescence en réponse à divers stress. Son inactivation permet aux cellules cancéreuses de résister à la mort cellulaire et d'augmenter leur instabilité génomique menant à l'acquisition de nouvelles mutations oncogéniques. La voie p16/RB régule le point de contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire. Son inactivation permet également de favoriser la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses. Les rôles spécifiques des voies p53/p21 et p16/RB dans la sénescence cellulaire seront discutés plus en détails dans la section 1.5. Finalement, le rôle du transducteur de signal SMAD4 dans les cancers pancréatiques est plus complexe. Bien que la voie TGF- $\beta$  puisse être un médiateur de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et donc de l'invasion, son activité peut également induire une EMT létale (23). Il a toutefois été rapporté que l'inactivation de SMAD4 modifie les cibles transcriptionnelles de la voie TGF- $\beta$ /SMAD2/3/4, évoluant de ses fonctions suppresseurs de tumeurs en présence de SMAD4 à des fonctions pro-métastatiques et pro-prolifératives lors d'une signalisation SMAD4-indépendante (24).

Les mutations de KRAS au codon 12, G12D ou G12V principalement, ont été identifiées les premières (25,26) et sont également présentes dans plus de 90% des lésions précancéreuses du pancréas (27,28). Depuis, des modèles de souris ont permis de confirmer leur implication dans l'étape d'initiation des cancers pancréatiques (29). Grâce au modèle Pdx1-Cre; LSL-Kras<sup>G12D</sup>, l'équipe de Tuveson a montré que l'activation de Kras suffisait à induire la formation de PanIN de différents stades, et que ceux-ci pouvaient occasionnellement évoluer vers le stade PDAC. L'inactivation de p53 (30), p16 (31) ou Smad4 (32) agit plutôt comme un facteur accélérant la progression, et constitue des événements plus tardifs (Figure 1.2). Leur inactivation seule est toutefois insuffisante pour initier la tumorigénèse. En bref, l'attrition des télomères et la mutation activatrice de Kras sont les événements initiateurs de la tumorigénèse, mais sont soupçonnés d'induire d'abord un phénotype de sénescence dans les lésions bénignes, expliquant leur caractère non-prolifératif. Ensuite, l'inactivation de Cdkn2a aiderait au contournement de cette sénescence,



puis les mutations subséquentes de Tp53 et Smad4 alimenteraient rapidement la progression locale, puis invasive.



**Figure 1.2. Principales mutations retrouvées dans les lésions précancéreuses et leur étape d'apparition.**

Figure adaptée de (33). PanIN, Pancreatic intraepithelial neoplasia; PDAC, Pancreatic ductal adenocarcinoma; ADM, Acinar-ductal metaplasia; \*, Altérations tardives et moins fréquentes durant la progression.

D'autres altérations génétiques sont retrouvées de façon moins fréquente dans les cancers pancréatiques, causant notamment l'inactivation du gène STK11/LKB1 (34), un important régulateur du métabolisme et de la polarité cellulaire. Des altérations sont aussi retrouvées dans les voies de réparation de dommages à l'ADN (ATM, BRCA1, BRCA2, PALB2), dans les complexes SWI/SNF remodeleurs de chromatine (ARID1A, KDM6A, etc.), dans des facteurs de maturation/épissage de l'ARN (SF3B1, U2AF1, RBM10) (35) et dans la voie Hippo (YAP1) (36). Une analyse intégrée de l'ensemble des mutations, variations du nombre de copies et autres altérations génomiques a mis en évidence une altération dans 100% des tumeurs PDAC d'au moins une composante de la voie KRAS, du contrôle du cycle cellulaire en phase G1/S, de l'apoptose, et des voies TGF- $\beta$ , WNT/NOTCH et Hedgehog (37).

### 1.3.3. Classifications basées sur les signatures moléculaires et l'EMT

Plusieurs équipes de recherche ont tenté de classifier différentes tumeurs et lignées cellulaires en sous-types sur la base des événements génomiques (38), du paysage épigénomique (39), des caractéristiques histologiques ou métaboliques, pour pouvoir dégager des conclusions en lien avec leur biologie et identifier leurs vulnérabilités. Sur la base des réarrangements du caryotype

menant à différents patrons de mutations, amplifications, délétions et pontage chromosomique, Waddell *et al.* ont fait une classification des tumeurs PDAC en quatre sous-types : stable, réarrangé localement, éparpillé et instable (40). Le sous-type instable, impliquant plus de 200 variations chromosomiques, possède une instabilité génomique plus grande, une plus grande fréquence d'altérations des voies de réparation de dommages à l'ADN (BRCA1/2, PALB2, etc.) et corrèle avec une meilleure sensibilité à des thérapies basées sur l'induction de dommages à l'ADN (inhibiteurs de PARP, dérivés de platine, etc.) (40).

Dans l'étude de Collisson *et al.*, en se basant sur les profils transcriptionnels de tumeurs PDAC, de tissus microdisséqués et de lignées cellulaires, trois sous-types sont définis : classique, quasi-mésenchymal et « exocrine-like » (41). Le sous-type classique exprime GATA6, différents marqueurs épithéliaux, d'adhésion cellulaire, et a un pronostic favorable (41). À l'opposé, le sous-type ayant le plus mauvais pronostic est le quasi-mésenchymal, et celui-ci semble moins dépendant de la signalisation par l'oncogène KRAS (41). Il est intéressant de noter que ces observations ont été validées dans des lignées cellulaires humaines d'intérêt pour nos travaux, notamment les Panc-1 et SW1990 représentant le sous-type quasi-mésenchymal, de même que les HPAC et les HPAF-II représentant le sous-type classique (41). Les lignées de sous-type quasi-mésenchymal étaient peu affectées par la déplétion de KRAS, et par l'inhibiteur d'EGFR erlotinib comparé au sous-type classique, tout en étant plus sensible à la gemcitabine que ce même groupe (41). À l'opposé, d'autres auteurs rapportent une plus grande amplification des allèles mutants de KRAS, conséquence de la tétraploïdie, créant un débalancement par rapport aux allèles WT dans le sous-type basal, similaire au quasi-mésenchymal de Collisson, soit le plus agressif et le plus métastatique (42). Cependant, dans chacun de ces cas, l'activation de voies spécifiques en aval de KRAS n'a pas été étudiée.

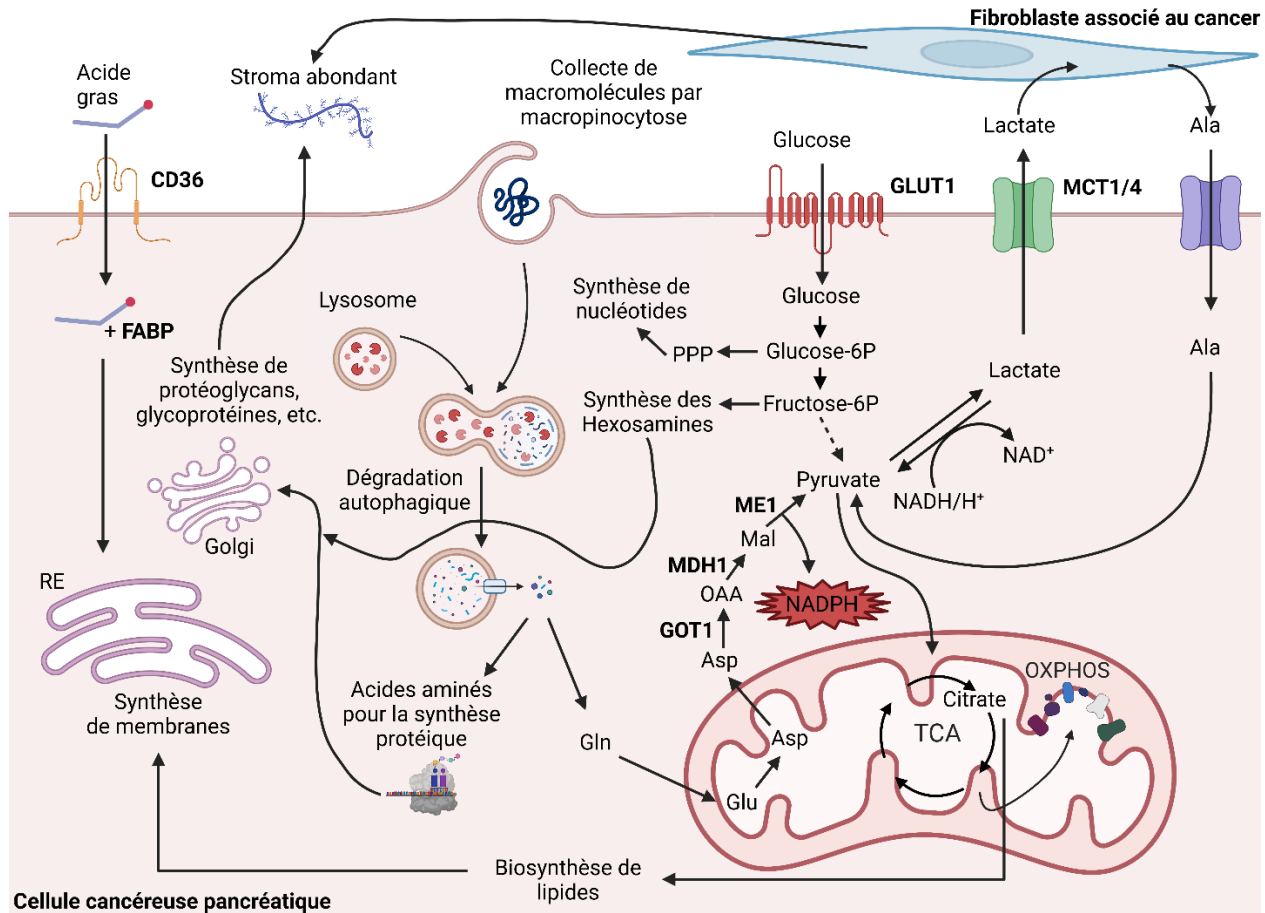
La classification non-supervisée de Dijk *et al.*, utilisant des données de séquençage de l'ARN d'échantillons de patients, définit aussi un sous-type mésenchymal au mauvais pronostic, et y attribue des signatures de cellules souches, d'EMT, de stroma abondant et de signalisation TGF- $\beta$  (43). À l'opposé, le sous-type épithélial selon Dijk, similaire au sous-type classique de Collisson, a une signature métabolique de respiration mitochondriale, et diverses signatures associées aux ribosomes (43). D'autres études mettent en lumière l'hétérogénéité de

caractéristiques au sein d'un même sous-type (42), voire un continuum de phénotypes au sein d'une tumeur (44), révélant toute la complexité de la carcinogénèse *in vivo*.

#### **1.3.4. Spécificités métaboliques et dépendance à l'oncogène KRAS**

Au point de vue métabolique, le cancer pancréatique se démarque des autres types de cancer. Tandis que les tumeurs d'origines autres que le pancréas font généralement la synthèse de leurs propres macromolécules à partir de monomères qu'elles importent, les cellules des tumeurs pancréatiques font différemment. D'une part, leur haut niveau d'autophagie (macroautophagie) leur permet de recycler de nombreux constituants cellulaires (45,46). De plus, elles adoptent un mécanisme atypique pour subvenir à leurs besoins supplémentaires, que l'on nomme « nutrient scavenging », où elles font essentiellement la collecte des macromolécules dans leur microenvironnement, notamment des protéines (47) et des lipides (48,49) (**Figure 1.3**). L'import de lipides, plus précisément d'acides gras, dépend de la surexpression du transporteur CD36 et des protéines FABP, des caractéristiques corrélées à la chimiorésistance des cellules et donc à un mauvais pronostic (50,51). Il est postulé qu'un plus grand import et biosynthèse de lipides aide au renouvellement de lipides membranaires pour soutenir la prolifération, et pourrait densifier les membranes cellulaires permettant de résister à l'entrée des médicaments et à l'effet délétère de l'oxydation des lipides (52).

Également, par un processus nommé macropinocytose, les cellules cancéreuses pancréatiques engloutissent, par le biais de vésicules qui s'invaginent dans la membrane plasmique, les composantes des fluides environnants (47).



**Figure 1.3. Principales adaptations métaboliques des cellules cancéreuses pancréatiques.**

Les cellules cancéreuses pancréatiques collectent les acides gras extracellulaires via CD36 et les utilisent pour des processus anaboliques comme la synthèse de membranes. Par macropinocytose, elles collectent des protéines qui sont dégradées par autophagie pour produire des acides aminés pour la synthèse protéique et de la glutamine qui est utilisée pour la production de NADPH pour les défenses rédox et pour la production de pyruvate. L'import de glucose quant à lui sert la synthèse de nucléotides via la voie des pentoses phosphates ainsi que la formation d'hexosamines qui contribuent à la synthèse ou l'assemblage des glycoprotéines, protéoglycans et autres composants du stroma dense dans la tumeur. Les cellules PDAC coopèrent également avec les fibroblastes associés au cancer à qui ils fournissent du lactate en échange d'alanine, elle-même utilisée dans les cellules cancéreuses pour la production d'énergie via le cycle des acides tricarboxyliques et la respiration cellulaire, et pour la biosynthèse de lipides. FABP, Fatty-acid binding protein; RE, réticulum endoplasmique; PPP, voie des pentoses phosphates; TCA, cycle des acides tricarboxyliques; OXPHOS, phosphorylation oxydative; OAA, oxaloacétate; Mal, malate; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Asp, aspartate; GOT1, glutamate-oxaloacétate transaminase 1; MDH1, malate déshydrogénase 1; ME1, enzyme malique 1; GLUT1, transporteur de glucose 1; MCT1, transporteur d'acides monocarboxyliques 1. Figure réalisée avec BioRender.

Par la suite, leur forte activité lysosomale permet de récupérer les monomères de ces macromolécules, notamment l'acide aminé glutamine, pour les utiliser à nouveau dans des processus anaboliques (53). La glutamine, à titre d'exemple, dont la croissance des PDAC dépend,

est convertie en glutamate. Toutefois, celui-ci ne sert pas à la formation d'alpha-cétoglutarate pour alimenter le cycle des acides tricarboxyliques (TCA), mais est plutôt converti en aspartate, puis en oxaloacétate, malate et pyruvate pour favoriser la synthèse de NADPH et donc les défenses antioxydantes via une voie impliquant GOT1/MDH1/ME1 (54).

De plus, les PDAC font une utilisation particulière d'une autre molécule normalement destinée au catabolisme : le glucose. Les enzymes de la glycolyse, de même que les transporteurs de glucose (GLUT1) et de lactate (MCT1/4) sont généralement surexprimés dans ces cellules. Le glucose, bien que pauvre dans l'environnement hypovascularisé de la tumeur, est récupéré et sert à la fois au catabolisme, mais également à des processus anaboliques. En effet, plutôt que de servir principalement à la production d'ATP par l'effet Warburg via l'excrétion de lactate comme la majorité des tumeurs, le glucose est aussi utilisé à travers la glycolyse puis la voie des pentoses phosphate pour alimenter la synthèse de nucléotides (55,56), ou encore la biosynthèse d'hexosamines permettant l'assemblage de glycoprotéines, protéoglycanes et glycolipides. Cette activité est notamment impliquée dans la sécrétion de composantes de la matrice extracellulaire formant le stroma abondant retrouvé dans les tumeurs pancréatiques. Celui-ci, de même que la faible vascularisation de ces tumeurs, a toutefois pour conséquence de réduire l'accessibilité par le système immunitaire et les traitements.

Les tumeurs pancréatiques constituent généralement un environnement hypoxique, ce qui semble peu favorable à un métabolisme mitochondrial oxydatif. Toutefois, *in vivo*, des couplages ont été observés entre les cellules cancéreuses et les fibroblastes associés aux tumeurs, ou parfois entre différents sous-types de cellules cancéreuses, de façon à accommoder les besoins énergétiques de chacun en fonction des ressources. Les cellules cancéreuses, qui consomment le glucose et sécrètent le lactate, alimentent les fibroblastes qui, à leur tour, sécrètent de l'alanine issue d'une autophagie augmentée (57). L'alanine récupérée par les cellules tumorales sert à alimenter le cycle TCA, la respiration mitochondriale et la biosynthèse de lipides (57). De même, des cellules cancéreuses plus différenciées et glycolytiques peuvent se coupler à des sous-types moins différenciés, et dépendant davantage de la respiration mitochondriale (58). Un caractère souche a également été associé à ces cellules cancéreuses qui utilisaient davantage un métabolisme mitochondrial et les acides gras pour la bêta-oxydation. Finalement, le métabolisme du cholestérol

semble aussi pointer vers plus d'un sous-type de cellules cancéreuses pancréatiques où les plus agressives dépendent de l'import de lipoprotéines de basse densité (59), tandis que les moins agressives font leur propre synthèse de cholestérol (60).

Daemen *et al.* ont tenté de résumer ces phénotypes métaboliques en proposant une classification en sous-types, en se basant sur une analyse des métabolites dans des lignées cellulaires. Cette classification comprend d'une part le sous-type glycolytique, incluant par exemple les lignées KP-4 et SW1990; le sous-type lipogénique, comprenant les lignées Panc-1, HPAC et HPAF-II; et finalement les cellules à prolifération lente (61). De manière cohérente avec un métabolisme mitochondrial augmenté, les lignées lipogéniques avaient également une plus grande abondance de métabolites impliqués dans les défenses rédox comparé aux lignées glycolytiques (61). Les lignées glycolytiques selon Daemen correspondaient au sous-type quasi-mésenchymal de Collisson, tandis que la plupart des lignées lipogéniques (sauf les Panc-1, à titre d'exemple) correspondaient au sous-type classique (41,61).

Plusieurs autres groupes se sont penchés sur la question de la classification métabolique des PDAC, mais une fois de plus, la conclusion est que malgré l'apparence de catégories distinctes, celles-ci coexistent sans doute au sein d'une même tumeur et le passage d'un type à un autre par une même cellule n'est pas exclu (62,63). C'est ce que l'on nomme la plasticité métabolique. La plasticité est une caractéristique générale des cancers et peut être une réponse à la communication entre les cellules d'origines variées coexistant dans une tumeur. Ces cellules qui possèdent une diversité de mutations peuvent donc moduler leur dépendance à leurs oncogènes et réagir aux fluctuations de leur environnement pour rester dans un état optimal pour la croissance et la prolifération (64).

Par exemple, le sous-type glycolytique est davantage associé à une tumeur proliférative. Cependant, l'environnement hypoxique et pauvre en nutriments exerce une pression sélective sur ces cellules et peut également favoriser deux destins. D'une part, il peut s'agir de l'acquisition d'un caractère invasif, où les cellules vont migrer hors de la tumeur primaire vers un microenvironnement plus riche en nutriments; ou encore, les cellules peuvent subir une reprogrammation métabolique et développer des caractéristiques de cellules souches. De façon intéressante, l'utilisation du glucose et de la glutamine par les cellules cancéreuses tel que décrit

ci-avant a été liée à l'activité de KRAS (49,54,56). Inversement, la perte de dépendance à l'oncogène Ras a été associée à la plasticité métabolique, en faveur d'un métabolisme davantage mitochondrial, de même qu'à la dédifférenciation et à l'acquisition de caractéristiques souches (65).

La plupart de ces études ont comparé des cellules normales et des cellules cancéreuses, où la mutation de KRAS était une différence notable entre les deux; ou encore elles ont comparé différentes sous-populations de cellules cancéreuses pancréatiques. Toutefois, peu de littérature existe sur les besoins métaboliques au stade PanIN ou sur le processus de transformation des besoins métaboliques dans la progression du cancer depuis ce stade. Notre contribution à ce champ de connaissances sera présentée dans l'article 1.

Les cellules cancéreuses, tout comme le microenvironnement tumoral, peuvent se modifier pour compenser la perte de signalisation par KRAS (66). Parmi les chercheurs qui ont étudié le phénomène, Singh *et al.* ont rapporté que l'ablation de l'oncogène KRAS affectait la viabilité de seulement certaines lignées cancéreuses pancréatiques (67). Dans leur étude, les lignées KRAS-dépendantes étaient les plus différenciées, et dépendaient des kinases SYK et RON, et de l'ITGB6 pour leur phénotype (67). La perte de KRAS dans ce contexte induisait l'EMT et l'apoptose dans les cellules KRAS-dépendantes (67). Kapoor *et al.* ont quant à eux déterminé, dans un modèle KRAS inductible, que les cellules qui rechutent après la régression induite par l'ablation de l'oncogène KRAS peuvent se reposer sur l'activation de YAP1/TEAD2 pour activer la transcription de gènes pro-prolifératifs en aval de la voie Hippo (36). De façon intéressante, les cellules PDAC YAP1-dépendantes et KRAS-indépendantes avaient un phénotype similaire au sous-type quasi-mésenchymal selon Collisson et al (36,41).

Globalement, la perte de dépendance à l'oncogène KRAS semble faire progresser les cellules vers un phénotype plus problématique, lié à l'apparition des cellules souches cancéreuses et la perte de certaines cibles thérapeutiques, notamment la dépendance à la glycolyse, à la synthèse de nucléotides, le peu de défenses rédox, la sensibilité au stress, la macropinocytose KRAS-dépendante, etc. C'est donc à se demander si les efforts poursuivis dans le sens de l'inhibition de KRAS, offrant des résultats prometteurs à court terme, présentent le risque de favoriser cette progression à plus long terme. Une avenue peu explorée serait celle de restaurer la dépendance à

KRAS, ou minimalement la signature métabolique qui en dépend, pour resensibiliser les cellules aux thérapies anti-métaboliques classiques. Notre contribution à cette réflexion sera présentée dans l'article 3.

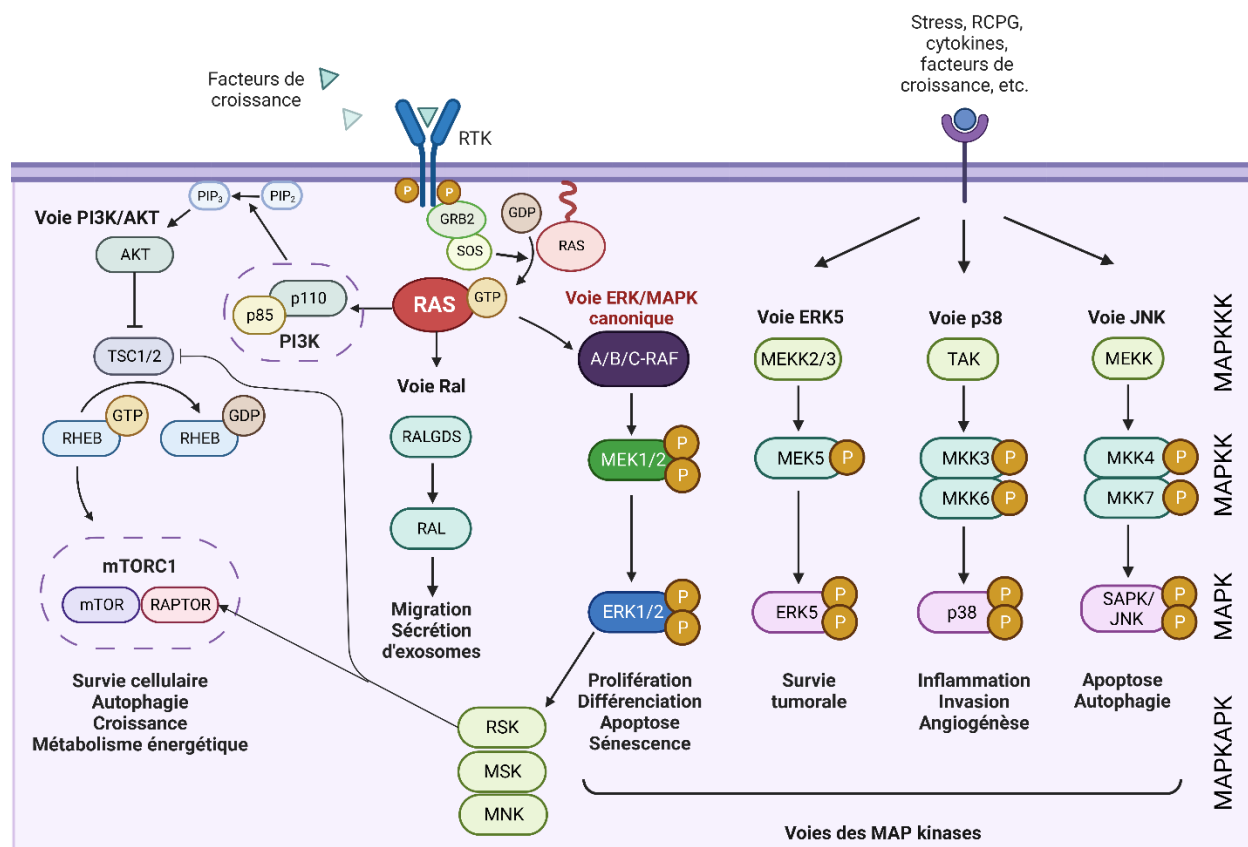
Finalement, pour mieux comprendre le rôle de RAS dans la progression du cancer pancréatique, il importe de se pencher sur les voies activées en aval, notamment la voie des MAPK ERK1/2, sur laquelle nos travaux portent principalement. La prochaine section en présentera donc les bases ainsi que la dualité de rôles à la fois pro-oncogéniques et suppresseurs de tumeurs qui lui ont été attribués.

## **1.4. La voie des kinases ERK1/2 en aval de l'oncogène RAS**

### **1.4.1. La voie RTK/RAS/MAPK**

Dans les cellules normales, la voie canonique de la petite GTPase RAS (HRAS, NRAS ou KRAS 4a et 4b) est activée suivant la liaison de facteurs de croissance (EGF, FGF, PDGF, etc.) à leur récepteur de type tyrosine kinase (RTK) (**Figure 1.4**) (68). La protéine adaptatrice GRB2, qui est ensuite recrutée au récepteur transphosphorylé, fait le pont avec la protéine échangeuse de nucléotide guanine (GEF) SOS1 qui catalyse l'échange du GDP par un GTP dans la petite GTPase RAS et l'active pour la signalisation (69,70). Dans la voie RAS/MAPK (mitogen-activated protein kinases), une cascade de phosphorylation s'active en aval où la MAP3K RAF (A-RAF, B-RAF ou C-RAF/RAF1) phosphoryle la MAP2K MEK (MEK1/2) aux résidus S218/S222 pour MEK1 et S222/S226 pour MEK2 (71). À leur tour, ces kinases de résidus tyrosine/thréonine activent les MAPK ERK1/2 en les phosphorylant aux résidus T202/Y204 pour ERK1 et T185/Y187 pour ERK2 (72,73). Les kinases ERK1/2, des kinases de résidus sérine et thréonine, sont les principales, voire uniques, cibles connues de MEK1/2 (74). Les kinases ERK1/2 ainsi activées peuvent ensuite phosphoryler et moduler l'activité d'une variété d'effecteurs cytoplasmiques ou nucléaires impliqués dans l'activation de la prolifération, de la différenciation, de la survie, ou même de la mort cellulaire (75). Dans le reste de cet ouvrage, avec l'appellation « kinases ERK », nous référerons aux kinases ERK1 et ERK2 conjointement.





**Figure 1.4. Voie de signalisation RAS/MAPK canonique et voies parallèles.**

La liaison de facteurs de croissance à leur récepteur induit la transphosphorylation du récepteur à activité tyrosine kinase et induit l'échange du GDP pour un GTP sur la petite GTPase Ras qui active ses effecteurs en aval, soit la voie PI3K, la voie Ral ou la voie canonique ERK/MAPK. D'autres voies MAPK comme la voie ERK5, p38 ou JNK/SAPK sont elles aussi activées suivant différents stimuli extracellulaires et sont impliquées dans les fonctions cellulaires mentionnées. Les voies ERK3/4 et ERK7/8 ne sont pas représentées. RTK, Récepteur à activité tyrosine kinase; GDP, Guanosine diphosphate; GTP, Guanosine triphosphate; PI3K, Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate 3-kinase; PIP<sub>2</sub>, Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate; PIP<sub>3</sub>, Phosphatidylinositol-3-4-5-triphosphate; SAPK, Stress-activated protein kinase; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; MAPKK, kinase de MAPK; MAPKKK, kinase de MAPKK; MAPKAPK, MAPK-activated protein kinase. Figure réalisée avec BioRender.

D'autres cascades de MAPK existent avec un fonctionnement similaire, où elles sont capables de transmettre les signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule, mais celles-ci sont activées en aval de récepteurs différents. Par exemple, en condition de stress ou dans la signalisation par les cytokines, la voie des kinases JNK1-3, aussi nommées SAPK (protéines kinases activées par le stress), s'active et régule entre autres l'apoptose et l'autophagie (76). De façon intéressante, la voie JNK a une activité suppresseur de tumeur dans l'initiation du cancer pancréatique, où l'inactivation de ses kinases en amont MKK4/MKK7 induit un état dédifférencié des cellules, accélère la formation de PanIN induits par l'activation de KRAS<sup>G12D</sup> et favorise la

progression (77). Aussi, la voie des MAPK p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  joue un rôle dans l'inflammation, le cycle cellulaire et l'invasion (78). La voie p38 agirait comme un facteur pro-oncogénique dans les PDAC en stimulant l'angiogenèse via le VEGF (79) et par la formation d'un front de migration menant à l'invasion (80). Son rôle oncogénique s'exerce aussi dans les fibroblastes associés au cancer (CAF) où l'activation de la voie favorise une sécrétion immunosuppressive et pro-tumorale par les CAF (81). Puis les voies des kinases ERK3/4, ERK5, ERK7/8 ont, quant à elles, des fonctions diverses et moins bien caractérisées (82,83). Parmi ces dernières, seule l'activité de la kinase ERK5 a été investiguée dans le cancer du pancréas, où l'inhibition pharmacologique des kinases ERK1/2 en aval de KRAS<sup>G12D</sup> mène à un mécanisme compensatoire qui active ERK5 et stabilise MYC pour promouvoir la survie tumorale (84). Dans cette étude, l'inhibition combinée des voies ERK1/2 et ERK5 représentait une façon de cibler l'oncogène MYC dans le cancer du pancréas (84).

La voie RAS non-canonique permet quant à elle d'activer différentes voies parallèles à la voie RAF/MEK/ERK (**Figure 1.4**), notamment la voie PI3K. RAS interagit principalement avec la sous-unité catalytique p110 de PI3K (85) menant à son activation et régulant divers processus comme la survie cellulaire, la migration, l'autophagie, la croissance cellulaire et le métabolisme énergétique (86). Il existe également de la signalisation croisée où ERK et sa cible RSK phosphorylent TSC2 (87) et RAPTOR (88), contrôlant l'activité de mTOR, un effecteur important de la voie PI3K/AKT. La voie RAS peut également engager via RALGDS la voie des GTPases RAL impliquées dans la migration cellulaire, la sécrétion d'exosomes et la signalisation immunitaire (89). De façon intéressante, l'activation de la voie RAL dans les cellules pancréatiques est impliquée dans la métaplasie acinaire à canalaire et l'initiation cancéreuse (90). L'activation de RAL en aval de KRAS est également impliquée dans le caractère invasif des PDAC, alors que la voie canonique RAF/MEK/ERK ne semble pas requise à cet effet (91).

#### **1.4.2. Cibles de la voie canonique ERK1/2**

Les cibles de la voie canonique ERK1/2 sont nombreuses (92). Elles ont généralement en commun un motif Pro-X-Ser/Thr-Pro, où le résidu sérine ou thréonine se trouve près d'un résidu proline, donnant aux kinases ERK le nom de kinases dirigées par les prolines, tout comme les kinases dépendantes des cyclines (CDK). Parmi les cibles notoires de ERK se trouve la famille TCF (ternary complex factor) de facteurs de transcription ETS, incluant ELK-1, impliqué dans la

transcription des gènes « immediate-early » (IEG) (93). La phosphorylation de ELK-1 par ERK1/2 et son association avec SRF (serum responsive factor) permettent la transcription de C-FOS lors d'une stimulation brève de la voie ERK par les facteurs de croissance (93). L'activation prolongée de ERK permet la phosphorylation et stabilisation de C-FOS (94) qui peut s'associer à JUN pour former le facteur de transcription AP-1, responsable de la transcription de la cycline D1 et d'autres gènes impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire et la prolifération. Parmi les autres cibles directes de la voie ERK, les mieux caractérisées sont certainement les kinases MAPKAPK (MAPK-activated protein kinases) qui relayent le signal à leur tour. Parmi les MAPKAPK se trouvent les kinases des familles RSK, MSK et MNK.

Les kinases RSK1-4 (Ribosomal protein S6 kinases) sont impliquées notamment dans la prolifération cellulaire, la survie, la synthèse protéique et l'EMT (95,96). L'activation des RSK est corégluée par l'activité de ERK et de PDK1. De façon intéressante, alors que RSK1/2 ont été montrées comme stimulant la prolifération (97), les kinases RSK3/4 seraient impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire (98), la sénescence (99) et l'apoptose (100). Ces kinases seraient également liées à la stimulation de l'activité NF- $\kappa$ B, un important régulateur de l'inflammation (101). RSK1/2 contrôlent également la stabilité de C-FOS par phosphorylation (94).

La famille MSK (mitogen- and stress-activated kinases), comprenant MSK1 et MSK2, est à la fois activée par la voie ERK1/2 et par la voie p38. Les protéines MSK1/2 régulent l'immunité innée (102), les processus inflammatoires, la signalisation par NF- $\kappa$ B (103) et STAT3 (104), de même que la transcription des IEG via CREB (105) et en régulant l'ouverture de la chromatine par phosphorylation de HMG-14 et de l'histone H3 (106). Les kinases MNK1/2, finalement, sont davantage impliquées dans la régulation négative de la traduction, principalement via la phosphorylation d'eIF4E (107). Dans un autre contexte, l'activité de MNK induit la phosphorylation et la stabilisation de Sprouty 2, un régulateur négatif de la voie RTK/RAS, démontrant un rôle de MNK dans une boucle de rétro-inhibition (108). L'activation des MNK1/2 serait généralement associée à des conditions de stress et à l'activation d'oncogènes, et pourrait avoir des propriétés pro-tumorales (109,110).

Les kinases ERK1/2 influencent également la coordination entre l'activité des trois polymérases d'ARN et la présence de signaux mitogéniques. Les facteurs associés à l'ARN

polymérase I, elle-même impliquée dans la transcription des ARN ribosomiques, soit UBF et TIF-IA, sont directement phosphorylés par ERK et RSK (111,112). Également, les régulateurs MAF1 et BRF1, impliqués dans la transcription de l'ARNr 5S et des ARN de transfert par l'ARN polymérase III, sont des cibles de ERK1/2 (113,114). Finalement, le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II a lui aussi été montré comme pouvant être phosphorylé en sérine 5 par ERK1/2, toutefois l'effet sur sa fonction est encore mal compris (115). Ainsi, la voie canonique ERK/MAPK a le potentiel de réguler de nombreuses fonctions essentielles à la cellule à travers sa panoplie d'effecteurs cytoplasmiques ou nucléaires, démontrant toute la complexité de cette voie de signalisation et la nécessité de mécanismes de régulation robustes.

### **1.4.3. Régulation des kinases ERK1/2 : localisation et rétrocontrôles**

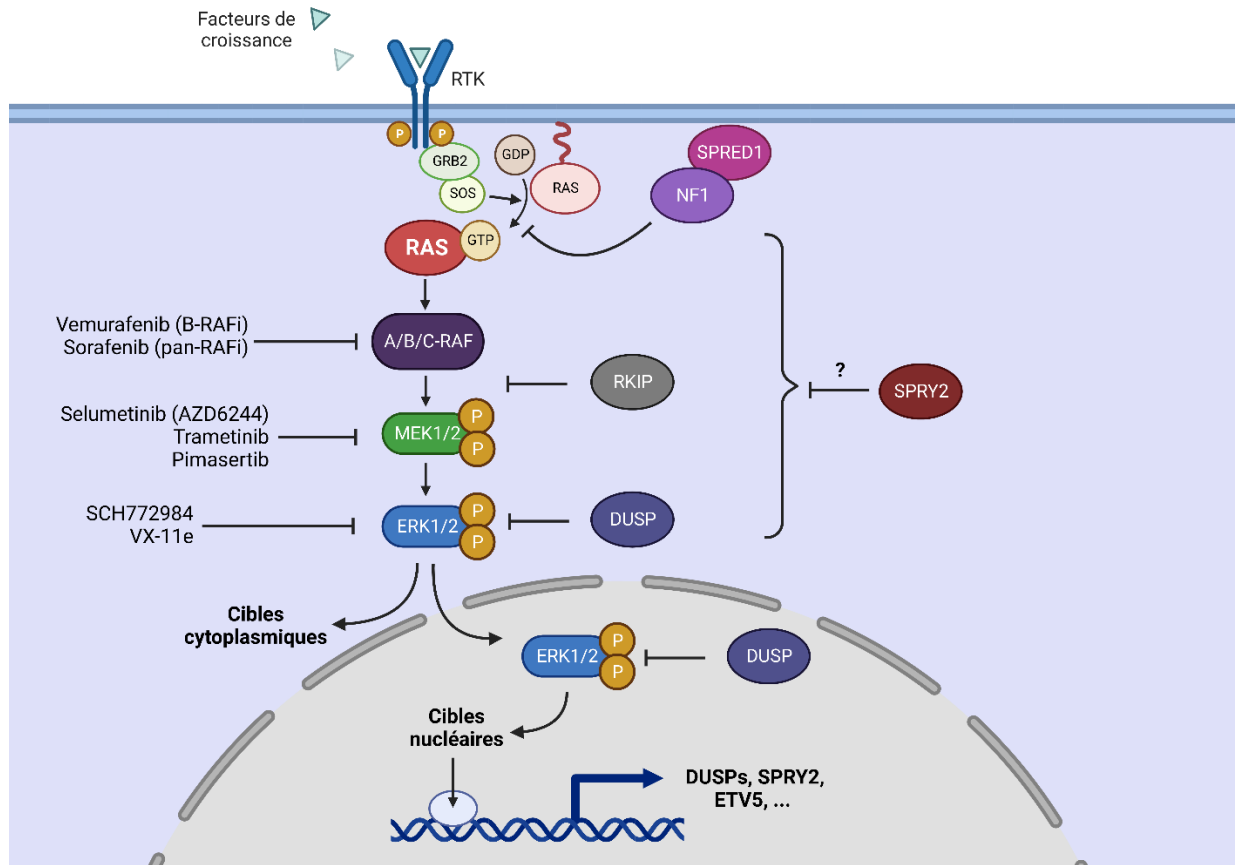
À cet effet, la voie MAPK/ERK peut être activée à différents endroits dans la cellule, où des protéines d'échafaudage variées médient son activation. Le scénario classique, à la membrane plasmique, implique le recrutement de KSR, une protéine d'échafaudage qui rapproche RAF, MEK et ERK pour augmenter l'efficacité de la transduction du signal (116). La  $\beta$ -arrestin-2 peut faire de même en réponse à l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), permettant la transduction à travers la voie ERK/MAPK sur les endosomes mais restreignant l'activité de ERK à une localisation cytoplasmique (117). À l'opposé, MP-1 permet l'activation de ERK sur les endosomes mais induit plutôt une activité nucléaire subséquente de ERK (118). IQGAP1 permet l'activation de ERK sur les fibres du cytosquelette de façon à moduler l'invasion et la migration cellulaire (119), tandis que Paxillin influence les mêmes phénomènes par son activation aux complexes d'adhésion focaux (120). Les protéines ATG, finalement, permettent l'activation de ERK sur les autophagosomes (121).

La régulation de la voie ERK/MAPK peut également s'effectuer selon la stœchiométrie ou l'assemblage des composantes de la voie, où certaines fonctionnent sous forme d'homodimère (ex : RAF1/RAF1, MEK1/MEK1 ou ERK2/ERK2) ou d'hétérodimère (B-RAF/RAF1) (122). La formation d'hétérodimères entre MEK1/2 semble quant à elle inhibitrice. Dans le cas des kinases ERK, l'activité de celles-ci semble possible à la fois en monomère et en homodimère (123). Des études contradictoires ont tenté d'établir une localisation préférentielle des formes monomérique et dimérique de ERK, toutefois sans consensus (123,124). Cependant, de façon intéressante, un

inhibiteur ciblant l'interface de dimérisation de ERK mais pas sa fonction kinase, bloque la formation de dimères, la signalisation cytoplasmique par ERK, et la formation de tumeurs dans des modèles de mélanome B-RAF-mutant et de cancer colorectal KRAS-mutant (125).

La localisation d'ERK semble contrôlée par plusieurs facteurs. Sa translocation nucléaire dépend de sa relâche par des protéines d'ancrage au cytoplasme, notamment la protéine PEA-15, qui s'oppose à sa translocation (126,127). ERK monomérique localiserait au noyau grâce à la phosphorylation par CK2 de son signal de translocation nucléaire (NTS), qui diffère d'un NLS classique, menant à son import au noyau médié par l'importin-7 (128). Son retour au cytoplasme dépend quant à lui de l'interaction et du transport actif par MEK qui, à la différence de ERK, possède un signal d'export nucléaire (129).

La voie RAS/ERK est également soumise à diverses régulations négatives et boucles de rétroaction (**Figure 1.5**), notamment par la transcription ERK-dépendante de phosphatases à double-spécificité (DUSP ou MKP). Ces phosphatases, notamment DUSP1 qui est nucléaire et DUSP6 qui est plutôt cytoplasmique, vont déphosphoryler ERK1/2 et mettre fin à sa signalisation en aval (130). Au niveau de RAS, son activité induite par sa GEF SOS est également contrebalancée par l'activité de protéines activatrices de la fonction GTPase (GAP) comme NF1 qui stimule l'hydrolyse du GTP en GDP par RAS. Le recrutement de la GAP NF1 à la membrane plasmique est gouverné par son partenaire d'interaction SPRED1 (131). L'interaction de RAF et MEK peut également être antagonisée par une protéine nommée RKIP (RAF kinase inhibitory protein), empêchant l'activation de MEK (132). Finalement, les protéines de la famille Sprouty, notamment SPRY2, sont des régulateurs négatifs de la voie, mais leurs partenaires d'interaction et les mécanismes précis d'inhibition de la voie restent élusifs (133).



**Figure 1.5. Régulateurs négatifs et inhibiteurs pharmacologiques de la voie RAS/ERK.**

La voie ERK1/2 peut être régulée pharmacologiquement et est soumise à différents rétrocontrôles endogènes. Sur le côté gauche de la figure, les inhibiteurs pharmacologiques les mieux connus de la voie sont présentés. Du côté droit sont représentés NF1, qui agit comme GAP de la petite GTPase RAS, RKIP qui bloque l'interaction de RAF et MEK, empêchant son activation, la famille de phosphatases DUSP qui déphosphorylent ERK1/2 et/ou d'autres MAPK au cytoplasme ou au noyau selon le membre de la famille DUSP concerné, et Sprouty2 qui bloque l'activation de la voie par des mécanismes divers et mal compris. Plusieurs de ces rétroinhibiteurs de la voie sont induits en aval de la signalisation ERK. RTK, Récepteur à activité tyrosine kinase; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; NF1, Neurofibromine 1; SPRED1, Sprouty-related protein with EVH-1; RKIP, RAF kinase inhibitory protein; SPRY2, Sprouty 2; DUSP, Dual-specificity phosphatases; ETV5, ETS-variant transcription factor 5; GAP, GTPase-activating protein. Figure réalisée avec BioRender.

Il est intéressant de noter que dans le cancer, les mutations de KRAS au codon 12 le rendent constitutivement lié à son GTP, car la protéine GAP est incapable de stimuler l'hydrolyse du GTP pour terminer la signalisation (134). Par conséquent, son activation devient constitutive et indépendante de la présence de signaux mitogéniques en amont. De nombreux cancers, incluant les tumeurs pancréatiques KRAS<sup>WT</sup> peuvent arborer des mutations activatrices dans la kinase en aval RAF (20). La mutation de ces oncogènes est toutefois mutuellement exclusive (135). Les mutations activatrices de MEK et de ERK sont quant à elles très rares dans les cancers.

En somme, l'activité de ERK et sa spécificité de substrats dépend de nombreux facteurs, soit des ligands et de son récepteur en amont (136), de sa localisation, de ses protéines d'échafaudage ou d'ancrage, et même de sa dynamique d'activation. Une activation faible ou forte de la voie, brève ou soutenue dans le temps, a des conséquences différentes sur le destin cellulaire (137). Bien que plusieurs auteurs aient tenté de modéliser l'activation de ERK, en incluant des modèles de bistabilité, d'activation gradée, pulsatile ou en oscillation (138,139), la variété de contextes d'activation rend la tâche très complexe. L'étude des substrats de ERK l'est tout autant, avec la convergence de plusieurs voies de signalisation sur les mêmes cibles, et la possibilité de sites multiples de phosphorylation sur celles-ci. Malgré l'abondante littérature sur cette voie, de nombreuses questions à son propos restent donc sans réponse. Ce que la littérature nous apprend toutefois, c'est que dans la majorité des cas, l'activation de la voie ERK, ou la mutation activatrice de certaines composantes de la voie, a un effet pro-prolifératif et oncogénique. Conséquemment, beaucoup d'efforts ont été investis dans la recherche d'inhibiteurs de la voie (**Figure 1.5**) pour le traitement de divers cancers, incluant celui du pancréas.

#### **1.4.4. Inhibiteurs de la voie ERK/MAPK contre le cancer du pancréas**

Dans le cas du cancer du pancréas, l'équipe de Channing J. Der a démontré en 2016 que l'utilisation prolongée de l'inhibiteur de ERK SCH772984 induit un phénotype de sénescence et une dégradation de l'oncogène MYC dans des lignées cancéreuses pancréatiques (140). Cet inhibiteur fonctionne par deux mécanismes, soit par compétition avec l'ATP dans la poche catalytique de ERK, empêchant son activité kinase sur ses cibles, puis par un changement de conformation dans ERK qui bloque l'interaction de MEK avec ERK et sa double-phosphorylation (141). En 2020, l'équipe de Der a également publié que l'inhibition de la voie à deux niveaux, par exemple avec un inhibiteur pan-RAF et un inhibiteur de ERK, permet d'induire de la mort cellulaire ou un arrêt en phase G1 dépendant de l'activation de la protéine RB (142). Dans ce même contexte, l'utilisation combinée des inhibiteurs favorisait un phénotype inverse à l'EMT, soit une transition mésenchymale vers épithéliale (MET) (142). Toutefois, dans les essais cliniques, un bénéfice de l'inhibition de la voie n'est pas encore démontré pour le cancer pancréatique. La combinaison des inhibiteurs de MEK pimasertib ou trametinib, avec la gemcitabine n'a pas démontré de bénéfice clinique pour le cancer du pancréas métastatique (143,144). Plusieurs autres études sont en cours

pour évaluer l'efficacité de l'inhibition de la voie en combinaison avec de l'immunothérapie, de la chimiothérapie, des inhibiteurs de CDK4/6 ou de PARP (NCT03193190, NCT03637491, NCT03454035, NCT04005690).

#### **1.4.5. Fonctions antitumorales de la voie ERK1/2**

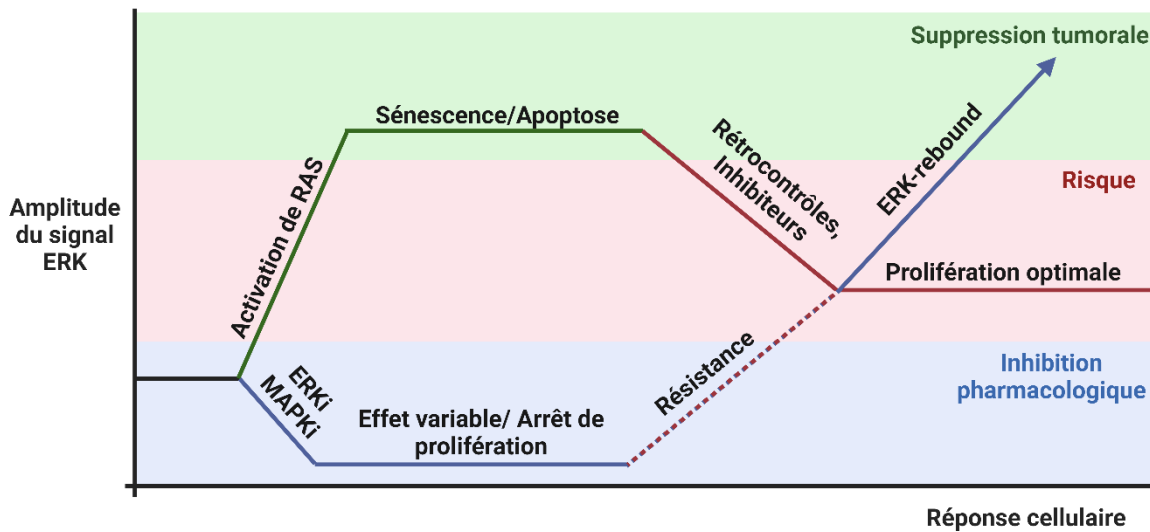
Malgré l'abondante littérature montrant les propriétés oncogéniques de la voie RAS/MAPK, de nombreuses évidences suggèrent également des fonctions antitumorales de cette même voie. Dans la leucémie lymphoblastique aigue, l'inhibition des régulateurs négatifs de ERK, soit SPRY2, ETV5 et DUSP6, mène à une apoptose massive des cellules cancéreuses liée à une forte suractivation des kinases ERK1/2 (145). Cette mort cellulaire pourrait dépendre de la formation de dérivés réactifs de l'oxygène puisque l'ablation de la sous-unité p47<sup>phox</sup> du complexe NADPH oxydase abroge ce phénotype (145). Alternativement, une autre étude a rapporté que l'hyperactivation de HRAS induisait une mort autophagique dans des cellules épithéliales ovariennes grâce à l'augmentation de l'expression de Beclin-1 et de NOXA (146). De plus, dans un contexte physiologique, la sélection négative dans la moelle osseuse de lymphocytes B ayant un récepteur contre des antigènes du soi a été montrée comme dépendant d'une apoptose médiée par ERK (147). Dans ce cas, une voie impliquant PKCdelta/Ca<sup>2+</sup>/RASGRP/ERK menait à de la mort cellulaire suite à la stimulation des lymphocytes B par l'antigène, si le niveau d'activation de cette voie était supérieur à un certain seuil (147). À l'opposé, si ce niveau n'était pas atteint, comme dans des lymphocytes matures, le destin cellulaire était plutôt une réponse proliférative en réponse à la stimulation antigénique (147). Finalement dans un contexte clinique, des cellules de mélanome BRAF-mutantes, ayant développé une résistance et une addiction à un traitement combiné d'inhibiteurs de RAF et de MEK, vont subir une mort cellulaire importante lors de l'arrêt de ce traitement à cause d'une hyperactivation de la voie ERK2/JUN-B/FRA1 (148). Le phénotype de mort cellulaire dans cette étude était accompagné d'une transition épithélio-mésenchymateuse induite par la diminution du niveau protéique d'un régulateur de la différenciation, soit MITF (148).

Finalement, l'activité élevée de la voie RAS/ERK a été liée à l'induction d'un autre phénotype antitumoral, soit la sénescence cellulaire. Les premières évidences de la capacité de cette voie à induire la sénescence remontent à 1997, lorsque Serrano *et al.* ont montré que HRAS<sup>V12</sup> induisait un arrêt de prolifération dans des lignées primaires plutôt qu'une transformation des



cellules, si les voies p16 et p53 étaient intactes (149). De nombreuses équipes ont reproduit ces résultats en précisant la contribution essentielle des kinases ERK dans l'induction de la sénescence par RAS (150,151). Dans un contexte physiologique, des mutations activatrices de BRAF dans les mélanocytes induisent la formation de grains de beauté, soit des lésions sénescences (152). Plusieurs lésions pré-cancéreuses non-prolifératives présentent ainsi une hyperactivation de la voie RAS et des caractéristiques de sénescence, témoignant de l'importance de cette activité antitumorale *in vivo* (153,154).

Dans l'ensemble de ces écrits, un élément semble important pour la fonction antitumorale de la voie ERK et il s'agit de son hyperactivation. Y a-t-il donc possiblement un intérêt thérapeutique à hyperactiver la voie, bien que cela semble paradoxal au regard des efforts déployés pour trouver des inhibiteurs de la voie? Cette hypothèse sera plus tard abordée dans l'article 2. Mentionnons pour l'instant qu'il existe un principe, nommé principe de Boucle d'or (Goldilocks), qui décrit le niveau ni trop haut, ni trop bas, de signalisation par ERK requis pour engendrer la prolifération cellulaire et la tumorigénèse (**Figure 1.6**) (155). Dans un contexte cancéreux, la balance entre un oncogène activé (KRAS-mutant) et des rétrocontrôles négatifs (DUSP, etc.) permet de maintenir la signalisation à un niveau favorable à ces processus (155). Conséquemment, d'un point de vue thérapeutique, l'inhibition comme l'hyperactivation de la voie semblent pertinentes pour faire basculer l'équilibre hors de la zone favorable aux cellules cancéreuses. Certains auteurs proposent également une stratégie thérapeutique qui ferait l'alternance entre une inhibition de la voie et une activation (156,157). Lors de l'ajout d'inhibiteurs, il y a inévitablement une accoutumance et une résistance qui surviennent (158).



**Figure 1.6. Effet de l'amplitude de la signalisation par ERK sur la réponse cellulaire.**

À partir d'un niveau basal de signalisation ERK, l'activation de RAS induit une hypersignalisation de la voie menant selon le contexte à la sénescence ou l'apoptose. De ce niveau, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou les rétrocontrôles endogènes amènent le risque de diminuer le stress et de récupérer un phénotype de prolifération optimale. À l'opposée, depuis le niveau basal, une inhibition de la voie ERK/MAPK produit des effets variables selon le contexte cellulaire, allant de l'arrêt de prolifération à aucun effet. À long terme, cette inhibition favorise la mise en place de mécanismes de résistance permettant le retour à un niveau basal de ERK et de prolifération, selon le principe de Boucle d'or. Ces mécanismes de résistance internes promouvant l'activation de la voie créent une opportunité thérapeutique où le retrait des inhibiteurs et/ou la combinaison avec un activateur de la voie est susceptible de générer un rebond du niveau de ERK associé à des mécanismes de suppression tumorale, même dans des cellules ayant résisté aux inhibiteurs de ERK. ERKi/MAPKi, inhibiteurs de la voie ERK/MAPK. Figure réalisée avec BioRender.

Toutefois, comme l'ont démontré les travaux de Kong *et al.*, le retrait de ces inhibiteurs fait basculer le nouvel équilibre vers la zone d'hyperactivation de la voie, où un nouvel effet bénéfique est observé (148). On pourrait nommer cet effet le rebond de signalisation ERK (ERK-rebound) (159). Cet effet risque toutefois d'être bloqué par la réactivation des mécanismes de rétrocontrôle négatif, d'où l'utilité de l'alternance entre une hypersignalisation et une inhibition de la voie, auquel cas des mécanismes de résistance aux deux états sont moins envisageables.

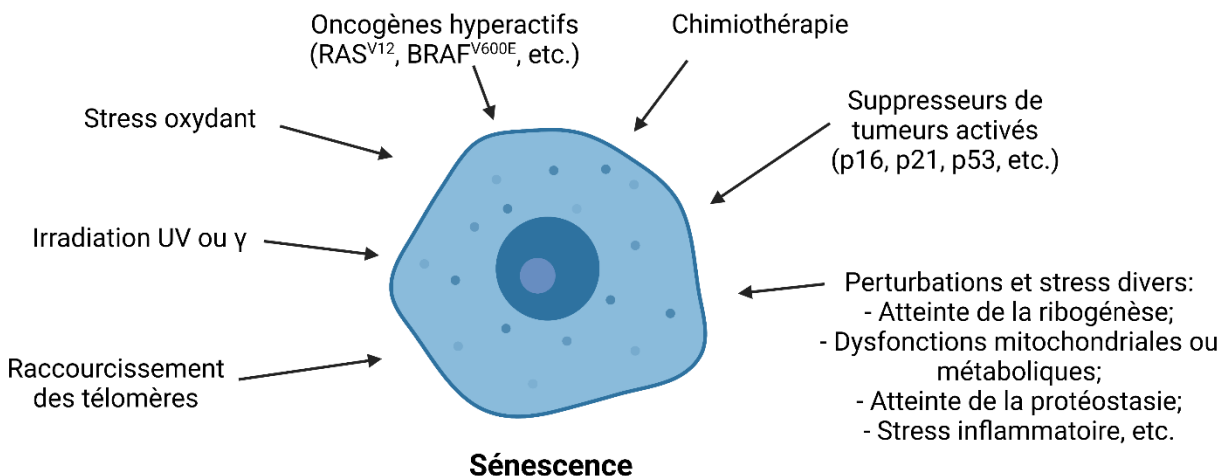
Dans le contexte de la progression cancéreuse pancréatique, on pourrait donc supposer que les cellules évoluent pour atteindre la zone favorable de signalisation par ERK qui permet la prolifération selon le principe de Boucle d'or. En effet, dès l'apparition de la mutation activatrice de KRAS dans le stade PanIN, la signalisation augmentée par la voie RAS/ERK est susceptible d'être plutôt antitumorale, par l'induction de mort cellulaire ou de sénescence, comme dans d'autres lésions bénignes. Ainsi, afin de mieux comprendre l'implication de ERK et de la sénescence cellulaire dans la progression du cancer pancréatique, soit le cœur de nos travaux, la

prochaine section fera un tour d'horizon de ce qu'est la sénescence cellulaire, en mettant en lumière la contribution spécifique de la voie RAS/ERK dans ses diverses caractéristiques.

## **1.5. La sénescence cellulaire**

### **1.5.1. Définition générale et modes d'induction**

La sénescence cellulaire a initialement été décrite comme un arrêt de prolifération stable des cellules en culture qui atteignaient leur limite de division, nommée limite de Hayflick (160). Plus tard renommée sénescence répllicative, ce phénomène a été attribué à l'attrition des télomères après un nombre limité de passages en culture et au déclenchement d'une voie de réponse aux dommages à l'ADN (161,162). Il s'agissait de la première description d'un phénotype de vieillissement au niveau cellulaire (163). À juste titre, il a plus tard été observé qu'avec le vieillissement d'un organisme, celui-ci accumule des cellules sénescents qui médient un éventail de phénotypes et de maladies associées au vieillissement comme l'ostéoarthrite, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, la fibrose pulmonaire (164-166), etc. Au fil des études, de nombreux autres modèles de sénescence ont été décrits permettant de généraliser la définition à un arrêt stable du cycle cellulaire en réponse à différents stress intrinsèques ou extrinsèques (166). La sénescence peut donc être induite par le stress réplicatif, par la génération de dommages à l'ADN via une irradiation  $\gamma$  ou des rayons UV, par le stress oxydant, la chimiothérapie, l'activation d'oncogènes, etc. (166) (**Figure 1.7**).



**Figure 1.7. Inducteurs de sénescence cellulaire.**

La sénescence cellulaire peut être induite par différents stress, notamment le raccourcissement des télomères, les dommages à l'ADN causés par irradiation ou par la chimiothérapie, le stress oxydant, l'activation d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs, ou encore par différentes atteintes à l'homéostasie cellulaire. Figure réalisée avec BioRender.

La sénescence constituerait donc une méthode de protection cellulaire évitant notamment la transmission de matériel (ADN, protéines) endommagé à des cellules filles. Dans un organisme jeune, ces cellules qui entrent en sénescence sont rapidement éliminées par le système immunitaire grâce à leur phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) (167,168). Toutefois, chez les organismes vieillissants, des altérations du système immunitaire diminuent leur élimination (169,170), et les cellules sénescents deviennent alors des médiateurs d'inflammation chronique (171). Leur rôle dans l'organisme est donc à double tranchant. Elles jouent un rôle favorable dans la cicatrisation (172), dans le développement embryonnaire (173,174) et ont des propriétés suppresseurs de tumeurs, mais peuvent également causer de la fibrose dans plusieurs organes, de l'inflammation chronique, voire promouvoir la croissance tumorale par leurs sécrétions si elles persistent au sein d'une tumeur (164).

Dans la prochaine section, nous explorerons diverses facettes des cellules sénescents, notamment les caractéristiques permettant leur identification. À travers cela, nous nous concentrerons sur la sénescence induite par les oncogènes, plus précisément l'oncogène RAS, et sur la sénescence induite par la thérapie, deux modèles d'intérêt pour l'étude de la progression et du traitement du cancer pancréatique. Mentionnons que la plupart des découvertes fondamentales

effectuées sur la sénescence proviennent de modèles de cellules en culture, mais nous tenterons de répertorier également les études confirmant les différents phénotypes dans des modèles *in vivo* murins ou humains.

### **1.5.2. Arrêt du cycle cellulaire, voies p53/p21<sup>CIP</sup> et p16<sup>INK4a</sup>/RB**

La sénescence cellulaire sous toutes ses formes est définie par un arrêt stable du cycle cellulaire (175). À la différence des cellules quiescentes, les cellules sénescents sont insensibles aux signaux mitogéniques et sont arrêtées dans l'une des phases du cycle cellulaire, généralement en G1, ou à la transition G1/S, et quelquefois en G2, et non en G0 comme les cellules quiescentes (176). Les cellules sénescents se distinguent également des cellules différenciées de façon terminale par leur programme d'expression génique et leur identité cellulaire. Tandis que l'identité des cellules en différenciation terminale se modifie pour devenir stable, l'identité primaire des cellules sénescents ne se modifie pas malgré un programme d'expression génique dynamique (177,178). L'arrêt du cycle cellulaire des cellules sénescents est principalement médié par l'engagement de deux voies de signalisation majeures régulant des inhibiteurs du cycle cellulaire, soit la voie p53/p21<sup>CIP</sup> et la voie p16<sup>INK4a</sup>/RB.

La progression entre les différentes phases du cycle cellulaire est régulée par des points de contrôle impliquant des complexes CDK (kinase dépendante des cyclines) -cycline (179). La progression entre la première phase de croissance (G1) et la phase de synthèse d'ADN (S) est régie par l'activité des complexes CDK4/6-cycline D, qui phosphorylent la protéine du rétinoblastome (RB) permettant de lever son inhibition sur les facteurs de transcription E2F, menant conséquemment à la transcription de nombreux facteurs requis pour la réplication de l'ADN (MCM6, CENP-A, etc.), la réparation de l'ADN et la poursuite dans le cycle cellulaire (cyclines, CDK, etc.) (179). La progression en phase S, régie par l'activité du complexe CDK2-cycline E s'enclenche donc, puis la transition vers la seconde phase de croissance (G2) est quant à elle contrôlée par l'activité du complexe CDK2-cycline A (180). Finalement, l'entrée en mitose est régulée par l'activité du complexe CDK1-cycline B, activité qui décroît ensuite pour permettre la nouvelle phase G1 en sortie de mitose (180).

L'arrêt en phase G1 des cellules sénescents se produit principalement grâce à l'induction de p16<sup>INK4a</sup>, soit un inhibiteur des complexes CDK4/6-cycline D (179). Son action empêche la phosphorylation de RB qui, hypophosphorylé, prévient l'activité des E2F et la poursuite du cycle cellulaire (179). Le locus contenant le gène de p16, CDKN2A, exprime également un transcrite alternatif, p14ARF (p19Arf chez la souris), impliqué dans la sénescence via l'activation de la voie p53 et par divers mécanismes p53-indépendants (181,182). De façon intéressante, l'un de ces mécanismes implique la dégradation de la protéine nucléophosmine (NPM1/B23), un régulateur important de la biogénèse des ribosomes, causant un arrêt du cycle cellulaire (183). L'expression de p16<sup>INK4a</sup> est quant à elle fréquemment utilisée comme un marqueur de sénescence dans les cellules humaines en culture et les tissus (184). D'ailleurs, plusieurs grandes découvertes sur la sénescence ont été réalisées grâce à des modèles murins dans lesquels le promoteur de p16 était fusionné à un gène rapporteur ou à encore à un gène-suicide qui permettait l'élimination des cellules sénescents spécifiquement (165,172,185,186). Cependant, l'inactivation fréquente de p16 et d'ARF dans les lésions cancéreuses pancréatiques limite leur utilisation pour l'étude de la sénescence dans leur progression (187).

Alternativement, l'activation de la voie du suppresseur de tumeur p53 mène à la transcription de l'inhibiteur de cycle cellulaire p21<sup>CIP</sup>, qui peut bloquer l'activité des complexes cycline-CDK1/2/4/6 et inhiber le cycle cellulaire dans diverses phases (188,189). De surcroît, d'autres inhibiteurs de cycle cellulaire peuvent intervenir, tel que p15<sup>INK4b</sup> et p27<sup>KIP</sup>, bien que ce dernier soit généralement davantage associé à la quiescence (180). Plus récemment, des protéines ribosomiques ont été identifiées comme de nouveaux inhibiteurs des complexes CDK-cyclines avec des rôles dans la sénescence (190,191). Leur contribution sera présentée dans la section sur les défauts de biogénèse ribosomique associés à la sénescence.

Les mécanismes qui mènent à l'activation des voies p53 et p16 sont multiples. Dans le cas de p53, il est en temps normal dégradé par le protéasome dans les cellules non-sénescents par sa liaison à son E3 ubiquitine ligase HDM2 (Mdm2 chez la souris) (192). En condition sénescence, p53 est modifié de façon post-traductionnelle, ce qui réduit son interaction avec HDM2/Mdm2 (193). Alternativement, diverses protéines incluant ARF et des protéines ribosomiques peuvent lier directement et séquestrer HDM2/Mdm2, libérant et stabilisant ainsi p53, lui permettant d'activer

la transcription de ses gènes cibles de façon subséquente (194,195). L'induction de p16, quant à elle, se produit au niveau transcriptionnel. En temps normal, le locus est réprimé par la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) médiée par l'action de complexes Polycomb remodeleurs de chromatine (196,197). L'activation du locus dépend de plusieurs processus, notamment l'ouverture de la chromatine par la triméthylation des H3K4 par un complexe MLL1-RBBP5 (198) et l'activité des facteurs de transcription ETS1/2 en aval de la voie ERK/MAPK dans la sénescence induite par les oncogènes (199,200).

Bien qu'initialement décrit comme irréversible, l'arrêt du cycle cellulaire observé dans la sénescence varie en stabilité selon les inducteurs de sénescence, de même que selon le contexte de cellules normales ou cancéreuses. L'altération par mutation, délétion, ou silençage épigénétique de composantes des voies p53 et p16/RB pourrait expliquer cette instabilité. La sénescence induite par l'oncogène RAS engage ces deux voies antitumorales et l'inactivation des deux voies est requise pour contourner cette sénescence dans les cellules humaines normales, tandis que l'inactivation d'une seule voie suffit dans les cellules de souris (149). Ces dernières expriment toutefois l'enzyme télomérase (TERT), comme le font fréquemment les cellules cancéreuses, contribuant à l'immortalisation des cellules, à réduire les dommages à l'ADN télomérique et à promouvoir la résistance au stress répliatif (201,202).

### **1.5.3. Dommages à l'ADN**

L'activation de p53 dans la sénescence est intimement liée à une autre caractéristique des cellules sénescents, soit la présence de dommages à l'ADN (203). Ceux-ci sont présents entre autres dans la sénescence induite par les oncogènes, dans la sénescence induite par la thérapie, et celle induite par le stress oxydant (204). La présence de bris simple-brins ou double-brins dans l'ADN permet l'activation de kinases, respectivement ATR et ATM, qui permettent la phosphorylation subséquente de p53 en sérine 15 et son activation (205). ATR et ATM permettent également l'activation des kinases CHK1 et CHK2 en aval qui contribuent à la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) (206). Cette voie de réponse met en place l'arrêt du cycle cellulaire, dans certains cas l'apoptose ou la sénescence, puis les mécanismes de réparation spécifiques aux dommages à l'ADN, soit par recombinaison homologue, réparation par excision de base, jonction non-homologue des extrémités (207), etc. Parmi les cibles notables des kinases ATM/ATR, on note

les protéines 53BP1 et BRCA1, impliquées dans la recombinaison homologue, les protéines MDC1, TOPBP1 et l'histone H2A.X, dont la phosphorylation en sérine 139 ( $\gamma$ H2A.X) représente un marqueur de sénescence (208,209). L'activation de la voie du DDR peut contribuer à un arrêt en G2, au point de contrôle de l'ADN répliqué, avant l'entrée en mitose, ou encore à un arrêt en G1, au point de contrôle des dommages à l'ADN (206). Dans la sénescence, des dommages non-réparés peuvent demeurer de façon persistante dans la cellule sous forme de DNA-SCARS et peuvent donc contribuer à l'identification de ces cellules (210).

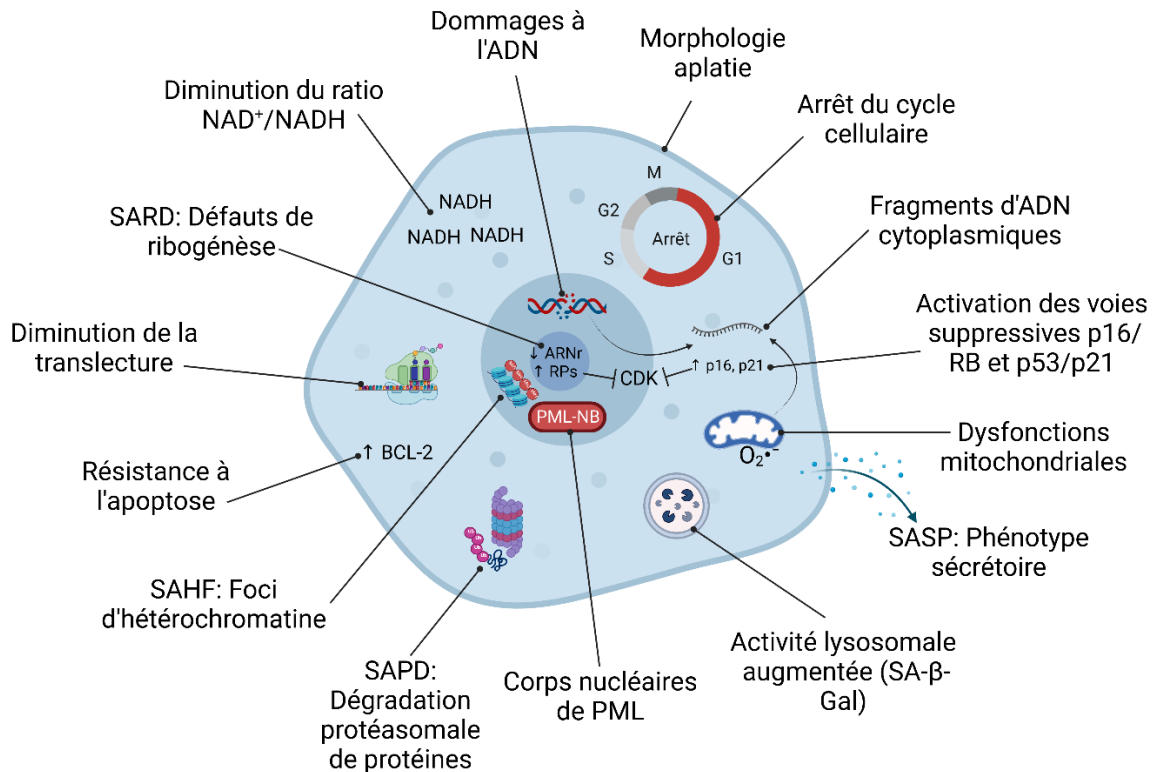
Les dommages à l'ADN endogènes peuvent être causés par l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, soit un sous-produit des dysfonctions mitochondriales présentes dans la sénescence ou via les NADPH oxydases cytoplasmiques, ou encore par le stress réplicatif (211). Dans la sénescence induite par RAS, une phase d'hyperprolifération précède généralement l'arrêt de prolifération (212), pendant laquelle des collisions entre des bulles de transcription et des polymérasés d'ADN hyperactives peuvent survenir, causant des bris dans l'ADN (213).

Ainsi, les cellules sénescents sont sujettes à une forte instabilité génomique, menant fréquemment à l'aneuploïdie. Les dommages à l'ADN peuvent également influencer sur la déposition de marques épigénétiques, l'ouverture de la chromatine et conséquemment la transcription.

#### **1.5.4. Altérations métaboliques et sécrétome**

En plus de l'arrêt du cycle cellulaire, que l'on peut observer par l'absence de synthèse d'ADN, les cellules pleinement sénescents sont également identifiables par plusieurs caractéristiques. Toutefois, aucun marqueur unique n'est universel et ne permet l'identification à lui seul des cellules sénescents. Il convient plutôt de les définir par un éventail de caractéristiques (**Figure 1.8**). Elles ont une morphologie aplatie et élargie. Elles sont métaboliquement actives, au contraire des cellules quiescentes (214). Elles ont aussi une activité lysosomale augmentée, avec une surexpression et une activité accrue de l'enzyme bêta-galactosidase, caractéristique que l'on nomme activité SA- $\beta$ -Gal (Senescence-Associated  $\beta$ -Galactosidase activity) (215). Cette fonction permet l'identification des cellules sénescents *in vitro* et sur des coupes de tissus par un essai biochimique en condition acide où l'activité de cette enzyme permet la dégradation d'un substrat artificiel, le X-Gal, en précipité bleu (215).





**Figure 1.8. Caractéristiques des cellules sénescents.**

Les cellules sénescents sont identifiables par la combinaison de multiples caractéristiques incluant celles illustrées ici. Elles ont fréquemment une morphologie aplatie, sont arrêtées en interphase, possèdent des dommages à l'ADN, une activation des voies de suppression tumorale p16/RB et p53/p21, des dysfonctions mitochondriales générant des ROS et une diminution du ratio  $NAD^+/NADH$ , ainsi qu'une relâche d'ADN au cytoplasme activant la voie cGAS-STING. Elles possèdent aussi un phénotype sécrétoire pro-inflammatoire, une activité SA- $\beta$ -Gal augmentée, une dégradation protéique active, une résistance augmentée à l'apoptose via l'expression de protéines antiapoptotiques comme BCL-2; une diminution de la translecture, de même que des foci d'hétérochromatine au noyau, des corps nucléaires de PML et des défauts variés de ribogénèse incluant la diminution de synthèse des ARNr et la concentration locale de protéines ribosomiques non-assemblées qui peuvent inhiber les CDK et le cycle cellulaire. SAHF, Senescence-associated heterochromatin foci; SAPD, Senescence-associated protein degradation; SARD, Senescence-associated ribogenesis defects; SA- $\beta$ -Gal, Senescence-associated beta-galactosidase activity; SASP, Senescence-associated secretory phenotype; ROS, Espèces réactives de l'oxygène. Figure réalisée avec BioRender.

Parmi les changements métaboliques associés aux cellules sénescents, on note également la présence de dysfonctions mitochondriales (216). Ceci s'accompagne de la production de ROS, de l'augmentation de la masse mitochondriale et d'une baisse de l'ATP cellulaire qui résulte en l'activation d'AMPK (217). Par conséquent, les cellules sénescents dépendent davantage d'une glycolyse augmentée. Les sénescences qui s'accompagnent de dysfonctions mitochondriales (MiDAS), comme la sénescence induite par RAS, ont également une diminution du ratio  $NAD^+/NADH$  et une augmentation des défenses antioxydantes (218). Les mitochondries

endommagées peuvent relâcher des médiateurs d'inflammation, comme de l'ADN mitochondrial (219). Celui-ci active des voies pro-inflammatoires lorsqu'il est libre dans le cytoplasme, comme la voie de l'inflammasome NLRP3 (216), de même que la voie cGAS-STING, également activée suivant la relâche de fragments de chromatine issus du noyau dans la sénescence (220). La voie cGAS-STING mène à l'activation d'une réponse aux interférons de type I (221). Les sénescences MiDAS ont conséquemment un phénotype sécrétoire différent des sénescences indépendantes de dysfonctions mitochondriales (218).

Le secrétome est une caractéristique importante des cellules sénescents qui leur permet de communiquer avec leur environnement et de l'influencer (222). Bien que les facteurs sécrétés varient selon l'inducteur de sénescence, ceux-ci peuvent inclure des interleukines (ex : IL-1, IL-6), des chimiokines (ex : IL-8, CXCL1, CXCL5, MCP-1), des inhibiteurs de protéases à sérine (ex : SERPINB4), des métalloprotéinases matricielles (ex : MMP1, MMP3, etc.), des eicosanoïdes, soit des lipides produits par les cyclooxygénases (COX), des phospholipides oxydés, des DAMP (damage-associated molecular patterns; ex : HMGB1) (223), etc. En plus des fonctions pro-inflammatoires et oncogéniques du SASP, celui-ci peut médier de la sénescence secondaire dans les cellules avoisinantes par sécrétion paracrine et juxtacrine (224,225). Parmi les régulateurs clés du SASP se trouvent les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  et p53, régulant différentes vagues de SASP dans la sénescence primaire et secondaire (223). Les cellules sénescents sécrètent également des vésicules extracellulaires, incluant des exosomes, soit de petites vésicules d'environ 100 nm de diamètre (226,227). De récentes études commencent à s'intéresser à leur cargo, identifiant de nombreux microARN et protéines qui voyagent via ces exosomes, toutefois l'impact physiologique de cette sécrétion reste à établir (228,229).

### **1.5.5. Phénotypes nucléaires, profil transcriptionnel, synthèse et dégradation protéique**

Les cellules sénescents peuvent également contenir des foci nucléaires nommés corps de PML (230). Ceux-ci semblent impliqués dans la formation d'hétérochromatine et la séquestration des facteurs E2F liés à Rb, contribuant donc à l'arrêt du cycle cellulaire des cellules sénescents (231). La surexpression de PML permet à elle seule d'induire la sénescence cellulaire (230). Ensuite, la présence de foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) est une autre

caractéristique notable (232). Ces foci sont visualisables par une coloration DAPI des cellules, et pourraient être associés à la répression de gènes pro-prolifératifs, soit des cibles d'E2F, dans les cellules sénescences (232). Ces zones d'hétérochromatine se formeraient justement au niveau des corps de PML, où les protéines régulatrices de la chromatine HIRA, HP1 et ASF1a, orchestrent la condensation de la chromatine et l'enrichissement en variant d'histone MacroH2A, réprimant localement l'expression génique (233). Elles sont également enrichies en marques épigénétiques répressives telles que H3K9me3 et H3K27me3 (234). D'autres études démontrent également que le regroupement d'hétérochromatine en foci serait assisté par la perte d'ancrage ou à la redistribution de ces ancrages de la chromatine à la lamina nucléaire, conséquence de la perte de protéines comme la lamineB1 (235,236).

Or, ces SAHF ne signifient pas que la transcription soit moins active au niveau global dans les cellules sénescences. Il semblerait plutôt qu'une hypométhylation globale de l'ADN caractérise les cellules sénescences, menant à l'hypertranscription de nombreuses régions chromosomiques, dont des régions satellites ou répétées, contribuant à l'instabilité génomique, ou encore des régions à réplication tardive comme les domaines associés à la lamine (LAD) (237). Curieusement, la comparaison de ces patrons de méthylation à ceux observés dans les cellules cancéreuses a démontré d'importantes similitudes, pouvant contribuer au modèle selon lequel les cellules cancéreuses originent de cellules ayant contourné les barrières antitumorales comme la sénescence cellulaire (237,238).

Au niveau de la synthèse protéique, là aussi il existe des paradoxes (239). D'une part, avec l'arrêt de prolifération cellulaire, les dommages à l'ADN et les gènes réprimés, le besoin de croissance d'une cellule sénescence n'est pas grand. Par ailleurs, le phénotype sécrétoire très actif monopolise le processus de traduction (240,241). Conséquemment, on pourrait encore une fois définir leur traduction globale comme diminuée, mais la traduction spécifique de certains ARNm est quant à elle augmentée dans la sénescence (242). À cet effet, les cellules sénescences requièrent l'activité du complexe mTORC1 pour promouvoir la traduction d'ARNm possédant une séquence oligopyridimine dans leur 5'UTR (TOP mRNAs), soit des ARNm que l'on pourrait décrire comme prioritaires en situation de stress (243,244). Cela inclut notamment les transcrits des protéines ribosomiques. Notre groupe de recherche a aussi rapporté que les cellules sénescences avaient une

diminution de la translecture, c'est-à-dire que la traduction des cadres de lecture était davantage respectée et que les protéines étendues en 3' étaient moins fréquemment produites que dans des cellules non-sénescentes ou qui avaient contourné la sénescence (245). Cette fidélité de traduction pourrait être associée aux propriétés suppresseurs de tumeurs de la sénescence, puisqu'elle limite la diversité du protéome cellulaire et empêche la production de protéines variantes au potentiel oncogénique.

Finalement, au niveau post-traductionnel, une dégradation protéique active associée à la sénescence (SAPD) a été décrite par notre équipe et implique l'activité du système ubiquitine-protéasome (246). L'hyperactivation de ERK dans la sénescence induite par les oncogènes de même que dans la sénescence répllicative mène à l'hyperphosphorylation de certaines cibles qui sont conséquemment dégradées par le protéasome (246). Il s'agit notamment de protéines requises pour la progression dans le cycle cellulaire comme la cycline D1, d'oncogènes importants comme MYC et STAT3, mais aussi de transporteurs mitochondriaux (TOMM70A, etc.) ou de protéines liées à la biogenèse des ribosomes comme RSL1D1, DDX21, NPM1 (246), etc. Il est intéressant de mentionner que la déplétion individuelle de ces mêmes facteurs de la ribogénèse, lorsque médiée par l'utilisation de shARN, permet l'induction de la sénescence cellulaire (190).

La voie de dégradation protéique par autophagie, quant à elle, possède à la fois des rôles pro-sénescence et anti-sénescence (247). Elle régule des phénotypes nucléaires pro-sénescence, via la dégradation de la lamine B1 et de DNMT1 (248,249). Puis, elle permet l'approvisionnement en acides aminés de façon localement couplée aux besoins augmentés de synthèse de protéines du SASP (241). D'un autre côté, lorsque la sénescence est causée par l'accumulation d'agrégats protéotoxiques, par des macromolécules oxydées ou par des organelles dysfonctionnelles, l'augmentation de l'autophagie mène plutôt à la résolution du stress cellulaire et permet de favoriser à nouveau la prolifération cellulaire (250).

Finalement, une dernière caractéristique des cellules sénescentes qui a été récemment identifiée par notre laboratoire est la présence de défauts de ribogénèse. Puisque les travaux que nous avons effectués dans les articles 2 et 3 demandent une compréhension plus approfondie de ces altérations, nous dédierons la prochaine section à l'illustration des processus normaux et anormaux liés à cette fonction cellulaire essentielle qu'est la biogénèse des ribosomes.

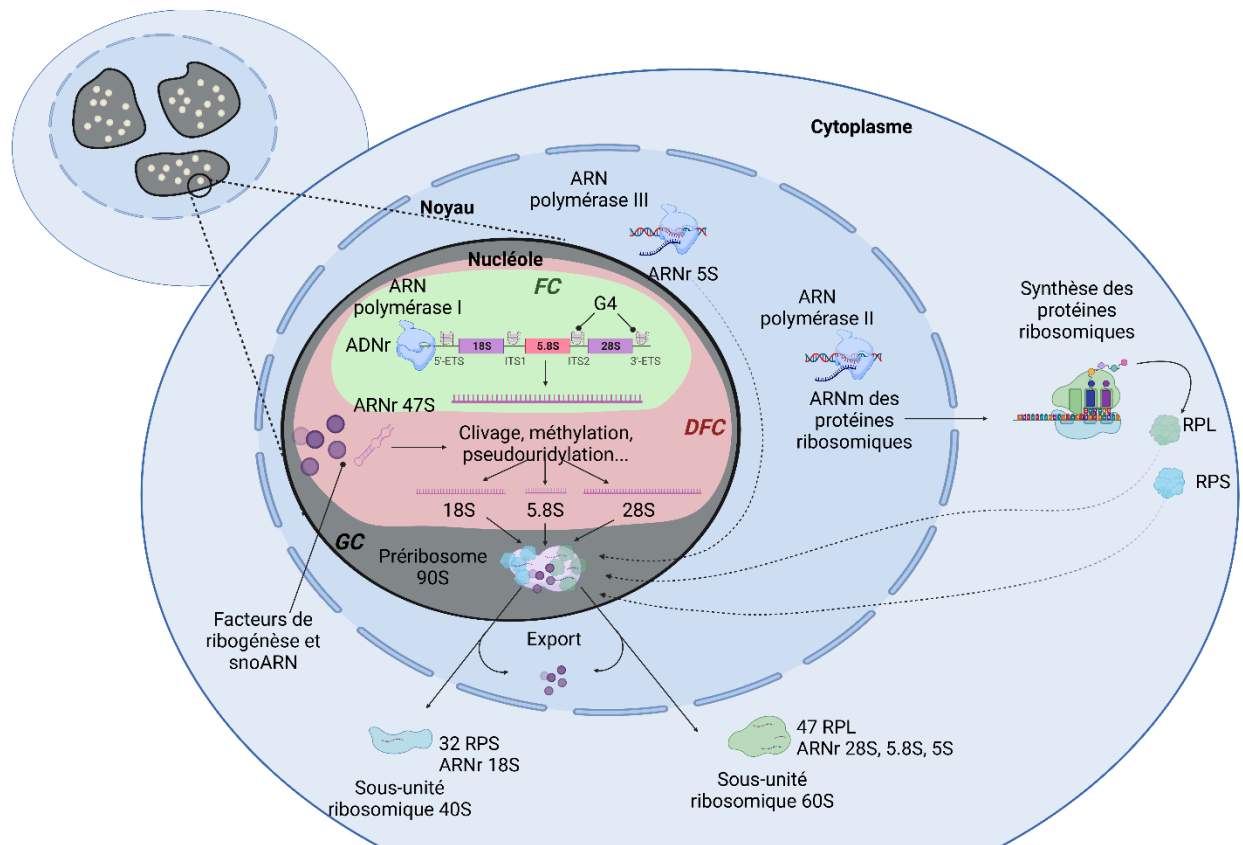
## 1.5.6. Défauts de biogénèse ribosomique associés à la sénescence

Ainsi, pour décrire les défauts de biogénèse ribosomique qui surviennent dans la sénescence, il faut commencer par expliquer comment cela se déroule en temps normal.

### 1.5.6.1. Biogénèse des ribosomes

Les ribosomes qui constituent la machinerie de synthèse protéique cellulaire sont synthétisés en deux sous-unités ribosomiques. La sous-unité 40S eucaryote incorpore un ARN ribosomique (ARNr), le 18S, et 32 protéines ribosomiques, tandis que la sous-unité 60S eucaryote incorpore trois ARN ribosomiques, les ARNr 28S, 5.8S et 5S ainsi que 47 protéines (251). La transcription de l'ARNr 5S est effectuée par le complexe ARN polymérase III, tandis que les autres ARNr sont transcrits par le complexe ARN polymérase I sous forme d'un long précurseur 47S qui sera clivé et modifié pour former les ARNr matures 18S, 5.8S et 28S. Le siège de la transcription des ARNr est le nucléole, un compartiment sous-nucléaire sans membrane. Les protéines ribosomiques sont quant à elles des produits de la transcription par l'ARN polymérase II qui ont été traduits par des ribosomes préexistants au cytoplasme. L'efficacité de la biogénèse des ribosomes réside donc dans la coordination des étapes multiples de transcription par trois polymérases, de même que dans l'activité coordonnée d'environ 300 facteurs participant à la maturation des ARNr, à l'assemblage des sous-unités ribosomiques et à leur export vers le cytoplasme (**Figure 1.9**) (252).

Dans le présent ouvrage, nous nous concentrerons sur la régulation de la transcription par l'ARN polymérase I et sur les étapes successives de maturation des ARNr. Les gènes des ARNr (47S) sont présents à environ 350-400 répétitions, disposées sur 5 paires de chromosomes, soit les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 chez l'humain, à raison d'environ 70-80 répétitions en tandem par chromosome (253). Chaque segment codant correspond à environ 13-15 Kb et est séparé du prochain par une région intergénique d'environ 30 Kb. La région codante contient des espaceurs externes transcrits (ETS) en 5' et en 3', de même que des espaceurs internes transcrits (ITS) 1 et 2 respectivement entre la séquence du 18S et du 5.8S et entre cette dernière et celle du 28S. L'ETS-3' contient une séquence de terminaison où se lie le facteur de terminaison de la transcription (TTF1) qui permet de terminer l'élongation du transcrit primaire.



**Figure 1.9. Vue simplifiée de la biogénèse des ribosomes.**

Dans le coin supérieur gauche, une cellule entière est représentée avec l'organisation normale des nucléoles et de leurs sous-compartiments sans membranes. Au plan principal, une vue simplifiée montrant un seul centre fibrillaire (FC, en vert) et sa composante fibrillaire dense (DFC, en rouge) est représentée au sein de la composante granulaire (GC, en gris) d'un nucléole unique, de façon à montrer la répartition des étapes de la ribogénèse dans chaque sous-compartiment nucléolaire. Au noyau, l'ARN polymérase III transcrit l'ARNr 5S, tandis que l'ARN polymérase II transcrit les gènes des protéines ribosomiques dont les ARNm seront traduits au cytoplasme. Au nucléole, dans les centres fibrillaires, l'ARN polymérase I transcrit les autres ARNr sous forme d'un long précurseur 47S issu de l'ADNr sous forme de séquences répétées riches en motifs G-quadruplex. Le précurseur d'ARNr 47S sera clivé et modifié par un ensemble des facteurs de ribogénèse et de snoARNs dans la composante fibrillaire dense. Les ARNr matures ainsi que les protéines ribosomiques sont assemblés au sein de la composante granulaire du nucléole sous forme de préribosome 90S qui terminera sa maturation au noyau en sous-unités matures 40S et 60S avant que ces dernières soient exportées au cytoplasme de façon concomitante à la relâche des facteurs d'assemblage et d'export. La petite sous-unité ribosomique 40S contient l'ARNr 18S et 32 protéines RPS, tandis que la grande sous-unité 60S contient les ARNr 28S, 5.8S, 5S et 47 protéines ribosomiques RPL. RPL, Ribosomal protein of the large subunit; RPS, Ribosomal protein of the small subunit; snoARN, petit ARN nucléolaire; ARNr, ARN ribosomique; ARNm, ARN messenger; ADNr, ADN ribosomique; 5'/3'-ETS, Espaceur externe transcrit 5'/3'; ITS1-2, Espaceur interne transcrit 1 ou 2; G4, G-quadruplex; FC, fibrillar center; DFC, Dense fibrillar component; GC, granular component. Figure réalisée avec BioRender.

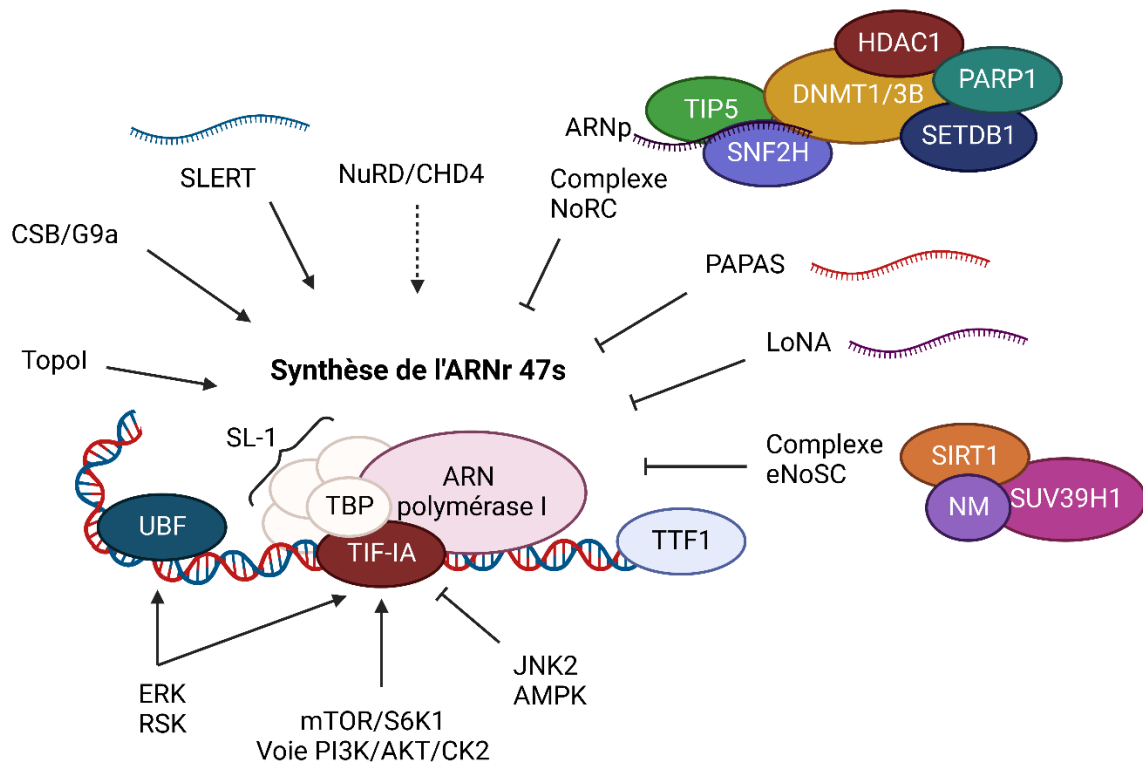
Ces régions chromosomiques contenant les répétitions d'ADNr sont appelées NOR ou régions organisatrices du nucléole puisque c'est la présence de chromatine ouverte arrangée topologiquement et la liaison d'une multitude de facteurs qui provoquent la séparation de phase

nécessaire à la création d'un compartiment distinct, le nucléole (253). Les gènes actifs pour la transcription se trouvent donc disposés au centre du nucléole, tandis que les copies inactives sous forme d'hétérochromatine sont exclues à la périphérie du nucléole (254). Les gènes d'ADNr ont la particularité d'être riches en nucléotides guanidine et cytidine (GC) donnant lieu à des motifs G-quadruplex dans l'ADN par empilement de bases G stabilisées via des appariements de type Hoogsteen (255-257).

Le nucléole se divise lui-même en plus d'un compartiment discret, identifiables par la présence de certaines protéines (258). La transcription de gènes d'ADNr en ARNr a lieu dans un ou plusieurs centres fibrillaires (FC). Ces centres transcriptionnels contiennent toute la machinerie de l'ARN polymérase I, avec ses différentes sous-unités dont RPA194/POLR1A, la sous-unité principale et la plus grosse, et RPA12/ZNRD1, une sous-unité impliquée dans le clivage de l'ARN et la terminaison de la transcription (259); de même que le facteur UBF sur lequel l'ADN ribosomique s'enroule, ainsi que les facteurs de transcription qui modulent l'activité de la Pol I. Ces centres sont eux-mêmes entourés d'une zone ayant un aspect plus compact en microscopie que l'on nomme composante fibrillaire dense (DFC). Dans cette seconde couche, les étapes de clivage du 47S sont entamées et les ARNr sont modifiés par méthylation et pseudouridylation. On y trouve des méthyltransférases comme la fibrillarine et les autres composantes de la particule ribonucléoprotéique U3 (U3 snoRNP). Cette dernière contient les petits ARN nucléolaires (snoARN) nécessaires à la maturation de l'ARNr 18S. Dans le dernier compartiment, englobant les différents DFC, se trouve la composante granulaire (GC), où la maturation des ARNr s'achève et l'assemblage avec les protéines ribosomiques s'initie. Des protéines comme la nucléophosmine (B23/NPM1) s'y trouvent impliquées dans un système de navette d'import des protéines ribosomiques et d'export des préribosomes vers le nucléoplasme puis le cytoplasme. Les frontières discrètes entre chaque sous-compartiment nucléolaire semblent attribuables aux propriétés viscoélastiques de ceux-ci qui sont générés par l'abondance de protéines possédant des domaines protéiques intrinsèquement désordonnés, notamment pour FBL et NPM1 (260). À titre d'exemple, pour la fibrillarine, son domaine méthyltransférase et son domaine riche en résidus glycine et arginine se partitionnent de façon différente à la bordure FC/DFC pour diriger les ARNr naissants du centre vers la périphérie et permettre une maturation efficace (261).

### 1.5.6.2. Régulation de la biogénèse ribosomique

L'ADNr se trouve sous plusieurs formes dans la cellule, soit sous forme d'euchromatine active pour la transcription, d'hétérochromatine transcriptionnellement inactive ou finalement à l'état « poised ». Dans les cellules différenciées, environ la moitié des répétitions sont sous forme d'euchromatine tandis que dans les cellules souches pluripotentes embryonnaires, la majorité des copies sont actives dû à l'inaction de complexes répresseurs de la chromatine (262). Le silençage des gènes d'ADNr et leur arrangement sous forme d'hétérochromatine est régulé par différents acteurs cellulaires (**Figure 1.10**).



**Figure 1.10. Facteurs régulant la synthèse des ARNr par l'ARN polymérase I.**

Au centre, le complexe de l'ARN polymérase I est représenté de façon simplifiée, avec le facteur d'initiation TIF-IA/hRRN3, le facteurs SL-1 contenant TBP et les facteurs associés. Le facteur UBF lié à la chromatine en maintient l'ouverture, tandis que le facteur TTF1 est lié à la séquence de terminaison de cette répétition d'ADNr. La synthèse des ARNr est régulée de façon épigénétique et au niveau de la compaction de la chromatine par différents complexes protéiques et longs ARN non-codants, de façon positive ou négative (voir haut du schéma). L'étape d'initiation de la transcription est également contrôlée par des modifications post-traductionnelles activatrices ou inhibitrices centrées sur le facteur TIF-IA/hRRN3 et sur UBF au niveau de la chromatine (voir bas du schéma). Figure réalisée avec BioRender.



D'une part, un ARN promoteur (ARNp), soit un long ARN non-codant transcrit depuis la région intergénique, guide le complexe remodelleur du nucléole (NoRC), composé de TIP5 et de SNF2H, vers le site de départ de la transcription (TSS) (263,264). Le NoRC sert alors de plateforme de recrutement pour DNMT1/3B, HDAC1, PARP1 et SETDB1 qui, par la déposition de marques épigénétiques répressives sur l'ADNr et les histones, vont remodeler la chromatine en hétérochromatine (263,265). Ce complexe permet de façon constitutive de n'avoir qu'une fraction des NOR actifs pour la transcription (264). De nombreux autres ARN non-codants régulent négativement (PAPAS (266), LoNA (267)) ou positivement (SLERT (268), etc.) la transcription des ARNr et même les étapes de maturation des ARNr (snoARNs, SAMMSON (269), etc.). Puisque la plupart de ceux-ci constituent des transcrits de l'ARN polymérase II, il est possible qu'ils contribuent à la bonne coordination de l'activité des diverses polymérases dans la biogénèse ribosomique. Pour une revue plus complète de ces ARN non-codants, voir (270). Lorsque le statut énergétique de la cellule est défavorable à la prolifération et que le ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  est élevé, le complexe eNoSC (energy-dependent nucleolar silencing complex), composé de SIRT1, de SUV39H1 et de la nucléométhyline (NM), va contribuer à la formation d'hétérochromatine dans l'ADNr afin de limiter le processus le plus coûteux énergétiquement pour la cellule, soit la biogénèse ribosomique (271).

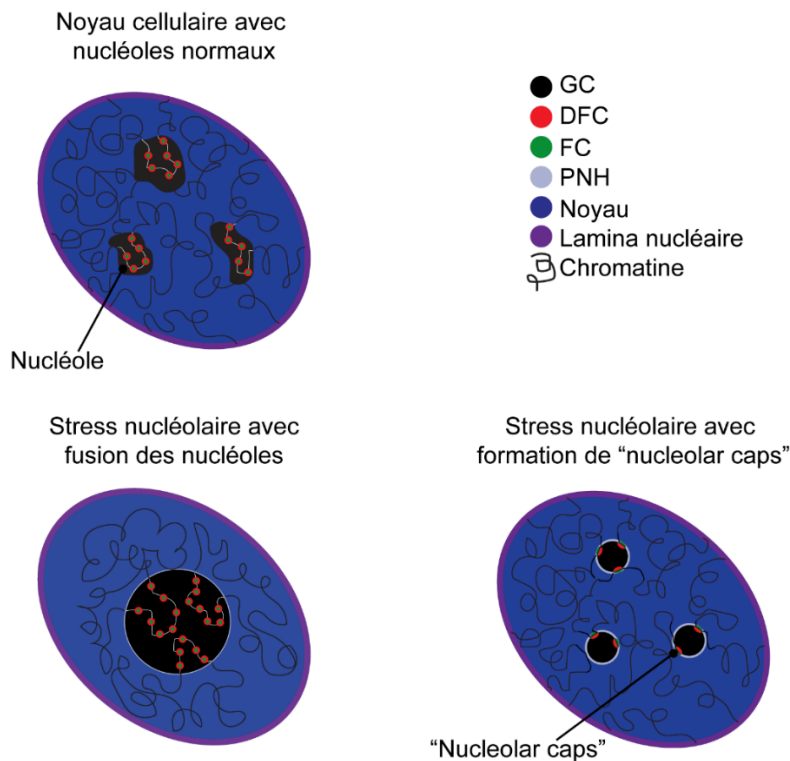
À l'opposé, l'ouverture de la chromatine dépend majoritairement de la présence du facteur de transcription UBF capable de déplacer l'histone H1 et de plier l'ADNr via ses domaines HMG1 et 2 (272). UBF permet le remplacement des nucléosomes par de nouvelles structures nommées « enhancesomes » à travers l'ensemble des répétitions d'ADNr (272,273). Ceci permet le recrutement du facteur SL-1, composé de la TATA-binding protein (TBP) et de plusieurs facteurs associés (TAF), ainsi que des sous-unités PAF53 et PAF49, puis de l'ARN pol I via TIF-IA (hRRN3), pour former le complexe de pré-initiation (PIC). Les facteurs NOLC1 et Treacle/TCOF1 participent aussi au recrutement de la Pol I sur les gènes des ARNr (274). Parmi les autres complexes qui participent à la formation d'euchromatine au nucléole, on trouve le complexe CSB et G9a (275). Ce dernier semble requis pour le maintien de l'euchromatine, puisque la déplétion de l'une ou l'autre de ses composantes induit l'hétérochromatinisation de l'ADNr. Finalement, le complexe NuRD/CHD4 est responsable de l'état « poised » de certaines copies d'ADNr, correspondant à un statut « prêt » pour la transcription mais inactif (276). Ces répétitions portent

des marques d'histones bivalentes, à la fois répressive et actives, où le PIC peut se lier mais sans initier la transcription (276). L'activité de CSB et G9a est requise pour favoriser une activité transcriptionnelle à ces sites « prêts ». Finalement, en complément de tous ces facteurs modulant l'ouverture de la chromatine, la topoisomérase I semble aussi être un acteur essentiel de la ribogénèse. D'une part, cette conclusion semble logique considérant la localisation majoritaire de la TopoI dans les centres fibrillaires du nucléole (277,278). De plus, l'inhibition de la topoisomérase I par des inhibiteurs pharmacologiques, comme la camptothécine, mène à une inhibition de la transcription et la maturation des ARNr (279), et inversement, l'inhibition de leur transcription par l'actinomycine D mène à la relocalisation de la TopoI hors du nucléole (280). Toutefois, il est incertain si l'activité catalytique de la TopoI, soit de relaxer le surenroulement dans l'ADN causé par la réplication ou la transcription, est la seule activité importante de cette protéine dans ce contexte. D'autres études rapportent les fonctions moins connues de la TopoI comme protéine d'échafaudage permettant le recrutement de facteurs pouvant moduler l'ouverture de la chromatine ou la transcription comme des histone désacétylases, notamment Sir2p chez la levure (homologue à la Sirtuine 1 chez l'humain) (281,282).

La biogénèse des ribosomes est également intimement liée au statut énergétique et prolifératif de la cellule par la régulation des facteurs associés à la Pol I via des modifications post-traductionnelles. Plus précisément, l'étape d'initiation de la transcription constitue un point de contrôle important. La modification d'UBF et du facteur TIF-IA a des conséquences immédiates sur le recrutement de l'ARN polymérase I et constituent donc les principaux points de contrôle. La présence de mitogènes stimulant la prolifération cellulaire et l'activité des kinases ERK/MAPK résulte en la phosphorylation directe, ou indirecte via RSK, d'UBF et de TIF-IA à plusieurs sites (111,112). Les facteurs de croissance, de même que la signalisation par l'insuline, mènent également à la phosphorylation de ces deux cibles par la voie PI3K/AKT/CK2 (283,284). De même, la présence de nutriments stimule également l'activité Pol I via mTORC1/S6K1 sur UBF et TIF-IA (285,286). À l'opposé, une élévation du ratio AMP/ATP, synonyme de stress énergétique, mène à l'activation d'AMPK qui régule TIF-IA par une phosphorylation inhibitrice (287). Divers autres stress vont également diminuer la transcription des ARNr via l'activité de JNK2 sur TIF-IA (288).

### 1.5.6.3. Stress nucléolaire et sénescence

Le nucléole a aussi comme particularité d'être influencé par le stress cellulaire. De nombreuses études ont montré des changements morphologiques, des changements de contenu protéique et des altérations fonctionnelles au nucléole suivant divers stress comme un choc thermique ou osmotique, de l'hypoxie, des rayons UV, des inhibiteurs de la biogénèse ribosomique, du stress énergétique comme le jeun cellulaire, et même avec plusieurs inducteurs de sénescence. Au niveau morphologique, certains stressseurs du nucléole vont mener à la fusion de plusieurs nucléoles en un seul, tandis que d'autres vont induire une diminution du volume nucléolaire, voire une fragmentation sous-nucléolaire de façon concomitante avec l'inhibition de la transcription par l'ARN polymérase I (**Figure 1.11**).



**Figure 1.11. Altérations morphologiques du nucléole en présence de stress nucléolaire.**

En condition normale, les nucléoles sont multiples et composés de plusieurs centres fibrillaires (FC) entourés de composante fibrillaire dense (DFC), au sein d'une composante granulaire (GC) de forme variable (panneau supérieur gauche). En condition de stress nucléolaire, les nucléoles fusionnent parfois pour former un nucléole plus grand et arrondi (panneau inférieur gauche) ou encore, en présence de dommages à l'ADNr et/ou d'une inhibition de la transcription par l'ARN polymérase I, la taille des nucléoles se réduit considérablement et les FC et DFC s'assemblent en périphérie sous forme de « nucleolar caps » (panneau inférieur droit). PNH, Hétérochromatine périnucléolaire.

Dans ce dernier cas, la structure tripartite du nucléole (GC, DFC, FC) se modifie et les FC et DFC se condensent à la périphérie du GC pour former des structures nommées « nucleolar caps » (289). De même, les protéines du GC comme B23/NPM1 sont souvent relocalisées au nucléoplasme (290), tandis que des protéines ribosomiques s'accumulent au nucléole, voire au nucléoplasme, où elles jouent de nouveaux rôles. Dans les cellules où le suppresseur de tumeurs p53 est fonctionnel, l'accumulation des protéines ribosomiques RPL5 et RPL11 hors du ribosome mène à la séquestration de HDM2 dans un complexe contenant également l'ARNr 5S, ayant pour effet de stabiliser p53 (291,292). La stabilisation de p53 permet une réponse au stress cellulaire et peut conséquemment induire un arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, la réparation de dommages à l'ADN ou encore la mort cellulaire par apoptose (293).

Dans les cellules dépourvues de p53, les protéines ribosomiques libres peuvent également supprimer l'expression ou la fonction de c-MYC (294), soit un régulateur positif de la transcription des ARNr, et engendrer la diminution d'expression de E2F1 soit un facteur pro-prolifératif (295). De plus, RPL3 peut mener à l'induction p53-indépendante de p21 via le facteur de transcription SP1, une façon d'arrêter le cycle cellulaire en contournant le besoin pour un p53 intact (296). En somme, la capacité du nucléole à réagir aux différents stress cellulaires a permis de nommer un nouveau point de contrôle cellulaire, soit le point de contrôle de la ribogénèse altérée (impaired ribosome biogenesis checkpoint, IRBC). Bien que prometteur comme nouveau mécanisme anticancéreux, de nouvelles branches de l'IRBC indépendantes de p53 sont encore à identifier pour que celui-ci puisse être appliqué efficacement à des cancers comme celui du pancréas.

À cet effet, des études réalisées dans notre laboratoire dans la sénescence induite par RAS ont identifié des protéines ribosomiques possédant de nouvelles fonctions dans la régulation du cycle cellulaire, établissant un lien entre les défauts de ribogénèse associés à la sénescence (SARD, Senescence-associated ribogenesis defects), les protéines RPS14 et RPL22, et l'inhibition des complexes CDK4-6/Cycline D (190,191). En effet, ces protéines ribosomiques ont été rapportées comme de nouveaux inhibiteurs de CDK, empêchant la phosphorylation de Rb et maintenant l'inhibition des facteurs E2F, bloquant la transition G1/S (190,191). La cause des défauts de ribogénèse n'a toutefois pas été établie clairement dans le modèle RAS, mais le phénomène a pu être reproduit dans la sénescence répllicative de même que dans les sénescences induites par PML

ou par STAT5 (190). Dans cette même étude, Lessard *et al.* ont montré que la déplétion de facteurs régulant la ribogénèse tels que RSL1D1, DDX21, Nucléostémine et EBP2 suffisait à induire la sénescence dans un modèle de fibroblastes humains (190). Finalement, dans la sénescence induite par RAS, la forme du nucléole se trouve modifiée, alors que celui-ci gagne en diamètre et arbore une forme particulièrement arrondie, une caractéristique qui pourrait être attribuable à l'abondance de protéines ribosomiques qui s'y accumulent ou encore à des modifications de l'attachement du nucléole à la chromatine périnucléolaire voire à la lamina nucléaire.

D'autres groupes ont montré des altérations de la transcription des ARNr ou de la structure nucléolaire en lien avec la sénescence, soit en tant que cause ou que conséquence. À titre d'exemple, la déplétion de la sous-unité nucléométhylène du complexe répresseur eNoSC, de même que la déplétion de la sous-unité TIP5 du complexe NoRC, ont été montrées comme suffisantes pour favoriser l'échappement de la sénescence induite par la doxorubicine, démontrant l'importance de l'extinction de la ribogénèse pour le maintien du phénotype sénescents (297). Il a aussi été montré que la surexpression d'E2F1 et de p14ARF, des inducteurs de sénescence, menait à une réduction de la transcription du 47S corrélée avec une baisse de phosphorylation du facteur UBF (298,299). Toutefois, le lien entre la sénescence et la régulation altérée de la machinerie de transcription des ARNr est encore à faire. Ainsi, l'article 2 qui sera présenté dans cette thèse décrit notre contribution à la découverte d'un nouveau phénotype nucléolaire associé à la sénescence et impliquant le complexe ARN polymérase I.

### **1.5.7. Résistance à l'apoptose et approches sénotherapeutiques**

Finalement, grâce à un certain nombre des marqueurs susmentionnés, il devient possible d'identifier les cellules sénescents dans différents contextes, *in vitro* comme *in vivo*. Toutefois, le défi restant est de les cibler spécifiquement pour les éliminer, de façon à bloquer le développement tumoral si ces cellules se trouvent dans des lésions pré-cancéreuses ou cancéreuses, ou encore pour éviter l'apparition de maladies liées au vieillissement et favoriser une meilleure santé à un âge avancé. Par des moyens génétiques faisant appel à l'expression d'un gène-suicide spécifique aux cellules sénescents, l'élimination de ces dernières a permis d'améliorer de façon marquée la condition générale de vieilles souris (165). Conséquemment, l'étape suivante est d'atteindre ces résultats par moyen pharmacologique pour pouvoir l'appliquer chez l'humain. Or, éliminer les

cellules sénescences n'est pas simple car malgré les dommages à l'ADN et dysfonctions variées qu'elles possèdent, les cellules sénescences sont viables et caractérisées par une résistance accrue à l'apoptose (300). En effet, elles mettent en place diverses voies de signalisation pro-survie, tel que des mécanismes dépendants de PI3K/AKT, de la signalisation Ephrine, d'inhibiteurs de protéases à sérine (SERPIN B), de p21 et même de facteurs anti-apoptotiques tels que BCL-xL et MCL-1 (300). En ce sens, beaucoup d'efforts sont déployés dans la communauté scientifique pour développer des inhibiteurs de ces mécanismes de résistance à l'apoptose spécifiques aux cellules sénescences, de façon à promouvoir la sénolyse, i.e. l'élimination spécifique de cellules sénescences (301). La combinaison de Dasatinib, ciblant la signalisation Ephrine, et de Quercetine, ciblant les voies PI3K et les protéines SERPINE, s'est montrée prometteuse à cet effet (300). De même, le navitoclax (ABT-263), ciblant les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2, tels que BCL-xL, BCL-2, BCL-W et à un moindre niveau MCL-1, se démarque également (302). Le navitoclax est actuellement testé dans des essais cliniques de phase 3 au Québec pour le traitement de la myélofibrose, un cancer de la moelle osseuse (études M16-191 et M20-178, OncoQuébec), et dans des études de phases 1 et 2 pour diverses tumeurs solides, notamment celles possédant des mutations de RAS, en combinaison avec d'autres agents susceptibles d'induire de la sénescence cellulaire (étude NCT02079740, NCT00887757, etc.).

Mis à part les inhibiteurs directs, une autre classe d'agents sénolytiques a également vu le jour, soit les PROTACs (PROteolytic TARgeting Chimeras). Il s'agit de molécules bifonctionnelles qui agissent comme connecteurs entre une protéine à dégrader et une protéine de type E3 ligase, fonctionnant dans le système ubiquitine-protéasome et dont la fonction est de cibler des ligands pour l'ubiquitination et la dégradation (303). Bien que les PROTACs aient été imaginés pour d'autres buts, leur utilisation pour la sénolyse est très pertinente considérant le SAPD et l'autophagie élevée des cellules sénescences. Un bon exemple de PROTAC sénolytique est le PZ15227, un dérivé du navitoclax, qui permet d'induire la dégradation de BCL-xL en le connectant à la E3 ligase CRBN (Cereblon). Cette amélioration du navitoclax diminue la toxicité de l'agent dans les cellules non-sénescences comme les plaquettes qui n'expriment pas ou peu cette E3 ligase (304). De nombreux autres agents sénolytiques de classes variées ont vu le jour dans les dernières années, démontrant toute l'effervescence de ce champ de recherche (305).

Parmi les autres classes d'agents sénotherapeutiques, les agents sénomorphiques constituent une variante des sénolytiques. Il s'agit de molécules qui vont cibler les caractéristiques nuisibles des cellules sénescents, principalement leur phénotype sécrétoire, sans toutefois éliminer complètement les cellules sénescents. Il peut s'agir par exemple de cibler des régulateurs transcriptionnels du SASP, de favoriser l'élimination de l'ADN cytoplasmique pour éviter l'activation de voies pro-inflammatoires, ou encore de réduire la production de dérivés réactifs de l'oxygène par la mitochondrie (306). Cette idée a émergé suivant l'observation que l'élimination complète de cellules sénescents dans un organisme peut également mener à des effets secondaires comme des défauts de cicatrisation et de la fibrose dans certains organes (165,172,307). Dans une visée d'améliorer la santé générale des individus, une approche sénolytique générant des effets secondaires significatifs serait moins acceptable.

Par ailleurs, avec l'objectif de cibler des maladies potentiellement mortelles comme les cancers, les scientifiques entrevoient une plus grande tolérance à ces effets indésirables si l'approche sénolytique permet d'améliorer le traitement de ces cancers. En effet, une stratégie anticancer qui en découle est l'approche « one-two punch ». Cette stratégie combine l'utilisation d'une thérapie pro-sénescence, comme certaines chimiothérapies, avec l'utilisation d'un sénolytique. Cette proposition sera détaillée davantage dans l'article 3.

Ainsi dans la dernière partie de cette introduction, il sera question des thérapies utilisées actuellement ou envisagées pour traiter le cancer du pancréas. Nous explorerons comment ces thérapies peuvent faire appel à la sénescence cellulaire, voire créer des défauts de biogénèse ribosomique, des conditions exploitables pour le design d'approches sénotherapeutiques anticancéreuses dans le cancer pancréatique, soit le sujet des articles 2 et 3 présentés dans cette thèse.

## **1.6. Avenues thérapeutiques dans le traitement du cancer du pancréas**

À la lumière de ce qui précède, de grandes avancées ont été faites récemment dans la compréhension de la biologie du cancer pancréatique. Malgré cela, les options thérapeutiques actuelles restent limitées et n'ont que peu évolué dans les dernières années. En effet, lorsque la

tumeur est détectée précocement, on peut procéder à sa résection par chirurgie. La chirurgie de Whipple, aussi appelée pancréatoduodénectomie, consiste à retirer une portion importante de la tête du pancréas (lieu où se forme le plus souvent la tumeur) ou la totalité du pancréas, de même qu'une portion du duodénum, du canal cholédoque ainsi que la vésicule biliaire (308). Cette opération, bien qu'efficace, a d'importantes conséquences pour le patient au niveau de la digestion et de la régulation de la glycémie vu les fonctions importantes du pancréas dans la sécrétion d'enzymes digestives et d'hormones hypo et hyperglycémiantes.

Pour les cancers de stade avancé et métastatiques, la chirurgie est souvent impossible et les traitements standards font appel à différents agents chimiothérapeutiques. D'une part, la gemcitabine, un analogue de nucléotide cytidine peut, après phosphorylation, s'incorporer dans l'ADN et causer des défauts de synthèse qui sont cytotoxiques. La gemcitabine est parfois combinée à un analogue de paclitaxel (nab-paclitaxel) qui est conjugué à l'albumine (308). Connaissant la tendance des cellules cancéreuses pancréatiques à collecter l'albumine par macropinocytose pour obtenir les acides aminés requis pour la synthèse protéique, cette version modifiée du stabilisateur de fuseau mitotique permet une cytotoxicité augmentée dans les cellules cibles. Finalement, le dernier traitement standard qui est généralement offert de façon palliative, et non curative, aux patients atteints de cancers pancréatiques de stade avancé est la combinaison FOLFIRINOX. Ce cocktail chimiothérapeutique est composé d'acide folinique, de 5-fluorouracile (5-FU), d'irinotécan et d'oxaliplatine.

Le 5-FU est un analogue d'uracile avec un atome de fluor en position C5. Ses métabolites peuvent s'incorporer dans l'ARN, voire l'ADN et en inhiber la synthèse. De plus, le métabolite FdUMP du 5-FU bloque l'activité de l'enzyme thymidylate synthase (TS) responsable de la modification du dUMP en dTMP, l'étape limitante dans la synthèse de thymidine, affectant la synthèse de l'ADN (309). L'acide folinique, aussi nommé leucovorin, remplace le pool de donneurs de groupements méthyles, soit le cofacteur de la TS. Ceci augmente la liaison du 5-FU à la TS, par la formation d'un complexe ternaire avec le méthyle-THF (309). Les effets du 5-FU sur l'ARN peuvent notamment impliquer des erreurs de maturation ou d'épissage, entre autres dans l'ARNr, de même que des changements de modifications de l'ARN, autant dans l'ARNr que les ARNt (309). Le 5-FU est connu pour mener à la stabilisation de p53 et pour induire une apoptose



dépendante de celui-ci. Toutefois, les mécanismes exacts menant à l'activation de cette voie suivant les défauts dans l'ARN sont encore mal compris (310).

L'irinotécan, quant à lui, est un dérivé de la camptothécine, soit un inhibiteur de la topoisomérase I. L'irinotécan est métabolisé dans le foie ou dans le plasma en son composé actif, le SN-38 (311). L'inhibition de la topoisomérase I par ce dernier empêche la religation du brin d'ADN coupé lors de la relaxation de l'ADN surenroulé. Le complexe ternaire obtenu entre la TopoI, l'ADN endommagé et l'inhibiteur occasionne donc des collisions avec la machinerie de réplication ou de transcription, ce qui peut générer des dommages double-brins à l'ADN (311). La voie de réponse à ces dommages est donc généralement l'axe ATM qui mène à l'activation de p53 et l'arrêt du cycle cellulaire. Le SN-38 a aussi des effets non-ciblés sur MDM2 et sur BCL-xL, pouvant dans les deux cas mener à l'apoptose cellulaire (311). Il est toutefois incertain si l'irinotécan agit sur la biogénèse des ribosomes, tandis que la camptothécine, de laquelle l'irinotécan dérive, est connue pour freiner la transcription et altérer les premières étapes de maturation des ARNr (279). De façon intéressante, l'activité de la camptothécine a aussi été montrée comme dépendante de l'activation de la voie ERK/MAPK, de la synthèse protéique et des espèces réactives de l'oxygène, des mécanismes liés à l'induction de sénescence cellulaire (312). Par ailleurs, une autre étude a montré que la toxicité hépatique engendrée par l'irinotécan dépendait de son activation de la voie ERK et d'une sécrétion pro-inflammatoire par les cellules touchées, soit un mécanisme étrangement similaire au phénotype sécrétoire des cellules sénescents (313). Finalement, une dernière étude a établi plus formellement que l'irinotécan pouvait induire des caractéristiques de sénescence chez des cellules cancéreuses colorectales, soit des changements morphologiques, de la polyploïdie, l'activation de p21 induisant un arrêt du cycle cellulaire, et l'activité lysosomale augmentée dans un essai SA- $\beta$ -Galactosidase (314).

En dernier lieu, l'oxaliplatine, lui, est un dérivé de platine, tout comme le cisplatine. Toutefois, son mécanisme d'action semble différer de façon significative. De plus en plus d'études démontrent que l'oxaliplatine est toxique non pas principalement via l'induction de dommages à l'ADN vu son potentiel alkylant, mais plutôt via l'inhibition de la synthèse des ARNr (315). En effet, dès les premières heures de traitement, le nucléole est réarrangé avec l'exclusion de la nucléophosmine du nucléole, la formation de « nucleolar caps », et l'inhibition de synthèse par l'ARN polymérase I

(316). Les travaux de Bruno *et al.* ont également montré que les conséquences cellulaires d'un traitement à l'oxaliplatine s'apparentaient davantage à celles produites par l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse protéique, mettant en lumière l'importance de l'effet sur les ribosomes (315). Une autre étude intéressante a caractérisé l'altération de la ribogénèse par l'oxaliplatine, pour laquelle les observations principales ont été une diminution protéique d'une multitude de facteurs associés à la ribogénèse et de protéines ribosomiques, un stress nucléolaire augmenté, ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M (317). Une fois de plus, ces altérations rappellent étrangement les défauts de biogénèse des ribosomes induits par la dégradation protéique de facteurs importants pour la ribogénèse dans les cellules sénescents. Certains de ces facteurs sont d'ailleurs en commun dans notre étude sur la sénescence et celle sur l'oxaliplatine, notamment la diminution de RSL1D1 et EBP2 (190,317).

Dans les thérapies d'avenir pour le cancer du pancréas, on peut penser également à différentes formes d'immunothérapies qui auraient pour objectif de faciliter l'élimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire (308). Toutefois, une meilleure compréhension de l'interrelation entre ces cellules cancéreuses et immunitaires dans les tumeurs pancréatiques serait requise pour le design d'inhibiteurs de « checkpoint » immunitaires appropriés ou pour l'identification d'antigènes spécifiques pour générer une immunité anticancéreuse. De nombreuses équipes travaillent également à développer de meilleurs véhicules de délivrance des agents chimiothérapeutiques actuels vers le site de la tumeur, souvent protégé par le stroma abondant, ou encore à produire des prodrogues qui seraient activées localement au sein de la tumeur. Ces approches visent à réduire les effets secondaires liés à l'utilisation de chimiothérapie et donc à augmenter la proportion de patients pouvant recevoir ces traitements malgré une forme physique en déclin avec l'avancement de la maladie. Des avancées en ce sens sont à prévoir dans les prochaines années.

## **1.7. Problématique et objectif de la thèse**

Pour boucler la boucle, c'est en étant enrichis de ces connaissances acquises sur le cancer pancréatique et ses thérapies, la voie RAS/ERK, la sénescence et la biogénèse des ribosomes, que nous allons mettre en contexte les travaux présentés dans cette thèse. Depuis le début de mon doctorat, je me questionne sur l'implication de la voie ERK, cette voie paradoxale qui allie

prolifération et suppression tumorale, dans la genèse du cancer pancréatique. La dualité des rôles de la voie ERK est une question qui divise les scientifiques depuis de nombreuses années. Ainsi, comment des lésions bénignes possédant une mutation activatrice dans l'oncogène le mieux connu (i.e. RAS) peuvent-elles rester dormantes durant des années chez un patient et un jour déboucher vers une progression fulgurante et fatale? Cette question requiert d'être étudiée sous l'angle de la sénescence cellulaire, un autre phénomène paradoxal, lui aussi à la fois anticancer et pro-cancer. Ainsi, l'hypothèse à la base de notre premier article est que les cellules PanIN sont bel et bien des cellules sénescents, mais que la progression vers le stade avancé implique un contournement de cette sénescence et l'acquisition de caractéristiques bien différentes.

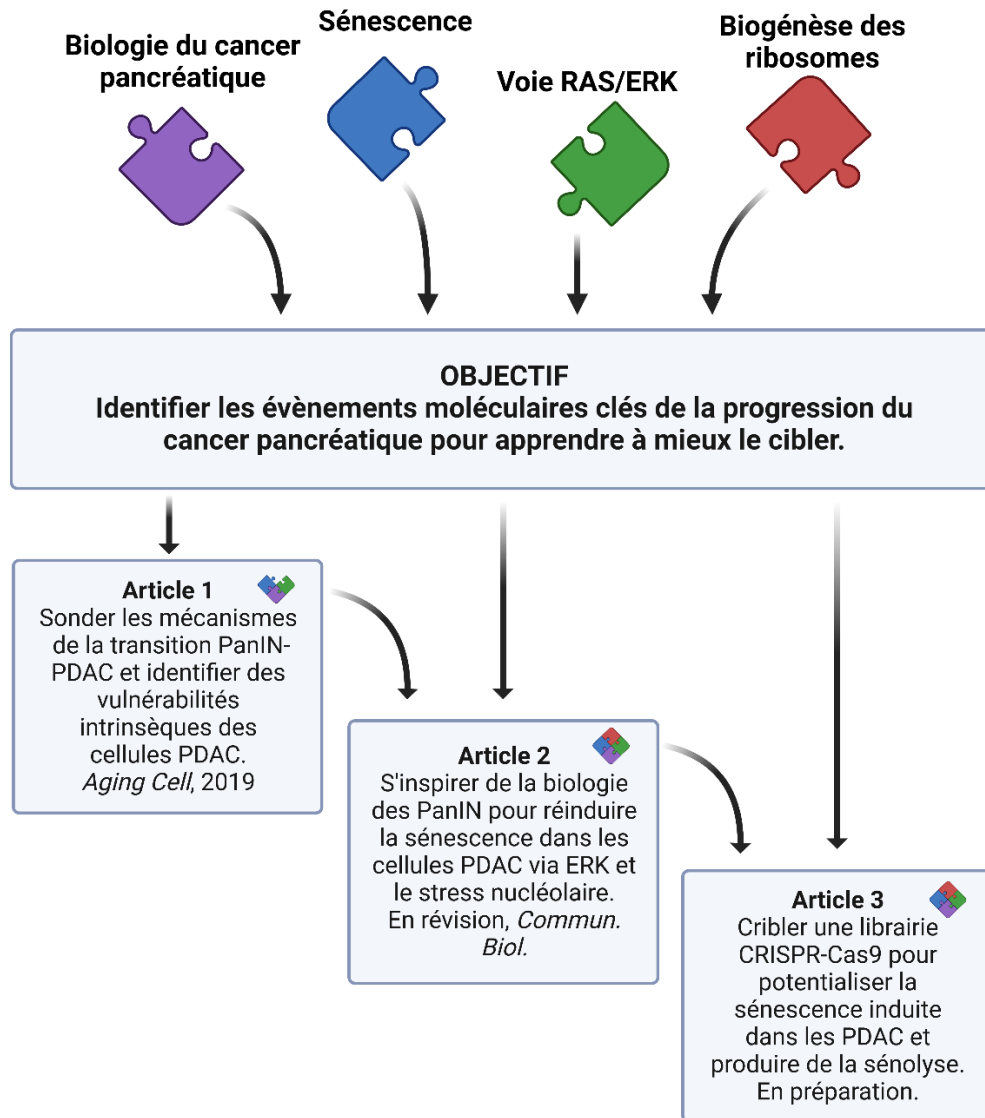
De comprendre la biologie du cancer pancréatique à un stade avancé est un pas important vers le développement de nouveaux traitements. Ce sont d'ailleurs nos connaissances acquises sur ce sujet dans le premier article qui nous ont permis de faire un lien entre une vulnérabilité intrinsèque des cellules PDAC, les fonctions mitochondriales, et des médicaments déjà approuvés et pouvant être recyclés pour cette utilisation. À cet effet, bien que l'article ne figure pas dans la thèse, je discuterai de travaux auxquels j'ai contribué en collaboration avec l'équipe de Dre Andreea-R. Schmitzer au département de chimie de l'Université de Montréal et visant à développer de nouveaux analogues de biguanides encore plus efficaces dans l'optique de cibler les cellules cancéreuses pancréatiques (318). Bien qu'étant moins liés à la sénescence ou à la signalisation MAPK, ces travaux contribuent directement à l'objectif de mon doctorat qui est de mieux comprendre les événements moléculaires impliqués dans la progression du cancer pancréatique pour mieux le cibler (318).

Ensuite, ayant posé l'hypothèse du contournement de la sénescence dans la progression, il y a lieu de se demander ce qui provoque ce contournement et s'il vient avec une résistance complète aux mécanismes intrinsèques classiques de la sénescence. Il est bien connu que la progression des cancers pancréatiques vient avec l'inactivation de suppresseurs de tumeurs importants tels que p53 et p16. Toutefois, la littérature nous montre que des sénescences indépendantes de ces voies existent, notamment en faisant appel à des mécanismes potentiellement très conservés voire ancestraux, comme les protéines ribosomiques. Et bien que la sénescence de cellules cancéreuses diffère grandement de celle des cellules normales, existe-t-il une place dans la thérapie anti-cancer

du pancréas pour les approches pro-sénescence? Autrement dit, peut-on resensibiliser les cellules transformées à ce mécanisme de suppression tumorale? Nous croyons que cela est possible, et c'est en fait l'hypothèse à la base du deuxième article qui sera présenté.

Finalement, pour unifier les différentes écoles de pensée sur les rôles anti- et pro-cancéreux de la sénescence et de ERK, nous pensons également que les thérapies pro-sénescence, bien qu'elles offrent un nouveau moyen de freiner la multiplication anarchique des cellules cancéreuses, posent potentiellement un risque de rechute important. De plus, si la sénescence induite dépend des fonctions antitumorales de ERK, il est logique que l'atténuation de ce signal comme mécanisme de résistance implique un danger de re prolifération. C'est pourquoi nous avons envisagé l'approche « one-two punch » comme moyen réaliste d'allier les bienfaits de la sénescence et les possibilités que celle-ci offre pour le développement d'une stratégie sénolytique dans le cancer du pancréas. Ainsi, dans le troisième article, nous posons comme hypothèse qu'une approche de criblage CRISPR-Cas9 pourrait nous permettre d'identifier des cibles sénolytiques à exploiter dans le traitement de ce cancer.

En somme, les travaux présentés dans cette thèse (**Figure 1.12**) contribueront, je le pense, à faire avancer les connaissances en lien avec ce défi si important qu'est le cancer pancréatique pour lequel de nouvelles avancées thérapeutiques sont requises.



**Figure 1.12. Vue résumée des travaux présentés dans la thèse.**

L'objectif principal de cette thèse est de comprendre les événements moléculaires de la progression du cancer pancréatique pour apprendre à mieux le cibler. Pour chaque article, l'objectif spécifique de celui-ci est décrit. Les pièces de casse-tête représentent les connaissances essentielles présentées dans l'introduction et comment celles-ci supportent les bases et les découvertes liées à chaque article. Figure réalisée avec BioRender.

**2. Le contournement de la sénescence est associé à des propriétés des cellules souches et à une sensibilité à la metformine.**

## 2.1. Mise en contexte de l'article 1

La progression fulgurante des PDAC et leur faible réponse aux thérapies actuelles sont des enjeux importants de la recherche sur le cancer pancréatique. L'utilisation de nouveaux modèles pour faciliter l'étude de cette progression est donc requise. Grâce à des modèles cellulaires récemment isolés de souris génétiquement prédisposées à développer un cancer pancréatique, les résultats présentés dans l'article 1 viennent tout d'abord confirmer que la sénescence cellulaire, induite par l'oncogène RAS, est active dans les cellules de stade PanIN. Cette sénescence représente à ce stade une barrière à la prolifération tumorale.

Ensuite, alors que la plupart des articles parus dans le domaine établissaient une comparaison entre les cellules pancréatiques normales et cancéreuses, notre approche nouvelle a été d'effectuer une comparaison entre les cellules des lésions bénignes et celles de stade malin, pour vraiment déterminer les paramètres de la progression tumorale. En utilisant une caractérisation par séquençage d'ARN sur micropuce, nous montrons que les cellules qui arrivent à contourner cette sénescence le font en acquérant des altérations métaboliques au niveau mitochondrial et des caractéristiques associées aux cellules souches. Ces résultats rejoignent la littérature qui démontre que lors de la progression, les cellules perdent leur dépendance à l'oncogène RAS. La diminution de l'activation de ERK pourrait donc supprimer des signaux pro-différenciation qui limitent la progression tumorale. Cette évolution cellulaire est ainsi associée à une perte de sensibilité à des traitements ayant été élaborés en se basant sur des phénotypes RAS-dépendants.

Notre article présente donc une piste de réflexion sur une nouvelle façon de cibler ces cellules, soit par l'antidiabétique metformine, qui cible la phosphorylation oxydative, qui plus est, de façon préférentielle chez les cellules qui possèdent des caractéristiques souches. Il était déjà reconnu que l'utilisation de metformine était associée à une diminution de l'incidence de certains cancers chez les patients diabétiques qui recevaient ce traitement. Notre article présente donc des éléments de réponse en lien avec cet effet protecteur.

## **2.2. Contribution à l'article 1**

Ma contribution intellectuelle et technique à l'article 1 concerne principalement la caractérisation d'un phénotype de sénescence dans les cellules PanIN. J'ai effectué la culture cellulaire et les essais d'activité bêta-galactosidase en Figure 2.1h et Figure 2.7a, les immunofluorescences des dommages à l'ADN et des SAHF, mais pas l'acquisition des images, pour les Figure 2.1i-j. J'ai également effectué les qPCR des gènes de SASP pour les Figure 2.7b-d. J'ai fait les analyses par Gene Set Enrichment (GSEA) pour la Figure 2.8e. J'ai fait de la culture cellulaire pour la répétition d'expériences des Figure 2.6a-e et Figure 2.11a-d. J'ai contribué avec les autres auteurs du manuscrit à écrire les légendes et à réviser le manuscrit.



## 2.3. Article 1

### **Circumventing senescence is associated with stem cell properties and metformin sensitivity**

Xavier Deschênes-Simard,<sup>1,4</sup> Maxime Parisotto,<sup>1</sup> Marie-Camille Rowell,<sup>1</sup> Benjamin Le Calvé,<sup>1,2</sup> Sebastian Igelmann,<sup>1</sup> Karine Moineau-Vallée,<sup>1</sup> Emmanuelle Saint-Germain,<sup>1</sup> Paloma Kalegari,<sup>1</sup> Véronique Bourdeau,<sup>1</sup> Filippos Kottakis,<sup>3</sup> Nabeel Bardeesy,<sup>3</sup> and Gerardo Ferbeyre<sup>1</sup>

*Aging cell*, 2019 Apr; 18(2): e12889. doi: 10.1111/acer.12889

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Medicine and CR-CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada,

<sup>2</sup> Cellular Biology Research Unit (URBC)-NARILIS, University of Namur, Namur, Belgium,

<sup>3</sup> Massachusetts General Hospital Cancer Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts,

<sup>4</sup> Present address: CHUM, Montréal, Québec, Canada,

Correspondence to: Gerardo Ferbeyre

### **2.3.1. Abstract**

Most cancers arise in old individuals, which also accumulate senescent cells. Cellular senescence can be experimentally induced by expression of oncogenes or telomere shortening during serial passage in culture. *In vivo*, precursor lesions of several cancer types accumulate senescent cells, which are thought to represent a barrier to malignant progression and a response to the aberrant activation of growth signaling pathways by oncogenes (oncogene toxicity). Here, we sought to define gene expression changes associated with cells that bypass senescence induced by oncogenic RAS. In the context of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), oncogenic KRAS induces benign pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs), which exhibit features of oncogene-induced senescence. We found that the bypass of senescence in PanINs leads to malignant PDAC cells characterized by gene signatures of epithelial-mesenchymal transition, stem cells, and mitochondria. Stem cell properties were similarly acquired in PanIN cells treated with LPS, and in primary fibroblasts and mammary epithelial cells that bypassed Ras-induced senescence after reduction of ERK signaling. Intriguingly, maintenance of cells that circumvented senescence and acquired stem cell properties was blocked by metformin, an inhibitor of complex I of the electron transport chain or depletion of STAT3, a protein required for mitochondrial functions and stemness. Thus, our studies link bypass of senescence in premalignant lesions to loss of differentiation, acquisition of stemness features, and increased reliance on mitochondrial functions.

### **2.3.2. Introduction**

A variety of oncogenes induce DNA damage, protein degradation, and mitochondrial dysfunction ultimately triggering a stable cell cycle arrest known as oncogene-induced senescence (OIS). OIS is considered a powerful anti-cancer response mediated by bona fide tumor suppressors such as p53, RB, and p16INK4a (319). In mice, expression of oncogenes in a variety of tissues leads to premalignant lesions with the characteristics of OIS that often progress to form malignant tumors (320). Although inactivation of tumor suppressors such as p53 accelerates the formation of tumors in these mouse models (320), the mechanism of senescence bypass in tumors that spontaneously arise from premalignant lesions remains unclear. In particular, there is an extensive reprogramming of the cancer genome resulting in loss of genetic programs of cell differentiation and gain of gene expression programs of embryonic stem cells (ESCs) (321). While many

comparisons have been made between tumor cells and their normal counterparts, there is much to learn by comparing malignant cells to their precursor premalignant lesions being both populations expressing the same driving oncogene.

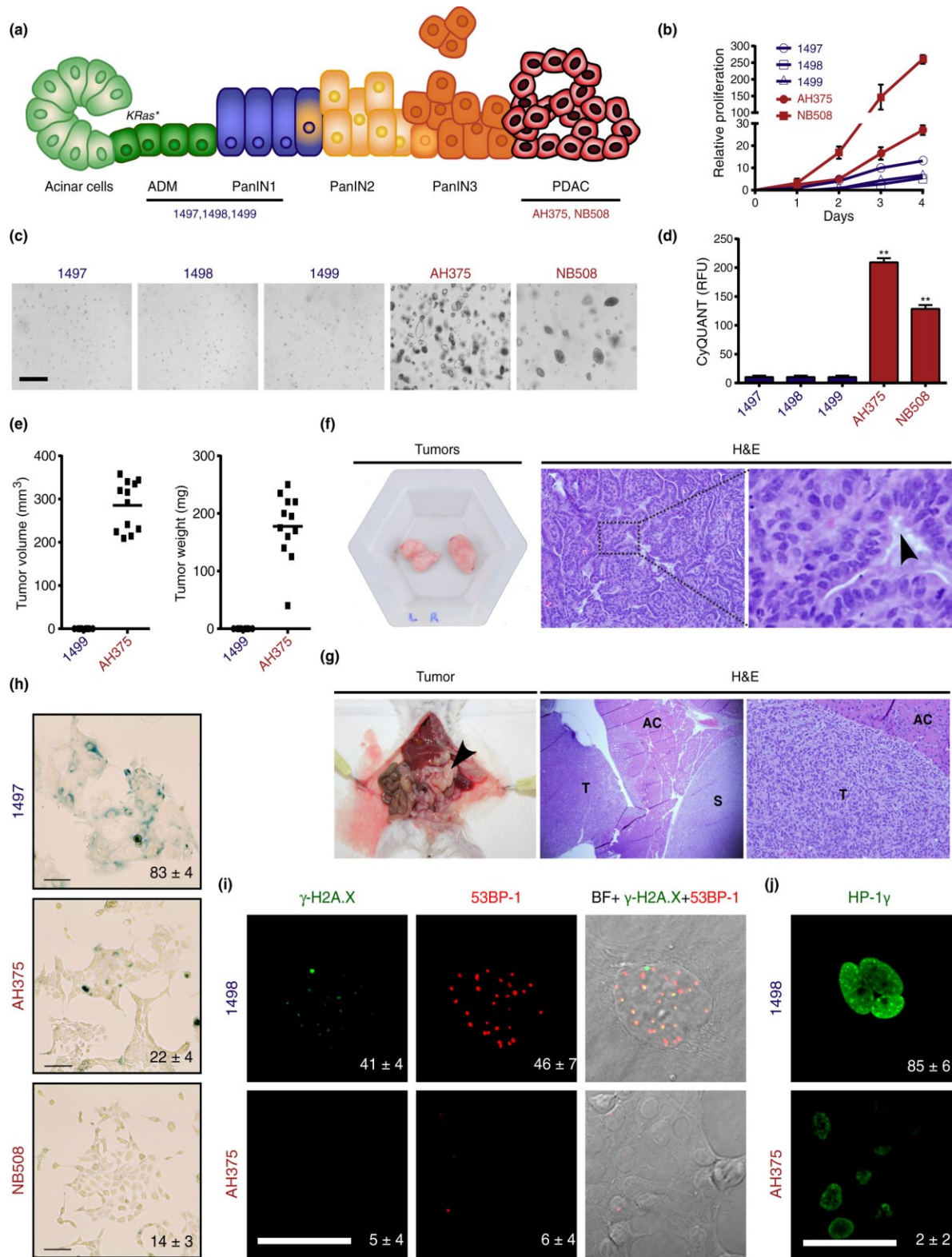
To investigate the molecular changes associated with the transition from premalignant senescent lesions to malignant tumors, we took advantage of genetically engineered mouse models (GEMMs) of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) that mimic the progression of the human disease. Activating Kras mutations in the pancreas lead to premalignant lesions known as pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs), which are largely nonproliferative and contain cells with markers of cellular senescence (322). We thus compared the transcriptome and biological properties of PanIN and PDAC cells. PDAC cells express genes regulated by Stat3 and Myc and have low levels of genes repressed by NF- $\kappa$ B. They also expressed mitochondrial genes and genes in common with stem cells. Consistent with their transcriptome, PDAC cells exhibited stem cell properties and displayed sensitivity to treatment with the mitochondrial complex I inhibitor metformin or to shRNAs against Stat3. Stemness was also stimulated in PanIN cells by LPS and in human primary cells that bypassed Ras-induced senescence due to attenuation of ERK signaling. Taken together, our results link bypass of senescence with Stat3-dependent stemness and metformin sensitivity and provide insights into the association between cancer and aging.

### **2.3.3. Results**

#### **2.3.3.1. The transition from PanIN to PDAC involves acquisition of stem cell and epithelial-mesenchymal transition gene expression modules**

Low-grade PanIN lesions (PanIN1) are frequent in old individuals without pancreatic cancer but high-grade lesions (PanIN2 and PanIN3) are rare in the normal pancreas. In contrast, PanIN3 lesions are frequent in patients with pancreatic cancer (323). These findings are consistent with the idea that PanIN lesions are precursors of pancreatic adenocarcinoma, thereby raising important questions about the mechanisms of progression from PanIN to cancer. Since PanIN lesions display markers of cellular senescence, their progression to cancer must bypass this tumor suppressor mechanism. To understand the changes associated with the transition of premalignant to malignant lesions, we developed *in vitro* models of different stages of pancreatic cancer progression. For early-stage disease, we established pancreatic epithelial cell lines from Pdx1-

Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup> mice harboring low-grade PanIN1 lesions and regions of acinar-ductal metaplasia from which PanINs originate (Figure 2.1a). To model the transition from PanIN to PDAC, we used the PanIN-derived AH375 cell line, which evolved into invasive PDAC upon passaging *in vitro*. We also established a PDAC cell line from Pdx1-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup>; p53<sup>fllox/+</sup> mice bearing aggressive tumors (NB508). The ADM/PanIN-derived cell lines (1,497, 1,498, 1,499) had lower proliferation rates relative to the PDAC cell lines (NB508 and AH375) (Figure 2.1b). Only PDAC cells formed colonies in soft agar (Figure 2.1c,d) and tumors *in vivo* (Figure 2.1e–g). On the other hand, PanIN cells exhibited markers of cellular senescence such as senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (Figure 2.1h and Figure 2.7a), DNA damage foci (Figure 2.1i), and increased staining for the heterochromatin marker HP1- $\gamma$  (324) (Figure 2.1j). Since these cells still grow in culture, they likely represent a mixture of senescent and pre-senescent cells (325). We also compared expression of several pro-inflammatory genes between PanIN cells and PDAC cells. We found that the expression of Angptl2, Il-23a, Ccl5, Il-15, and Il-1 $\alpha$  was increased in PanIN cells, while the expression of Ccl7 was decreased (Figure 2.7b,c). These genes are often upregulated in senescent cells as part of the senescence-associated secretory phenotype (SASP; (326)). Further evidence for a senescence gene expression pattern of PanIN cells was obtained using novel senescent biomarkers common to multiple cell types (327). Again, PanIN cells show gene expression changes corresponding to the senescent phenotype (Figure 2.7d). Overall, these gene expression changes and senescence biomarkers that are common to other senescent cells support the idea that PanIN cells are under oncogenic stress.



**Figure 2.1. Establishment of an *in vitro* model of pancreatic cancer progression.**

(a) Illustration of stages in pancreatic cancer progression after oncogenic ras activation (Kras\*) *in vivo*. Adapted from(328). Mouse pancreatic ductal cell lines were established from the indicated lesions of Pdx1-Cre;LSL-KrasG12Dmice. (b) Proliferation of the indicated mouse cell lines measured by MTT. The relative proliferation represents the fold of OD at 500 nm over the indicated period of time. Each point represents the mean of triplicates  $\pm$  SD. (c) Cell lines from pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) form colonies in soft agar, but not cell lines from ADM/PanIN1 lesions. Scale bar = 400  $\mu$ m. (d) Quantification of proliferation in soft agar over a period of 7 days for the indicated cell lines. Results were obtained using the CyQuant GR dye and are expressed as relative fluorescence unit (RFU) at 520 nm. Mean of triplicates  $\pm$  SD, \*\*p < 0.01. (e) Tumor volume and weight 15 days after subcutaneous injection of  $5 \times 10^5$  1,499 or AH375 cells into SCID mice. Only AH375 cells form tumors. (f) Phenotype and histology of subcutaneous tumors formed by AH375 cells. H&E, hematoxylin and eosin. Black arrow, ductal histology (g) Phenotype and histology of tumors formed following orthotopic injection of AH375 cells into the pancreas of SCID mice. H&E, hematoxylin and eosin; AC, normal acinar cells; S, spleen; T, tumor. (h) Percentage of SA- $\beta$ -Gal-positive cells in the indicated cell lines. The average and SD of triplicates of 100 cells counts are indicated at the bottom of each panel, n = 3. Scale bar = 10  $\mu$ m. (i) Indirect immunofluorescence staining with anti- $\gamma$ -H2AX and anti-p53BP1 antibodies of PDAC cell line AH375 and PanIN cell line 1,498, scale bar = 10  $\mu$ m. The percentage of cells with more than five foci is indicated at the bottom right of each panel. (j) Indirect immunofluorescence staining with anti-HP1 $\gamma$  antibody of PDAC cell line AH375 and PanIN cell line 1,498, scale bar = 10  $\mu$ m. The percentage of cells with more than five foci is indicated at the bottom right of each panel. We counted 50 cells three times in two independent experiments

To better characterize gene expression changes distinguishing PanIN from PDAC, we compared the gene expression profile of the 1,499 ADM/PanIN1-derived cell line, with that of AH375 PDAC cells. Using a FatiGO single enrichment analysis of microarray data from the Babelomics 4.3 platform, we found marked differences in the general biological function categories associated with cellular transformation, with most pronounced changes in genes regulating cell differentiation (Figure 2.2a). In particular, compared to 1,499 cells, the AH375 cell line had enrichment of stem cell genes and lower levels of genes associated with cell differentiation (Figure 2.8a,b). AH375 cells also exhibited features of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is often associated with acquisition of stem cell traits (Figure 2.2b and Figure 2.8a,b) (329). Overall, our analysis suggests that malignant progression of PanINs correlates with a reprogrammed gene expression profile associated with dedifferentiation, stem cell features, and EMT.

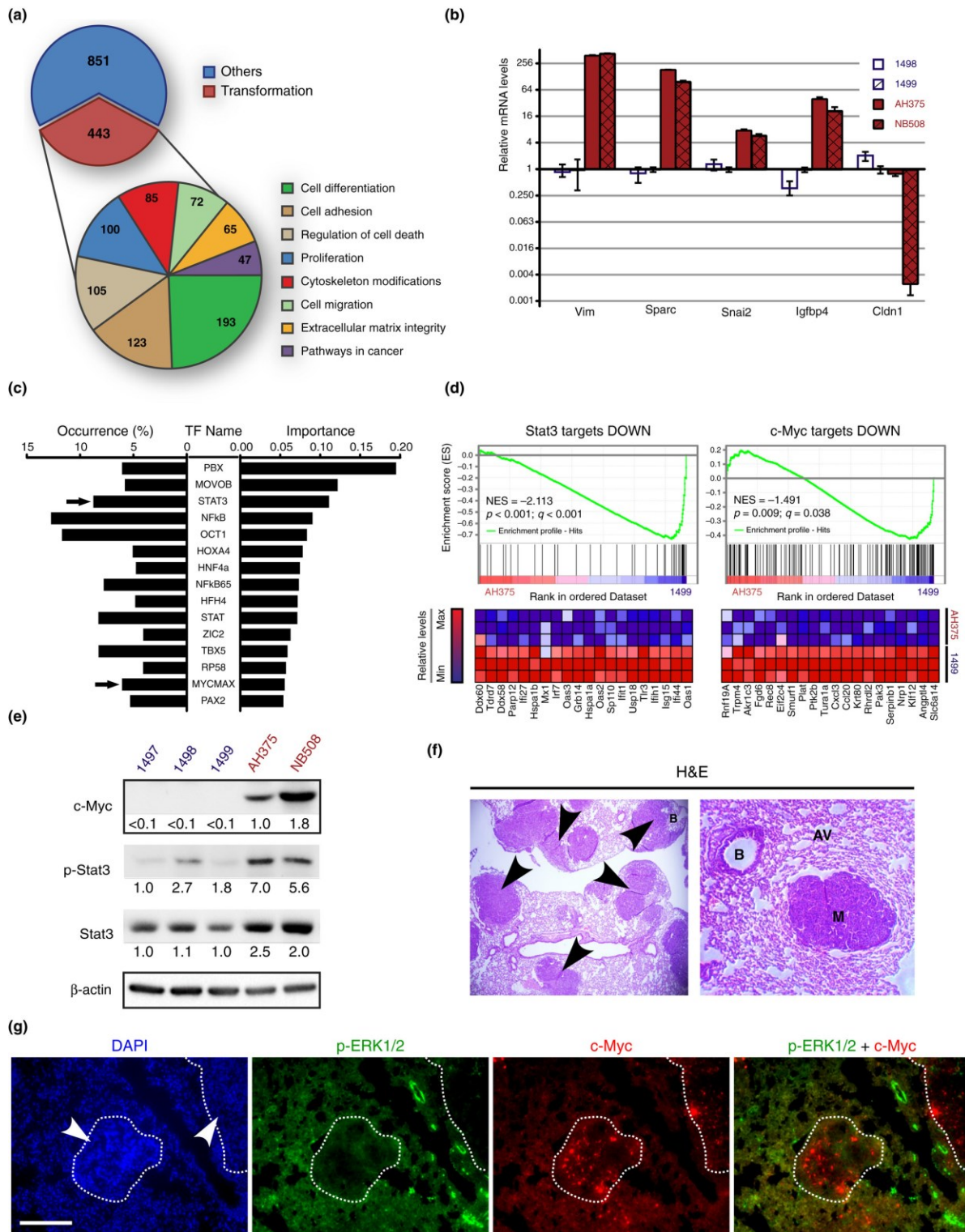


Figure 2.2. Stemness gene expression pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma cells.

(a) Transcriptome analysis comparing 1,499 and AH375 cells (GEO accession number: GSE57566). Transcripts with a fold change higher or equal to 2 and a  $p < 0.05$  according to a two-sample Student's t test were analyzed with the Babelomics 4.3 platform. The number of transcripts in each category (nonmutually exclusive) is indicated. (b) Validation by qPCR of the microarray data in the indicated cell lines and for the indicated genes, which are involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT). Mean of triplicates  $\pm$  SD. (c) DIRE prediction of upregulated transcription factors (TF) in AH375 cells. The percentage of target genes found in the submitted list of transcripts is shown for each potential TF (occurrence). The importance indicates the product of a TF occurrence with its weight in the database. (d) GSEA found gene expression signatures suggesting upregulation of Stat3 and c-Myc in AH375 cells. (e) Immunoblots with anti-phospho-Stat3 (Y705), anti-Stat3, and anti-c-Myc antibodies on extracts from the indicated cell lines. (f) Histology of lung tumors formed after tail vein injection of  $1 \times 10^6$  AH375 cells into SCID mice. B, bronchiole; AV, alveolus; M and black arrows, tumors. H&E, hematoxylin and eosin (g) Indirect immunofluorescence staining with anti-Myc and anti-phospho-ERK antibody of mouse lung tissues containing tumors as in (f). White arrows, metastasis; DAPI, nuclear counter stain; scale bar = 100  $\mu$ m

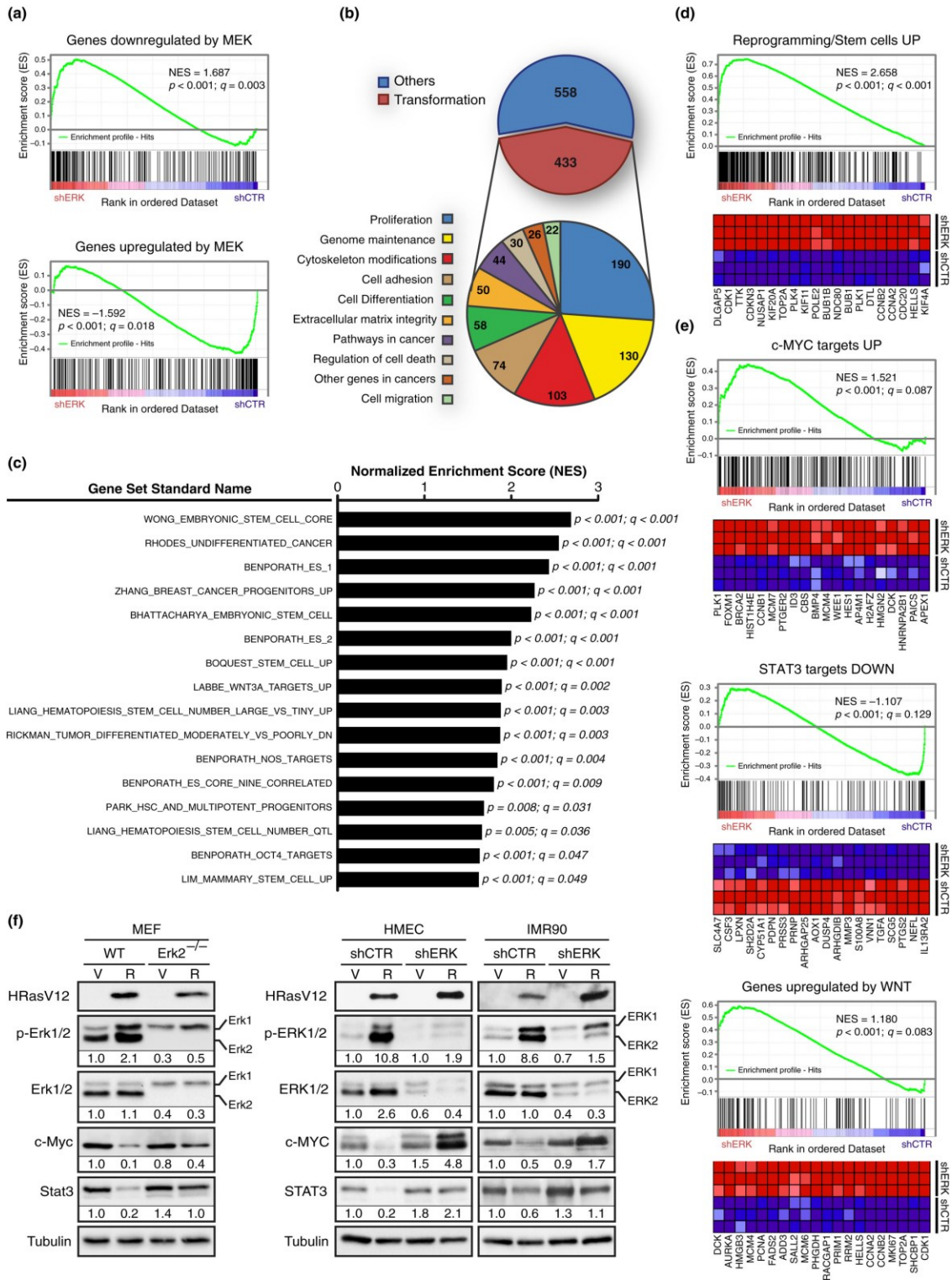
To evaluate the mediators of this transcriptional reprogramming, we analyzed the promoters of the significantly regulated genes for known transcription factor binding sites using the DiRE platform. Strikingly, several transcription factors with reported roles in differentiation or stemness were found among the most significant candidates (Figure 2.2c) including STAT3 (330), c-MYC/MAX (331,332), and NF- $\kappa$ B (333). Consistently, gene expression signatures suggested downregulation of Stat3 and c-Myc functions in 1,499 cells (Figure 2.2d). The data also implicated additional key signaling pathways associated with stem cells and regulation of c-Myc and Stat3, including the LIF/STAT3 pathway (Figure 2.8a) (330), and WNT signaling (Figure 2.8c) (334). Intriguingly, while 1,499 cells expressed many genes regulated by NF- $\kappa$ B, AH375 cells poorly express genes downregulated by the same transcription factor (Figure 2.8c) suggesting a reprogramming of the NF- $\kappa$ B pathway and a role for NF- $\kappa$ B-mediated gene repression in pancreatic cancer. In line with this result, it was reported that NF- $\kappa$ B-mediated gene repression was important to protect cancer from cytotoxic stimuli (335). Next, we confirmed that c-Myc and Stat3 protein levels were increased in the PDAC cell lines compared to the PanIN lines (Figure 2.2e). We confirmed the robust expression of c-Myc and low relative levels of pErk *in vivo* in lung tumors derived from tail vein-injected AH375 cells (Figure 2.2f,g). Of note, low p-ERK levels characterize embryonic stem cells and facilitate the reprogramming of somatic cells into pluripotent stem cells (336). These findings further link PDAC progression with the acquisition of more primitive transcriptional states and stemness phenotypes.

### 2.3.3.2. Mouse and human cells that circumvent OIS express stemness genes

To investigate the bypass from OIS to transformation more broadly, we utilized normal human lung fibroblast IMR90, primary human mammary epithelial cell (HMEC), and primary



mouse embryonic fibroblast (MEF) models of OIS. In each model, shRNA-mediated inhibition of aberrant ERK signaling promotes bypass of senescence allowing tumor formation *in vivo*, consistent with prior studies (Figure 2.9) (151). We compared the transcriptome of senescent human fibroblasts expressing oncogenic Ras with that of the same cells that circumvented senescence due to knockdown of ERK2 (337). In addition to the expected decrease in signatures for the RAS-ERK MAP kinase pathway, (Figure 2.3a,b), cells that bypassed senescence expressed high levels of stem cell genes (Figure 2.3c,d), including targets of MYC, STAT3, and the WNT pathway (Figure 2.3e). In both IMR90s and HMECs, the levels of MYC and STAT3 dropped sharply with senescence and were fully restored upon senescence bypass due to ERK2 inactivation (Figure 2.3f). We suggest that bypass from senescence provides a context where these transcription factors can drive the expression of their target genes over that found in the control cells. Collectively, these results relate bypass from RAS-induced senescence to acquisition of a “stemness” gene expression program. Of note, the stemness signature as defined using GSEA and other bioinformatic programs is not specific for stem cells since they were derived from mixed populations such as the cell lines used in the current report. It is likely that the progeny of stem-like cells expresses genes controlled by key stemness factors such as Myc and Stat3 that remained activated in the stem cell progeny. Hence, these gene expression correlations only suggest but do not prove stemness.

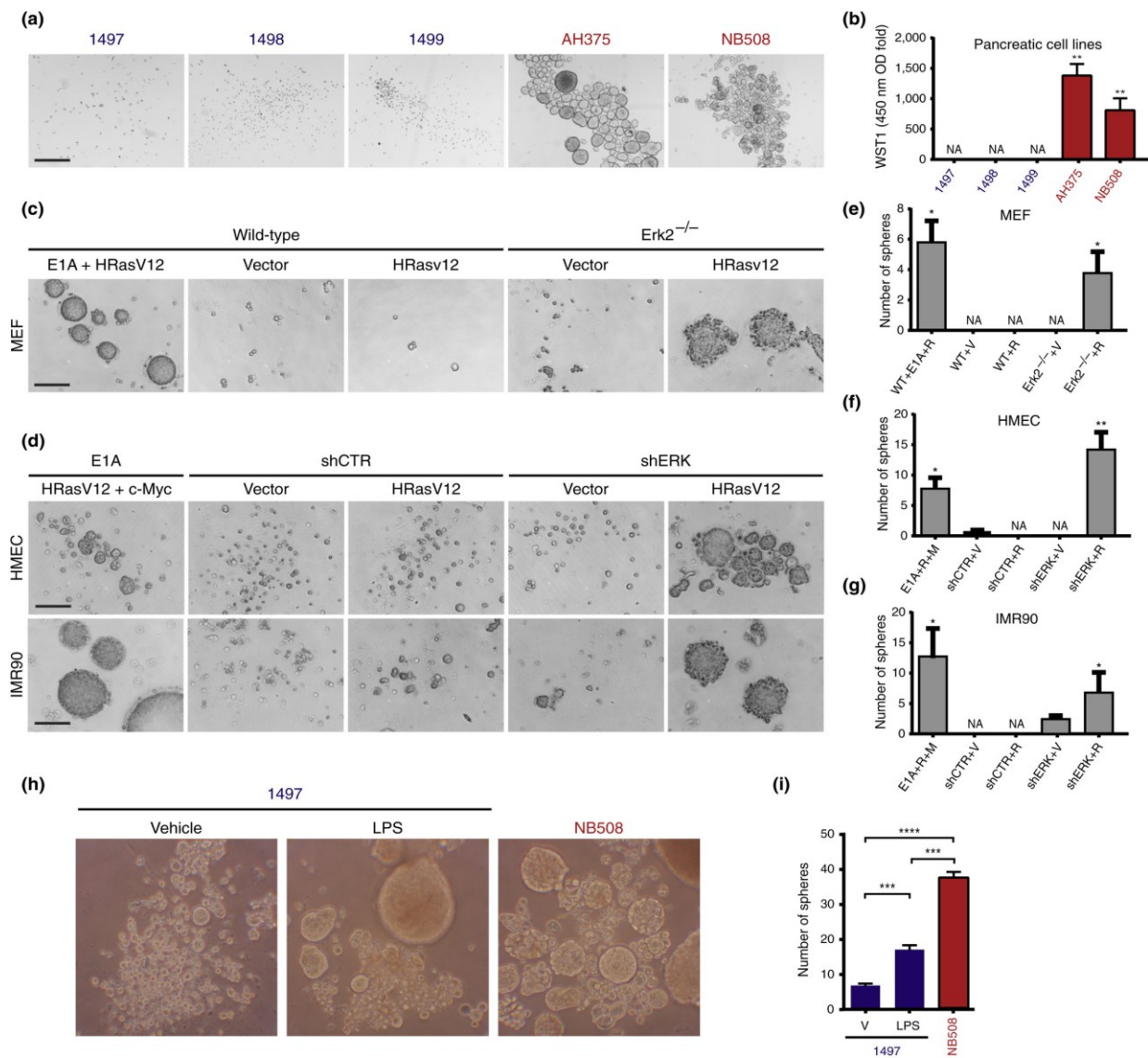


**Figure 2.3. Ras-transformed mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and human primary cells show a reprogrammed gene expression profile associated with dedifferentiation.**

(a) RNA from IMR90 cells stably expressing hTERT, HRasG12V, and a shRNA against ERK2 (shERK) or a non-targeting shRNA (shCTR) was collected for microarray gene expression analysis (GEO accession number: GSE33613). GSEA revealed gene expression signatures of genes known as downregulated by active MEK in cells expressing a shERK2 (MEK UP.V1 DN; M2724) and genes known as upregulated by active MEK in cells expressing a shCTR (MEK UP.V1 UP; M2725). (b) A total of 991 transcripts with a fold change higher or equal to 2 and a  $p < 0.05$  following a two-sample Student's t test were analyzed with the Babelomics 4.3 platform. The terms obtained which may explain the transformed phenotype of the IMR90 hTERT/HRasG12V/shERK2-expressing cells and their associated transcripts are grouped in the indicated general categories. The number of transcripts in each category (nonmutually exclusive) is indicated. (c) Several stem cell gene expression signatures showing dedifferentiation in IMR90 hTERT/HRasG12V/shERK2-expressing cells were revealed by GSEA. (d) GSEA for the most significant signature in (c) (WONG EMBRYONIC STEM CELL CORE; M7079). (e) Gene expression signatures suggesting upregulation of STAT3, c-MYC, and the WNT pathway in IMR90 hTERT/HRasG12V/shERK2-expressing cells. (f) Immunoblots for the indicated proteins in extracts from wild-type (WT) or Erk2-null MEF, and IMR90 or human mammary epithelial cell (HMEC) cells expressing hTERT and the indicated vectors: shCTR, nontargeting shRNA; shERK, shRNA targeting ERK2; V, empty vector; R, vector expressing HRasG12V

### **2.3.3.3. Bypass from senescence is associated with the emergence of cells with stemness properties**

To determine whether our findings at the gene expression level are transposable to a phenotype of CSCs, we tested the capacity of the mouse cell lines derived from the different pancreatic lesions to form free-floating tumor spheres. It was previously shown that both normal (338) and cancer stem cells (339,340) form spheres in 3D culture conditions. While PanIN-derived cell lines failed to form spheroids, PDAC cells did so readily, thereby revealing the presence of a subpopulation of tumor-initiating cells in these cell lines (Figure 2.4a,b). In addition, fibroblasts and HMEC that bypassed Ras-induced senescence due to expression of a shRNA against ERK2 were also capable of forming tumor spheres (Figure 2.4c–g). Taken together, our results show an intriguing link between bypassing senescence and the acquisition of stem cell-like properties.



**Figure 2.4. A subpopulation of cells that bypass senescence have a behavior of cancer stem cells.**

(a) Cell lines from pancreatic ductal adenocarcinoma form free-floating tumor spheres, but not cell lines from ADM/PanIN1 lesions. Scale bar = 400  $\mu$ m. (b) Quantification of cell proliferation in (a) with the WST-1 cell proliferation assay. The fold of absorbance at 450 nm over a period of 14 days is shown. Average of triplicates  $\pm$  SD, \*\* $p < 0.01$ . (c) Tumor sphere formation assay with wild-type or Erk2-null mouse embryonic fibroblast (MEF) expressing the indicated vectors. Scale bar = 200  $\mu$ m. (d) Tumor sphere formation assay with human mammary epithelial cell (HMEC) and IMR90 cells expressing hTERT and the indicated vectors. shCTR: control nontargeting shRNA, shERK: shRNA against ERK2. Scale bar = 200  $\mu$ m. (e–g) Number of spheres from an initial plating of 1,000 cells; (e) MEF, (f) HMEC, (g) IMR90. Average of triplicates  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus WT + V or NTC + V. (h) LPS stimulates the conversion of PanIN cells into tumor sphere-forming cells. Representative pictures of spheres formed by LPS- or vehicle-pretreated 1,497 cells and of NB508 cells grown in suspension. Note that LPS pretreatment was performed on adherent cells, whereas no LPS was added in culture medium when LPS-pretreated cells were seeded

in suspension (i) Quantification of sphere number. Average of six replicates  $\pm$  SD, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001, V = vehicle

The malignant pancreatic cancer cell line AH375 spontaneously developed from cells obtained from PanIN lesions. It is commonly assumed that mutations in tumor suppressor pathways contribute to circumvent senescence and to the conversion of benign PanIN lesions into PDAC. However, activation of pattern recognition receptors (PRRs) can accelerate tumorigenesis via immune suppression and activation of protumorigenic signaling pathways that include NF- $\kappa$ B, Notch, and STAT3 (341,342). The Notch and Stat3 pathways are clearly activated in PDAC AH375 cells that spontaneously arose from PanIN cell cultures and the NF- $\kappa$ B pathway seems to be reprogrammed toward repression in AH375 cells (Figure 2.2 and Figure 2.8). To investigate whether activation of PRRs can stimulate the conversion of PanIN cells into PDAC in culture, we treated 1,497 PanIN cells with LPS and tested their ability to form tumor spheres. Consistent with a protumorigenic role of PRR activation, LPS promoted the formation of tumor spheres by 1,497 cells (Figure 2.4h,i).

#### **2.3.3.4. Pancreatic cancer cells show increased mitochondrial machinery**

Another striking feature of the transcriptome of PDAC cells in comparison with PanIN cells is an increase in the expression of mitochondrial genes (Figure 2.5a,b). High mitochondrial mass correlates with cancer stem cell properties (343), and in pancreatic tumors, the stem cell population has an increase in respiration and dependency on electron transport and oxidative phosphorylation (58,344). Also, RAS-dependent transformation requires mitochondrial STAT3 (345) a protein that is compromised in PanIN cells and OIS cells. We found that many mitochondrial enzymes involved in amino acid metabolism were upregulated in PDAC cells in comparison with PanIN cells (Figure 2.5a,b). These include several enzymes in one-carbon metabolism pathways such as serine hydroxymethyltransferase (Shmt2) (346) and glycine decarboxylase (GLDC) (347). Notably, GLDC is important for the growth of tumor-initiating cells in lung cancer (348). We confirmed by qPCR analysis that Glde and Gesh were elevated in PDAC cells compared to PanIN cells (Figure 2.5c). These results are in keeping with the reported role for mitochondrial biogenesis in the growth of PDAC (58,344).





AH375 or cells sorted according to MitoTracker Green staining as in (d). (f) Quantification of AH375 cells tumor sphere formation of unsorted or sorted subpopulations with MitoTracker Green low versus high as in (d). Average of triplicates  $\pm$  SD, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  using ANOVA. (g) Flow cytometry quantification of MitoTracker Green staining of AH375 cells growing in 2D culture or as tumor spheres (3D culture). Average of triplicates  $\pm$  SD, \*\* $p < 0.01$  using Student's t test. (h) Flow cytometry quantification of relative MitoTracker Green staining median intensity in LPS- or vehicle-pretreated 1,497 cells. Average of triplicates  $\pm$  SD, \*\*\*\* $p < 0.0001$  using Student's t test

The cells capable of initiating tumors within most cell lines are often a fraction of the total cell population. The stem cell hypothesis of cancer proposes that tumor-initiating cells are for the most part quiescent but produce a progeny of proliferating cells where many cells cannot form tumors due to cell differentiation (epigenetic changes) or accumulation of maladaptive genetic changes (349). To investigate the frequency of tumor-initiating cells in AH375 cells, we injected serial limiting dilutions of the cells (10,000, 1,000, 100 cells) subcutaneously in SCID mice and scored the number of visible tumors for each injection. The data were analyzed with extreme limiting dilution analysis (ELDA) (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>). We found that 1/2,473 cells were capable of initiating tumors (Figure 2.10a). We also identified quiescent stem-like cells in AH375 cells growing as tumor spheres using a label retention assay with CFSE. AH375 cells were stained and plated for tumor spheres. After 3 days in culture, each sphere displayed a single cell labeled with CFSE (Figure 2.10b) suggesting that putative cancer stem cells divided only once asymmetrically and then remained quiescent.

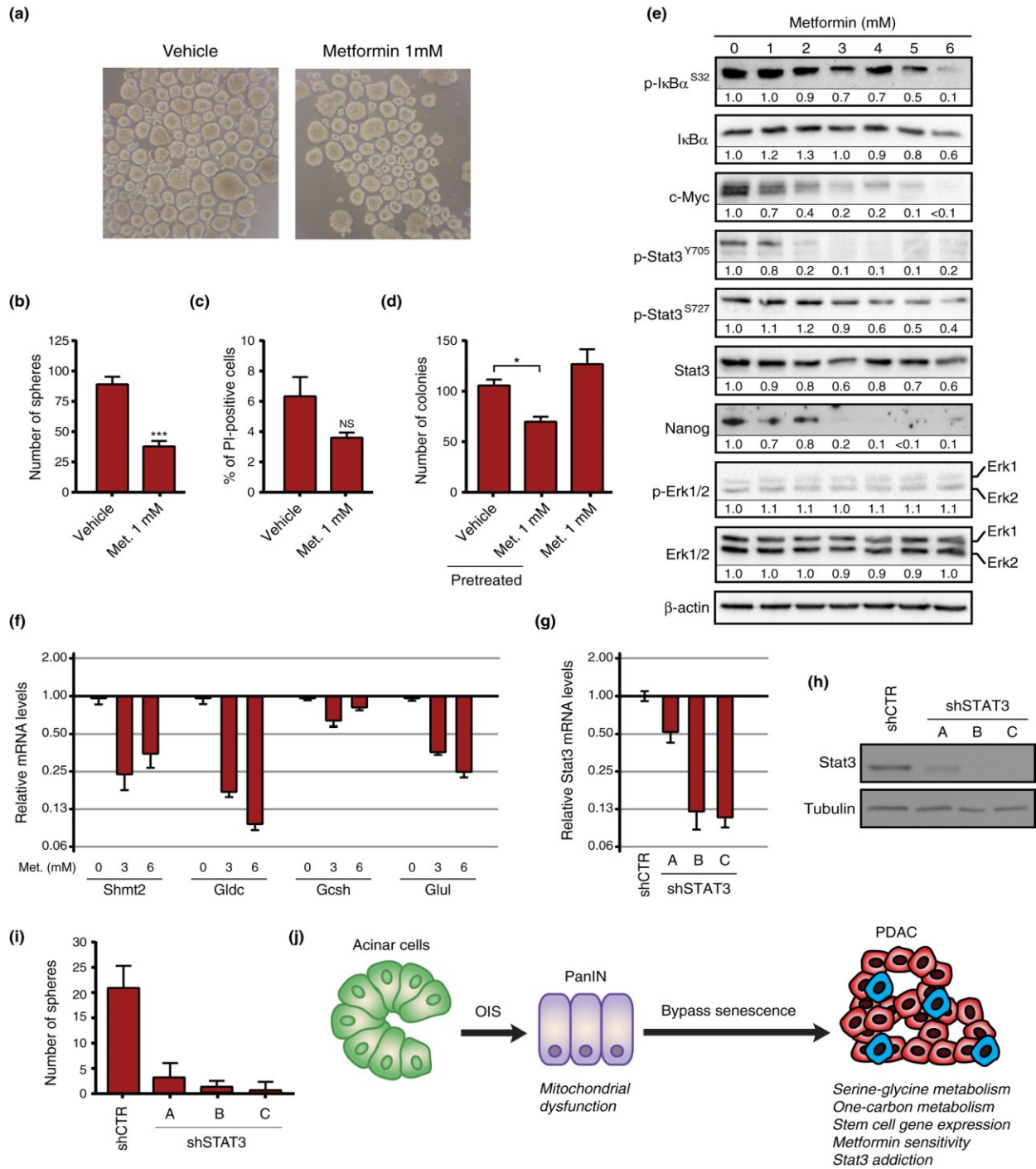
To gain more insight into the heterogeneity of AH375 PDAC cells, we sorted the cells according to mitochondrial mass using MitoTracker Green (Figure 2.5d). We found that cells with higher mitochondrial content formed more tumor spheres than cells with lower mitochondrial content (Figure 2.5e,f). Also, the mitochondrial content of the cells that formed spheres was higher than that of cells growing in adherent conditions (Figure 2.5g). In addition, treatment of PanIN 1,497 cells with LPS stimulated their conversion into tumor sphere-forming cells (Figure 2.4h,i) and increased their mitochondrial content (Figure 2.5h). Taken together, our results show an association between mitochondrial genes and mitochondrial mass with the transition from PanIN to PDAC, a process that is stimulated by LPS.

### **2.3.3.5. Metformin targets reprogrammed pancreatic cancer cells**

The increased mitochondrial content of pancreatic cancer cells suggested that they might be sensitized to drugs that target mitochondria such as metformin (350). The proportion of cancer

stem-like cells in the population of AH375 cells growing in 2D is likely low. However, if these cells require an increase in mitochondrial function while they are growing in 2D, a pretreatment with metformin before plating them for the tumor sphere 3D assay should reduce the number of tumor spheres. We found that a pretreatment with 1 mM metformin for three days was sufficient to reduce by almost 50% the number of tumor spheres formed by AH375 cells (Figure 2.6a,b) while having a minimal effect on cell viability (Figure 2.6c). Together, the results suggest that metformin could be a valuable drug to target mitochondria in cancer stem cells. Metformin also inhibited AH375 cells from forming colonies in soft agar (Figure 2.11a,b) and from growing as tumor spheres (Figure 2.11a,c). Metformin reduced sphere formation of NB508 PDAC cells but at higher concentration (Figure 2.11d). Similar results were seen in transformed MEF and IMR90 cells (Figure 2.11e,f) and in the human pancreatic cancer cell line HPAF-II (Figure 2.11g).





**Figure 2.6. Pretreatment with metformin reduces the ability of AH375 pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells to form tumor spheres.**

(a) AH375 cells pretreated with metformin or vehicle. (b) Quantitation of tumor spheres as in (a). Average of replicates  $\pm$  SD, \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 3$ . (c) Quantitation of AH375 cell viability using propidium iodide (PI) after treatment with metformin or vehicle. NS = not significant. (d, e) Immunoblots for the indicated proteins in extracts from AH375 cells

treated with the indicated concentrations of metformin for six days. (f) QPCR for mitochondrial genes in AH375 cells treated with the indicated doses of metformin for 5 days. Error bars indicate mean  $\pm$  SD. (g) QPCR for Stat3 expression in NB508 expressing a nontargeting control shRNA (shNTC) or different shRNAs against Stat3. (h) Immunoblots for Stat3 and tubulin as in (g). (i) Number of tumor spheres in cells as in (g) after 5 days. Spheres were counted by microscopic examination. Average of quadruplicate  $\pm$  SD. (j) Bypassing senescence and mitochondrial reprogramming in carcinogenesis. Premalignant lesions are first halted by oncogene-induced senescence, but some cells can bypass the process. This involves an enrichment for stemness genes, mitochondrial genes, and a subpopulation of metformin-sensitive tumor-initiating cells (blue cells in the figure)

To get insights into the mechanisms by which metformin inhibits stemness, we measured the levels of several transcription factors required for the stem cell-like phenotype. We found that metformin reduced the levels of Nanog, c-Myc, and phosphorylated Stat3 (Figure 2.6d). Metformin also induced a gene expression pattern characteristic of a more epithelial state (Figure 2.6e). An inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway was also observed at higher concentrations, as seen by a decrease of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation (Figure 2.6d). Interestingly, treatment of AH375 PDAC cells with 3- or 6-mM metformin reduced the expression of Shmt2, Gldc, Gcsh, Glu1, and EMT genes (Figure 2.6e and Figure 2.12). As an example that the comparisons of transcriptomes of premalignant cells with tumor cells and the use of metformin can identify stemness factors in cancer cells, we knocked down Stat3 in NB508 PDAC cells. Depletion of Stat3 drastically inhibited tumor sphere formation in these cells (Figure 2.6g–i).

### 2.3.4. Discussion

We show here that bypass of OIS was associated with the acquisition of a gene expression program characteristic of stem cells, EMT, and mitochondrial genes. This gene expression transition was observed after comparing premalignant pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs) with pancreatic ductal adenocarcinoma cells that spontaneously arose from PanIN cells. Also, these results were reproduced in other models of OIS in primary human and mouse cells. We found that PanIN cells that progress into PDAC show enrichment for genes regulated by known drivers of CSCs such as NF- $\kappa$ B (333), STAT3 (330), and MYC (58). These cells also acquire properties of tumor-initiating cells including the ability to form tumor spheres in cell culture and ectopic tumors *in vivo* by extravasation. The protumorigenic pathways activated in cells that bypass senescence can be also stimulated by activation of PRRs that play an important role in the origin of pancreatic cancer (342). Finally, the subpopulation of tumor-initiating cells in PDAC cells show increased mitochondrial content and are sensitized to metformin. Taken together, these

observations suggest that OIS acts as an initial barrier for the proliferation of cells with oncogenic mutations but seems to prime cells to activate a stemness gene expression program that can contribute to progression into malignant tumors.

#### **2.3.4.1. The transition from PanIN**

Two models can explain the protumorigenic actions of cellular senescence. First, senescent cells secrete a variety of inflammatory factors that have been previously linked to tumorigenesis in a noncell autonomous manner and stimulate the progression of cells that have not fully entered senescence (351). Consistent with this idea, the histone deacetylase-associated protein SIN3B is required for Kras-induced senescence, secretion of IL-1 $\alpha$ , and progression to PDAC in the pancreas. Also, SASP factors induce stemness and proregenerative responses in the skin of mice (352). However, other studies show a tumor suppressor role for the SASP. For example, inactivation of RelA or the TGF $\beta$  pathway in mouse models of Kras-driven pancreatic cancer accelerated pancreatic cancer formation by inhibiting the SASP (353,354). In the liver, the SASP also plays a role in stimulation of antitumor immune responses (355,356).

A second model proposes that some senescent cells can evolve into tumor cells in a cell autonomous manner. In this case, intrinsic properties of the cells are important for tumor progression. Peeper and colleagues showed that inhibition of IL-6 expression could reverse human fibroblasts from RAF-induced senescence (357). Abbadie and colleagues have described an interesting mechanism in which rare senescent epithelial cells can give rise to a progeny of tumorigenic cells via amitotic cell division similar to budding (358). This process happens with a very low frequency and is stimulated by single-stranded DNA breaks (358). Recently, Schmitt and colleagues reported that senescent cells induced by chemotherapy in hematopoietic tumor cells express stemness genes and if they manage to overcome the cell cycle arrest they progress into very aggressive tumors (359). Further work will be required to find whether malignant tumors arise from fully senescent cells that escape from the arrest or from cell expressing the driving oncogene that avoided senescence due to factors in the microenvironment. The two models presented above (noncell autonomous vs. cell autonomous) are not mutually exclusive since it is plausible that specific inflammatory factors can act in synergy with cell intrinsic mechanisms that promote escape from senescence.

An important question still unresolved is the identity of the proinflammatory factors that can help to circumvent senescence. In a mouse model of Kras-driven pancreatic cancer, pancreatitis was required for PanIN lesions to progress to PDAC in association with inhibition of senescence (360). This study suggests that the factors secreted by PanIN cells are not sufficient to promote malignant progression and that other factors controlled by the microenvironment are important for tumorigenesis. The microbiota plays an important role in the origin of pancreatic cancer (361,362). Consistent with these results, we show here that LPS, a bacterial product, can stimulate the emergence of cells with stem cell properties from PanIN cells. Future investigation of the effect of LPS on PanIN cells can help to identify critical factors that affect their senescent phenotype. Of note, while senescence and LPS both involve increased NF- $\kappa$ B signaling, they differ on the status of the STAT3 pathway. During senescence, STAT3 is downregulated via proteasome-dependent protein degradation (151) and its phosphorylation is reduced in PanIN cells (Figure 2.2e). LPS can potentially change the SASP by activating STAT3 signaling (363), which can synergize with NF- $\kappa$ B, thereby changing gene expression patterns and promoting tumorigenesis (364). In addition, STAT3 can promote mitochondrial functions required for cancer cell stemness and metabolism (365). IL-6 activates STAT3 and promotes the development of PDAC from PanIN (366). Although this cytokine is required to maintain OIS in fibroblasts, it could have a different role in the pancreas linking LPS to STAT3 signaling and senescence bypass.

The biology of senescent cell populations can provide clues for the long-sought mechanism to explain why most malignant tumors occur in old individuals. Pre senescent and senescent cells seem primed to reactivate stem cell programs and mitochondrial genes that confer specific survival advantages (Figure 2.6j). Fortunately, cells that emerge from lesions containing senescent cells are sensitive to the antimetabolic drug metformin. The sensitivity to metformin in pancreatic cancer stem cells was explained by an intrinsic inability of these cells to turn on glycolysis upon inhibition of oxidative phosphorylation (58,344). In contrast, normal cells and the bulk of tumor cells (non-CSCs) survive inhibition of oxidative phosphorylation due to their ability to increase glycolysis. Of note, senescent cells are highly glycolytic (367) suggesting that the defects in this pathway observed in cancer stem cells are acquired during tumor progression. Metformin treatment of mice expressing oncogenic Kras in the pancreas delayed tumorigenesis and decreased the percentage of both early and late PanIN lesions (368). Also, metformin has been shown to target

selectively breast and pancreatic cancer cells with stem cell properties (58,339). These results are consistent with a requirement for mitochondria in cells capable of initiating tumor growth. Notably, cancer chemotherapy can induce tumor cell senescence with the potential risk that some cells escape from the process with stem cell properties (359). We suggest that metformin could be considered as a general adjuvant to prevent tumor regrowth from cells that acquired stemness induced by the treatment.

### **2.3.5. Materials and methods**

#### **Mouse experiments**

All mouse experiments were approved by the University of Montreal animal ethics committee (CDEA) or the subcommittee on research animal care of the Massachusetts General Hospital. For subcutaneous xenografts,  $5 \times 10^5$  or  $1 \times 10^6$  of the specified cells were suspended in 50  $\mu$ l PBS mixed with 50  $\mu$ l Matrigel (#356234; BD Biosciences) and then injected subcutaneously into the lower flank of SCID mice (C3SnSmm.CB17-Prkdcscid/J; Jackson Labs) or BALB/c nude mice (CAnN.Cg-Foxn1<sup>nu</sup>/Crl; Charles River). Mice were euthanized before the end point of the experiment when tumor volume reached 2 cm<sup>3</sup>. Tumors were weighed, their volumes were calculated according to the formula  $(\text{length} \times \text{width}^2)/2$ , and were fixed in formalin for paraffin embedding and then staining with hematoxylin and eosin (H9627; Sigma).

For orthotopic xenografts into the pancreas, SCID mice were subjected to general anesthesia with intraperitoneal injection of avertin 0.5 mg/g. A left lateral laparotomy was performed in order to visualize the spleen and then mobilize the distal pancreas. Approximately 100  $\mu$ l of cell suspension (50  $\mu$ l PBS and 50  $\mu$ l Matrigel) containing  $5 \times 10^5$  AH375 cells were injected into the pancreas. The abdominal incision was closed using silk suture 3/0 (K943H; Ethicon) for the peritoneum and the skin. The mice were inspected daily for a week for any health complication and were examined for tumor formation by palpation. Mice were euthanized after a maximum of 21 days, and pancreas was fixed in formalin for paraffin embedding and staining.

For tail vein assay of cancer metastasis, SCID mice were injected with a suspension of  $1.25 \times 10^6$  cells/ml was prepared in divalent cation-free PBS. The mice were placed in a restrainer and the tails were immersed in warm water (50–60°C) for 2 min to dilate the veins. Then, 200  $\mu$ l

of the cell suspension was injected into the lateral tail vein using a 3/10 cc syringe with a 29G $\frac{1}{2}$ ” needle. Mice were euthanized 3 weeks after injection and lungs were collected and fixed in formalin for paraffin embedding and staining.

### **Cell culture and viral-mediated gene transfer**

Human cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) or from the Massachusetts General Hospital Center for Molecular Therapeutics (CMT). IMR90 was obtained from ATCC and transduced with pBABE hTERT for this study. HMEC is from Lonza. MEFs were a kind gift of Dr. Sylvain Meloche (IRIC, University of Montréal, Qc, Canada). 1,497, 1,498, and 1,499 pancreatic ductal cell lines were isolated from 9-week-old Pdx1-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup> mice as reported previously (369). The transformed AH375 pancreatic ductal cell line was established from a 52-week-old Pdx1-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup> mouse. The procedure used for isolation and growth of 1,497, 1,498, 1,499 and AH375 cells is detailed in the Supplementary experimental procedures. For LPS-mediated conversion of PanIN cells into PDAC cells, PanIN 1,497 cells grown as adherent monolayers were treated for four weeks with 4  $\mu$ g/ml lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* (Sigma-Aldrich #L2880) in water or with vehicle (water). Culture medium and treatments were renewed every 2–3 days.

Retroviral and lentiviral-mediated gene transfers were done as described (151). For senescence bypass experiments, retrovirus expressing RasV12 and shERK2 were simultaneously used to infect target cell populations. Cell proliferation assays, SA- $\beta$ -Gal, soft agar assays, sphere-forming assays, immunoblotting procedure, immunofluorescence staining protocol, reagents, and plasmids are described in the Supplementary experimental procedures.

### **Flow cytometry and MitoTracker Green staining**

AH375 cells grown adherent or in suspension (tumor spheres) were trypsinized and stained with MitoTracker Green (Thermo Fisher) at 1/7,500 for 10 min at 37°C in PBS-EDTA 5 mM with 2% fetal calf serum. Cells were centrifuged and washed twice with 10 volumes of PBS-EDTA 5 mM with 2% fetal calf serum. Flow cytometry analysis was performed on a Canto II flow cytometer. MitoTracker Green fluorescence was detected in the GFP channel, gated on PI

(propidium iodide) negative single cells. Cell sorting was performed at IRIC cytometry platform on a BD FACSAria high-speed cell sorter.

### **Statistical analysis**

Student's t tests or ANOVA were used for comparisons between groups based on an assumption of normal distribution. Significant differences were considered at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Results are represented as means  $\pm$  standard deviation (SD).

### **Conflict of interest**

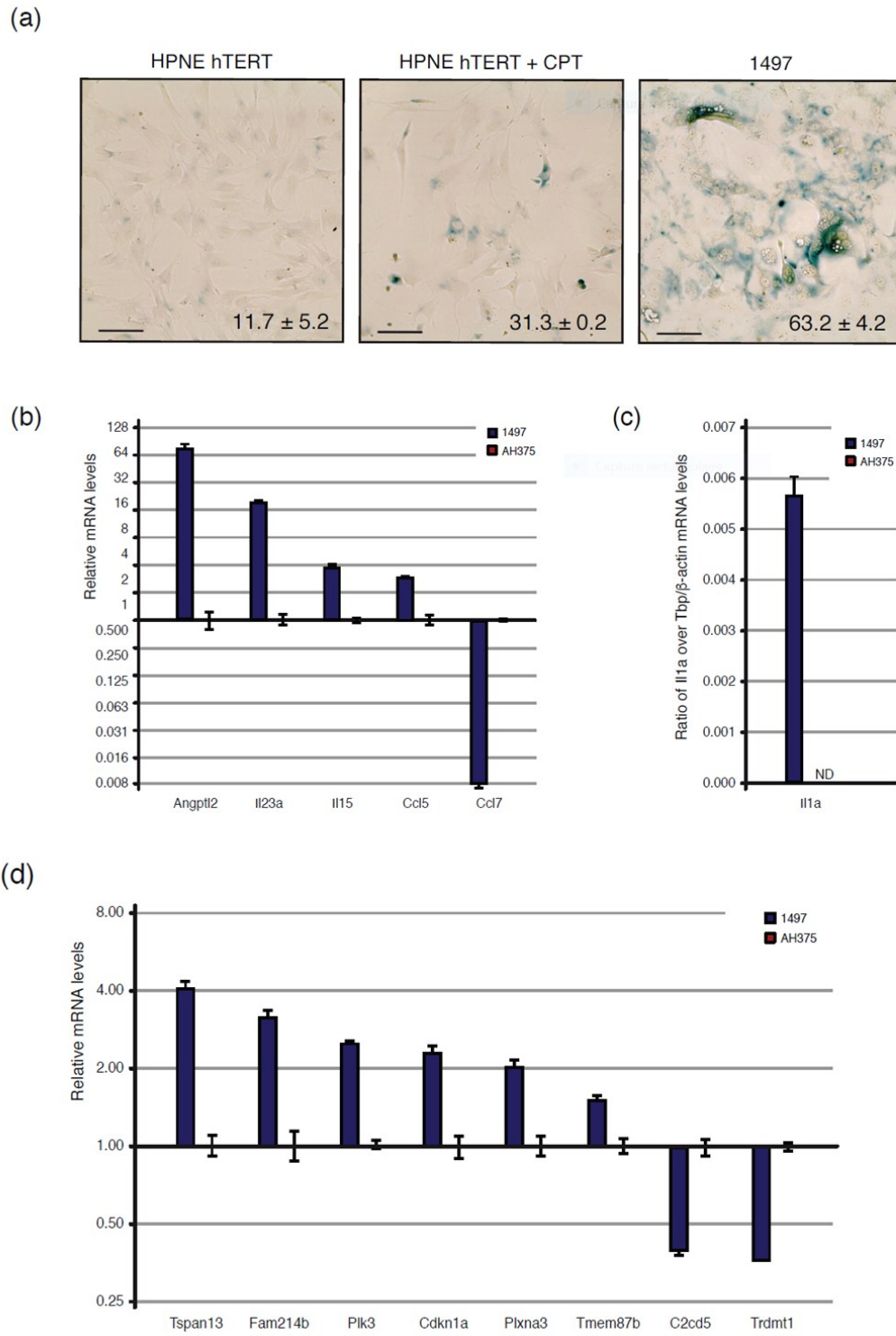
None declared.

### **2.3.6. Acknowledgments**

We thank the members of the Bardeesy's laboratory for technical support. This work was supported by the Vanier Canada Graduate Scholarships Program and Michael Smith Foreign Study Supplements Program to X. Deschênes-Simard. MC. Rowell was supported by a fellowship from FRQS (Fonds de recherche du Québec Santé). B. Le Calvé benefits from a Postdoctoral Move-in-Louvain-Marie Curie grant. N. Bardeesy is supported by grants from the National Institutes of Health (R01 CA133557-05 and P01 CA117969-07) and the Linda J. Verville Cancer Research Foundation. G. Ferbeyre is a FRSQ national research fellow and is supported by grants from the Canadian Institute of Health and Research (CIHR MOP11151 and PJT 153217), IDRC PI112847, and the Cancer Research Society.

### **2.3.7. Supplemental material**

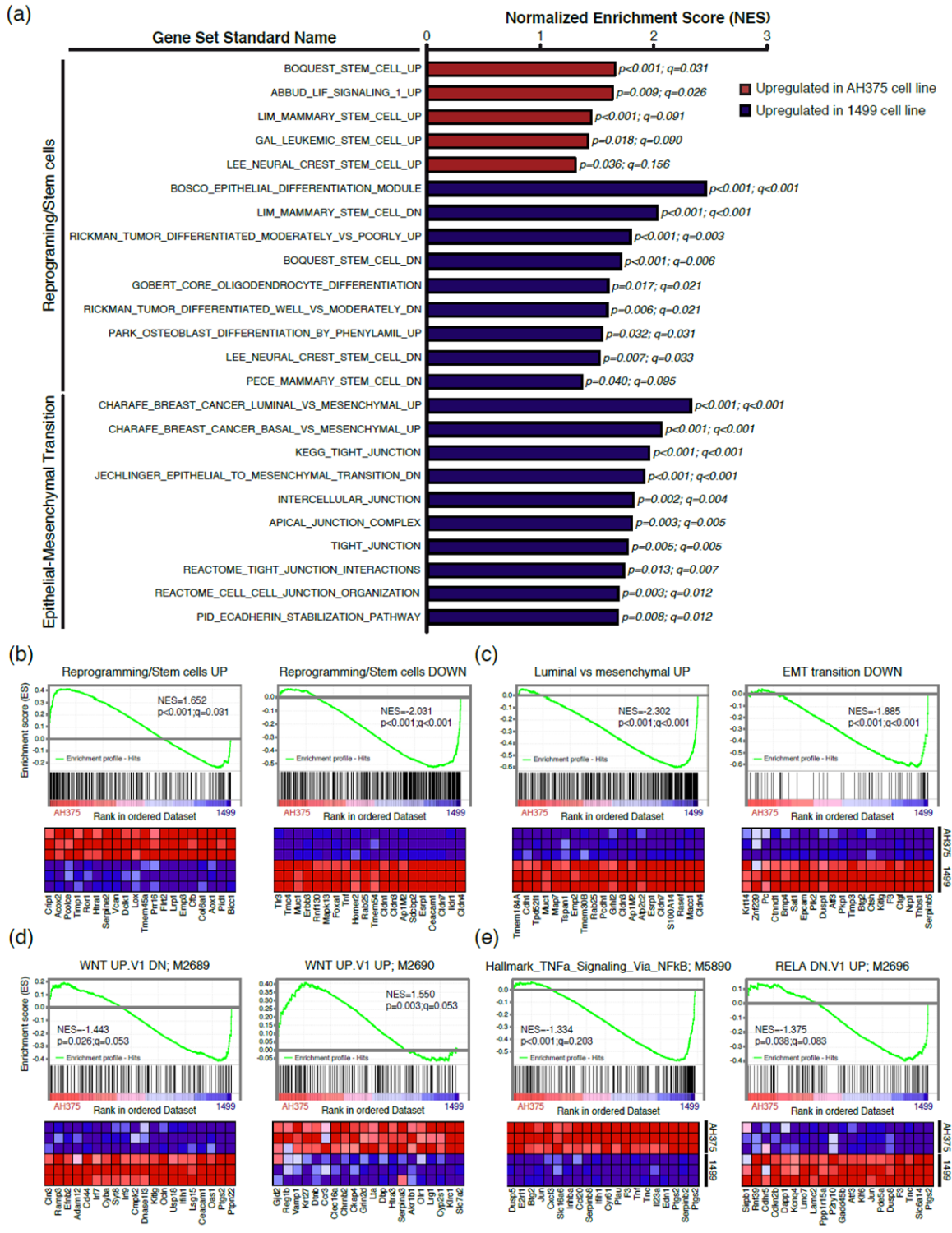
#### **2.3.7.1. Supplementary results**



**Figure 2.7. (Fig. S1) Senescence markers of in 1497 PanIN cells in comparison with AH375 PDAC cells.**

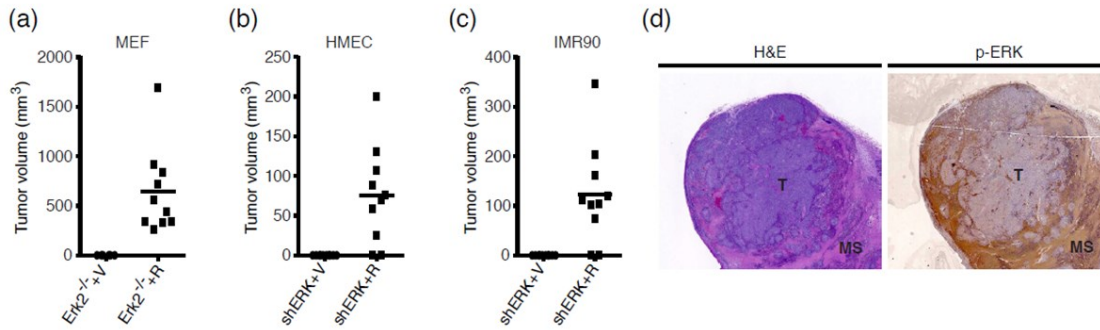


(a) Percentage of SA- $\beta$ -Gal positive cells and SD of triplicates, n=2. HPNE hTERT primary pancreatic epithelial cells were used as negative controls and the same cells treated with camptothecin (25 nM) for four days, were used as positive control. Note that 1497 cells are more senescent than camptothecin treated cells. (b) QPCR for Angpt2, Il23a, Il15, Ccl5 and Ccl7 in AH375 (PDAC) and 1497 cells (PanIN). (c) QPCR for Il1a as in (b). Note that the Il1a mRNA was not detectable in PDAC cells. (d) QPCR for senescence genes in cells as in (b). Error bars indicate mean  $\pm$  SD, n=3.



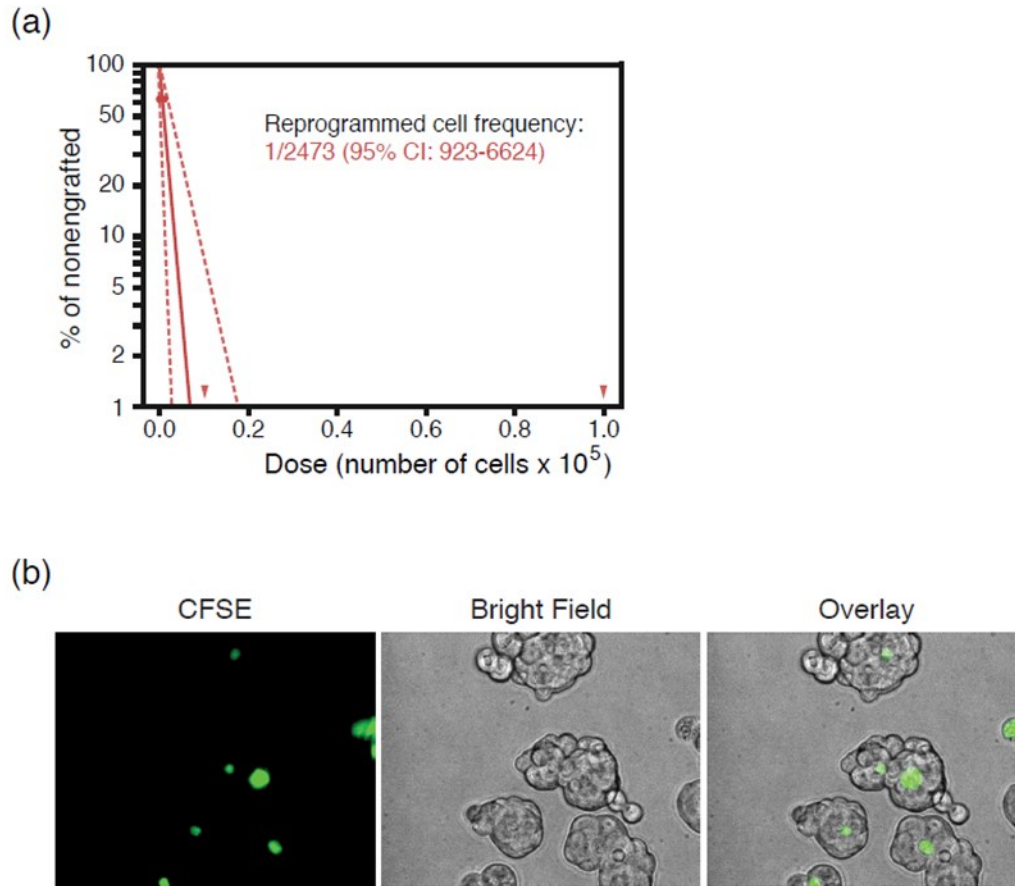
**Figure 2.8. (Fig. S2) The transition from PanIN to PDAC involves acquisition of stem cell and EMT gene expression modules.**

(a) Compilation of significant gene expression signatures suggesting stem cell properties and EMT in AH375 cells. Red, gene expression module enriched in AH375 cells; Blue, gene expression module enriched in 1499 cells. (b) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of microarray data revealed several gene expression signatures of stem cells in AH375 and differentiation in 1499 cells; the most significant are shown. (c) Numerous gene expression signatures suggest epithelial-mesenchymal transition (EMT) in AH375 cells; the most significant are shown. (d-f) Gene expression signatures suggesting LIF signaling and WNT pathway activation (WNT UP.V1 DN; M2689) in AH375 cells. (g) Genes downregulated by NF- $\kappa$ B (RELA DN.V1 UP; M2696) are enriched in AH375 PDAC cells.



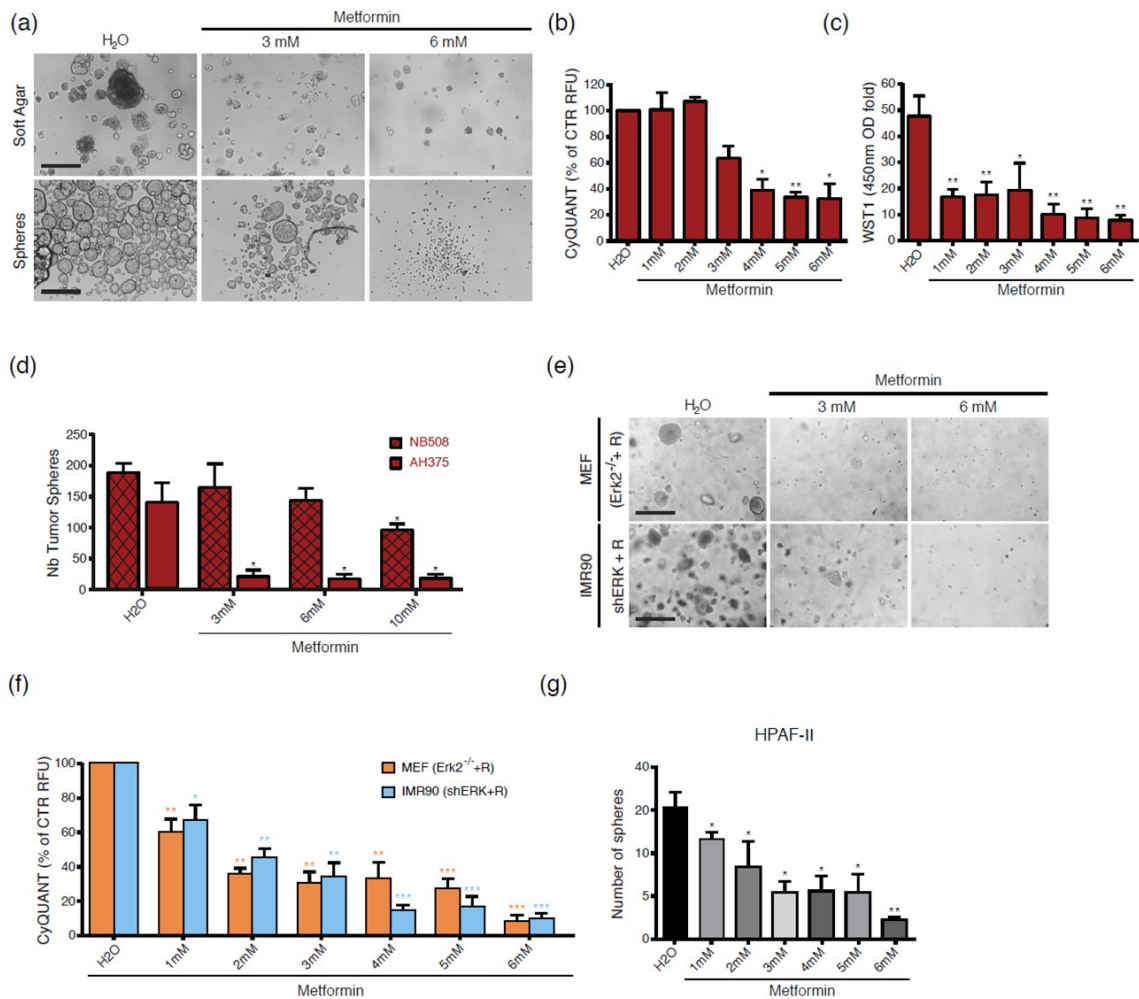
**Figure 2.9. (Fig. S3) Ras-induced transformation of mouse embryonic fibroblasts and human primary cells expressing low ERK levels.**

(a) Volume of solid tumors 32 days after subcutaneous injection into BALB/c nude mice of  $1 \times 10^6$  Erk2-null mouse embryonic fibroblasts (MEFs) transduced with an empty vector (V) or a vector expressing HRasG12V (R). (b) Volume of cystic tumors 32 days after subcutaneous injection into BALB/c nude mice of  $1 \times 10^6$  normal human mammary epithelial cells (HMEC) transduced with an shRNA targeting ERK2 (shERK), a vector expressing hTERT and an empty vector (V) or a vector expressing HRasG12V (R). (c) Volume of solid tumors 32 days after subcutaneous injection into BALB/c nude mice of  $1 \times 10^6$  normal human fibroblasts from the lung (IMR90) transduced as in (b). (d) Representative immunohistochemical staining with anti-p-ERK of tumors as in (c). H&E, hematoxylin and eosin. T, tumor; MS, mouse stroma.



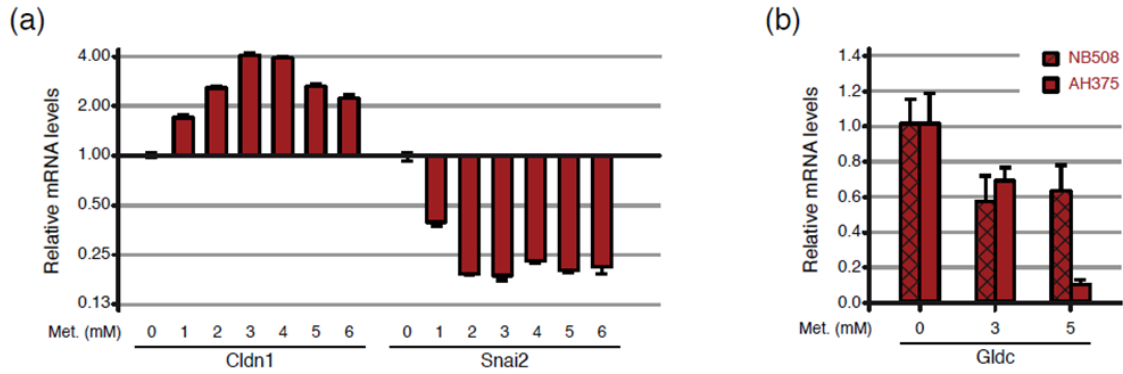
**Figure 2.10. (Fig. S4) Stem cell properties of AH375 cells.**

(a) Serial limiting dilutions of AH375 cells (10,000, 1,000, 100 cells) were injected subcutaneously in SCID mice. The number of visible tumors for each injection was scored and the data was analyzed with extreme limiting dilution analysis (ELDA) (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>). We found that 1/2473 cells were capable of initiating tumors. The confidence interval (CI) is indicated. (b) Micrograph pictures of tumor spheres of CFSE-stained AH375 cells taken 3 days after CFSE staining.



**Figure 2.11. (Fig. S5) Metformin targets reprogrammed pancreatic cancer cells.**

(a) Metformin inhibits the capacity of AH375 cells to form colonies in soft agar (top) and in tumor sphere assay (bottom). Scale bar = 200 μm. (b) Quantification of proliferation over a 7-days period in soft agar of cells as in (a) using the CyQuant GR dye. The relative fluorescence unit (RFU) at 520 nm of the control (H<sub>2</sub>O) is expressed as 100% and the other results are expressed as the percent of control. Average of triplicates ± SD, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. (c) Proliferation of tumor spheres as in (a) over a period of 7 days expressed as the fold of absorbance at 450 nm after coloration with the WST-1 cell proliferation assay. Average of triplicates ± SD, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. (d) Effects of metformin on reprogrammed pancreatic cancer cells. Metformin inhibits the capacity of AH375 and NB508 cells to form tumor spheres. The number of tumor spheres after 7 days was counted by microscopic examination. Average of triplicates ± SD. (e) Metformin inhibits the capacity of HRasG12V (R)-transformed Erk2-null MEF and IMR90 (hTERT+shERK) to form colonies in soft agar. Scale bar = 400 μm. (f) Quantification of proliferation over a 7-days period in soft agar using the CyQuant GR dye. The relative fluorescence unit (RFU) at 520 nm of the control (H<sub>2</sub>O) is expressed as 100% and the other results are expressed as the percent of control. shERK, shRNA against ERK2; R, HRasG12V. Average of triplicates ± SD, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001. (g) Number of spheres formed by HPAF-II cells after treatment for 7 days with the indicated concentration of metformin. Average of triplicates ± SD, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.



**Figure 2.12. (Fig. S6) Effects of metformin on gene expression.**

(a) Relative mRNA levels measured by qPCR for Cldn1 (upregulated in epithelial cells) and Snai2 (downregulated in epithelial cells) in AH375 cells treated with the indicated concentration of metformin (Met). Average of triplicates  $\pm$  SD. (b) Metformin inhibits glycine decarboxylase in reprogrammed pancreatic cancer cells. QPCR for glycine decarboxylase (Gluc) in AH375 and NB508 cells treated with the indicated doses of metformin for 5 days. Error bars indicate mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ .

### 2.3.7.2. Supplementary experimental procedures

#### Reagents and Plasmids

Metformin hydrochloride (#1396309, Sigma) was diluted in H<sub>2</sub>O and added to cell media at the indicated concentrations. pFG12-CMV-hTERT-IRES-GFP, pWZL-hygro and pWZL-hygro/HRasG12V were described before (230,370). pLPC-puro/E1A and pLPC-puro/c-MYC-HA is a kind gift from Dr. Scott W. Lowe (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New-York, NY). The pLKO-puro lentiviral vectors used to express a non-targeting shRNA (shCTR) or a shRNA against ERK2 (shERK) were from Sigma (SHC002, TRCN0000010041).

#### Pancreatic Ductal Cell Isolation

The protocol for isolation of 1497, 1498, 1499 and AH375 cells was adapted from a previously published method (371). Briefly, mice were euthanized, the pancreas was gently resected, minced and digested in 10 ml of Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 2 mg/ml collagenase D (#11088858001, Roche Applied Science) during 25 min at 37°C with agitation by magnetic stir. The cell suspension was pelleted by centrifugation at 1200 rpm for 5 min and cells were washed once with PBS. Then, cells were resuspended in 3 ml of 0.05% trypsin-EDTA (#25300-054, Gibco) and incubated for 3 min at 37°C. Three volumes of DMEM + 10% FBS were added to neutralize trypsin, the cell suspension was filtered through a 85 µm nylon mesh and then pelleted by centrifugation at 1200 rpm for 5 min. Cells were resuspended in a small volume of PBS pH 7.2 + 0.5% BSA + 2 mM EDTA and counted. A suspension of 1 to 1.5 x 10<sup>6</sup> cells/ml was made in the same buffer and Fluorescein-conjugated DBA (FITC-DBA) lectin (FL-1031, Vector Labs) was added at a dilution 1:400. Cells were incubated at 4°C for 10 min and then pelleted by centrifugation at 1200 rpm for 5 min. Cells were washed once with PBS pH 7.2 + 0.5% BSA + 2 mM EDTA and then resuspended in 3 ml of the same buffer. FITC-positive cells were sorted by FACS at low pressure and seeded in wells of a 48-well plate pre-coated with laminin and containing pancreatic medium. The NB508 PDAC cell line was established from the Pdx1-Cre;LSL-KrasG12D;p53Lox/+ mouse model as described previously (187).



## **Cell growth**

All cells were cultured with 5% CO<sub>2</sub> supply at 37 °C in a humidified incubator. They were cultured in the following media: IMR90, HPAF-II, HEK 293T and MEF in DMEM (#319-015-CL, Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent) and 1% penicillin G/streptomycin sulphate (P/S; Wisent); HMEC in 90% MEGM completed with bovine pituitary extract, human recombinant Epidermal Growth Factor, insulin, hydrocortisone and Gentamicin/Amphotericin as provided in the MEGM Bullet kit (CC-3150; Lonza); NB508 in RPMI (#350-000-CL, Wisent) supplemented with 10% FBS and 1% P/S; 1497, 1498, 1499 and AH375 cells were propagated on surfaces coated with laminin (#354239, BD Biosciences) in pancreatic medium consisting of DMEM-F12 (#11330-032, Gibco) supplemented with 5 mg/ml D-glucose, 1.22 mg/ml Nicotinamide (N-3376, Sigma), 5 nM 3,3',5-triiodo-L-thyronine (#91990, Sigma), 1 µM Dexamethasone (D1756, Sigma), 100 ng/ml Cholera toxin (C8052, Sigma), 5 ml/L ITS+ (#354352, BD Biosciences), 0.1 mg/ml Soybean Trypsin Inhibitor type 1 (T6522, Sigma), 20 ng/ml EGF (#5331-LF, Cell Signaling Technology), 5% Nu-Serum IV (#355104, BD Biosciences), 25 µg/ml Bovine Pituitary Extract (13028-014, Gibco) and 1% P/S. Adherent cells were trypsinized using trypsin-EDTA 1X (Stock 10X; 325-052-EL, Wisent) except for mouse pancreatic ductal cells. For the latter, cell dissociation was done using TrypleE (12604-013, Gibco).

## **Cell Proliferation Assays and SA-β-Gal**

Cells were plated in 48-well plates at 5000 cells per well in 0.5 ml of media. At the indicated time points, 50 µl of 12 mM MTT reagent (M-6494, Molecular Probes) was added to each well and cells were incubated 3 hours at 37°C. After incubation, the medium was aspirated, and the cells dried at room temperature. Then, the formazan was solubilised with 200µl DMSO and the absorbance at 540 nm was measured using a microplate reader. The relative proliferation is expressed as the fold of absorbance between a specific time point and the beginning of the experiment (day 0). SA-β-Gal was performed as previously described (151).

## **Soft Agar Assays**

Soft agar assays with MEF and IMR90 cells were done on 96-well flat-bottom microplate with 5000 cells seeded per well by using the CytoSelect™ 96-Well Cell Transformation Assay

kit (CBA-130, Cell Biolabs) as described previously (151). For mouse pancreatic cells, the protocol was adapted to substitute the required specific culture medium. Agar was directly solubilized in the culture medium by incubating at 95°C to obtain a concentrated 2.4% agar solution. This solution was cooled to 37°C in a water bath and then medium was added to obtain a final solution of 0.6% agar. The latter solution was used for the base agar layer and to mix with cell suspensions. The normal protocol was then followed, but with the specific medium.

### **Sphere-Forming Assays**

To examine the capacity of tumor sphere formation, cells were trypsinized and washed with PBS to remove FBS. Cells were cultured in ultra-low attachment 24-well plates (#3473, Corning) (1000 cells/well) and in 1 ml of CSC medium, consisting of DMEM-F12 (#11039-021, Gibco) supplemented with B-27 Supplement (#17504-044, Gibco), 20 ng/ml EGF (mouse cells: #5331-LF, human cells: #8916-LF, Cell Signaling Technology) and 20 ng/ml  $\beta$ FGF (mouse cells: #5414-LF, human cells: #8910-LF, Cell Signaling Technology). The cells were incubated in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for the indicated period of time and supplements (B-27, EGF,  $\beta$ FGF) were added every 4 days at the above concentration. Spheroids were counted using a microscope. The sphere size was evaluated by an automated analysis of pictures with the software CellProfiler (Broad Institute). To evaluate cell proliferation two methods were used: 1) cells (one day after seeding) and spheroids (at the experiment end point) were incubated with 100  $\mu$ l of premixed WST-1 reagent (#630118, Clontech) for 3 hours at 37°C. The absorbance at 450 nm was measured using a microplate reader and the results are expressed as the fold of absorbance. 2) Spheroids were manually counted during microscopic examination. For CFSE staining of tumor spheres, AH375 cells were stained with CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Thermofisher #C34554) following manual instructions. Stained cells were then seeded in suspension in tumor sphere medium at 1000 cells/well in 12 well plates.

### **Immunoblotting**

Adherent cells were washed with PBS and then scraped on ice into 250 to 500  $\mu$ l of ice cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) containing 1X Complete-EDTA free Protease Inhibitor Cocktail (#11 873 580 001, Roche Applied Science) and 1X PhosSTOP Phosphatase Inhibitor

Cocktail (#04 906 837 001, Roche Applied Science). Cell lysates were kept on ice for 15 min, sonicated 40 seconds at a low intensity and then cleared by centrifugation at 13 000 RPM for 20 min. Protein concentration was evaluated using the Micro BCA Protein Assay Kit (#23235, Thermo Scientific) and the concentration of samples was normalized by adding appropriated quantity of RIPA buffer. The samples were completed with 1X Laemmli buffer (Stock of 6X: 12% SDS, 47% glycerol, 60 mM Tris pH6.8, 0.06% bromophenol blue) and 10%  $\beta$ -mercaptoethanol. Then the lysates were boiled 5 min and conserved at -80oC until migration. Proteins were separated by SDS-PAGE and to Immobilon-P PVDF membrane (IPVH00010, Millipore). Membranes were blocked 1 hour at room temperature in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) and 5% dry milk and then washed 3 times 5 min with TBS-T. The membranes were incubated with the primary antibodies diluted in TBS-T + 3% BSA + 0.05% Na-azide overnight at 4oC or 1 hour at room temperature. The following primary antibodies were used: anti-c-MYC (1:1000; clone D84C12, #5605, Cell Signaling Technology), anti-ERK1/2 (1:400; Sc-94 (K-23), Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-ERK1/2T202/Y204 (1:2000; clone D13.14.4E, #4370, Cell Signaling Technology), anti-H-Ras (1:250; clone F235, Sc-29, Santa Cruz Biotechnology), anti-I $\kappa$ Ba (1:1000; #9242, Cell Signaling Technology), anti-phospho-I $\kappa$ Ba S32 (1:1000; clone 14D4, #2859, Cell Signaling Technology), anti-Nanog (1:2000; clone D73G4, #4903, Cell Signaling Technology), anti-STAT3 (1:1000; clone 124H6, #9139, Cell Signaling Technology), anti-phospho-STAT3S727 (1:1000; #9134, Cell Signaling Technology), anti-phospho-STAT3Y705 (1:1000; #9131, Cell Signaling Technology), anti- $\alpha$ -Tubulin (1:20000; clone B-5-1-2, T6074, Sigma-Aldrich), anti- $\beta$ -actin (1:10000; clone 8H10D10, #3700, Cell Signaling Technology). Membranes were washed 3 times 5 min with TBS-T and then incubated with the secondary antibodies diluted in TBS-T + 5% dry milk 1 hour at room temperature. The following secondary antibodies were used: goat anti-rabbit IgG conjugated to HRP (1:3000, #170-6515, Bio-Rad) or goat anti-mouse IgG conjugated to HRP (1:3000, #170-6516, Bio-Rad). Finally, the membranes were washed 3 times 5 min with TBS-T. Immunoblots were visualised using enhanced chemiluminescence (ECL) detection systems and Super RX X-Ray films (Fujifilm) or a ChemiDoc<sup>TM</sup> MP system (Bio-Rad). Band quantification was done using ImageJ or Image Lab 4.0 (Bio-Rad).

## Immunofluorescence

For paraffin-embedded tissues, slides with tissue samples were deparaffinized and rehydrated by sequential incubation in xylenes (3 x 5 min), 100% ethanol (2 x 2 min), 95% ethanol (1 x 2 min), 70% ethanol (1 x 2 min) and dH<sub>2</sub>O (2 x 2 min). Heat-induced epitope retrieval was performed using a pressure cooker for 20 min in Tris-EDTA-based buffer pH 9.0 (ab93684, Abcam). Slides were cooled down for at least 1 hour, washed once for 5 min with PBS and once for 5 min with PBS + Tween 20 (PBS-T). Tissues were delimited using a hydrophobic barrier pen. Tissues were blocked 1 hour at room temperature with PBS-T + 2% BSA and then incubated with anti-c-MYC (1:800; clone D84C12, #5605, Cell Signaling Technology) or anti-phospho-ERK1/2T202/Y204 (1:400; clone E10, #9106, Cell Signaling Technology) diluted in the same buffer overnight at 4°C. Slides were rinsed 3 times for 3 min in PBS-T and then incubated with donkey anti-rabbit AlexaFluor 488 (1:400; A-21206, Molecular Probes) diluted in PBS-T + 2% BSA for 45 min at room temperature. Slides were washed 3 times for 5 min in PBS-T and then mounted with Vectashield Mounting Medium with DAPI (H-1200, Vector Labs). Images were captured with a Nikon Eclipse 80i upright microscope.

For cell lines 1498 (passage 7) or AH375 cells (passage 21) were seeded on mouse laminin I coated coverslips (NeuVITRO). Cells were fixed on coverslips with paraformaldehyde 4%, then permeabilized in a solution of PBS1X, 2% BSA, 0,2% Triton X-100. Cells were blocked with a solution of PBS1X, 2% BSA and immunostained for 1 hour at 4°C with the following primary antibodies: anti-53BP1 rabbit polyclonal (1:200, Ab-1, Cat# PC712, lot: D00137736, Calbiochem, EMD Biosciences, San Diego, CA); anti-phospho- $\gamma$ H2A.XS139 mouse monoclonal (1:175, JBW-301, lot: 2552645, Millipore, Billerica, MA); anti-HP1 $\gamma$  mouse monoclonal (1:400, MAB3450, lot JC1686017, Millipore Billerica, MA). Appropriate secondary antibodies were used for immunostaining during 1h at RT in the dark: goat anti-mouse IgG AlexaFluor 488 (1:1000; A11029, Lot 1423008, Molecular Probes, Eugene, OR); goat anti-rabbit IgG AlexaFluor 568 (1:1000, A11036, Lot 1504529, Molecular Probes, Eugene, OR). Coverslips were mounted with ProLong Gold antifade reagent with DAPI (P36935, Molecular Probes, Eugene, OR). Images were acquired with a FV300 Olympus confocal microscope with a PMT 1st generation and Fluoview V4.2. Images were processed with ImageJ.

## **Immunohistochemical Analyses**

Tissue samples were melted at 55°C for 1 hour and then deparaffinized and rehydrated by sequential incubation in xylenes (2 x 5 min), 100% ethanol (1 x 5 min), 95% ethanol (1 x 3 min), 75% ethanol (1 x 3 min) and 40% ethanol (1 x 3 min). Samples were washed in PBX/0.3% Triton X-100 5 min and then in dH<sub>2</sub>O 3 min. Heat-induced epitope retrieval was performed using a pressure cooker for 20 min in citrate-based buffer (H-3300, Vector Labs). Samples were cooled down for at least 1 hour and then washed 3 times during 3 min with PBS/0.3% Triton X-100. Endogenous peroxidase was inactivated by incubation for 10 min at room temperature in a solution of 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Samples were washed 3 times for 3 min in PBS/0.3% Triton X-100 and tissues were delimited using a hydrophobic barrier pen. Tissues were blocked 1 hour at room temperature with 5% goat serum in PBS/0.3% Triton X-100, and then incubated with primary antibodies diluted in the same buffer overnight at 4°C. The following primary antibody was used: anti-phospho-ERK1/2T202/Y204 (1:400; clone D13.14.4E, #4370, Cell Signaling Technology). Tissues were washed 3 times for 3 min in PBS/0.3% Triton X-100 and then incubated with secondary antibodies diluted in PBS/0.3% Triton X-100 + 5% goat serum during 1 hour at room temperature. The following secondary antibody was used: biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200; BA-1000, Vector Labs). Slides were incubated with ABC Elite reagent (PK-6100, Vector Labs) 30 min at room temperature (prepared 30 min before incubation), and then washed 3 times for 3 min with PBS/0.3% Triton X-100. Finally, the specimens were stained for peroxidase with Di-amine-benzidine (DAB) substrate kit (SK-4100, Vector Labs). The reaction was stopped by washing with water when the staining was sufficient; the same incubation time was applied to all samples. Tissues were counterstained with hematoxylin ad eosin (H9627, Sigma) and dehydrated by sequential incubation in 40% ethanol (1 x 1 min), 75% ethanol (1 x 1 min), 95% ethanol (1 x 1 min), 100% ethanol (1 x 1 min) and xylenes (2 x 5 min). Finally, slides were mounted with Sub-X Mounting Medium (#13519, EMS).

## **Microarrays**

### *RNA quality, cDNA synthesis and data acquisition*

Total RNA extracts were prepared in TRIzol (#15596-026, Ambion), and their purification was performed according to the manufacturer's instructions. The RNA solution was further

purified using the RNeasy MinElute Cleanup Kit (#74204, Qiagen). Solutions of 100 ng/μl RNA were sent to Génome Québec Innovation Centre for RNA processing, hybridation on GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array or GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix) and data acquisition. The microarray data discussed were deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO Series accession numbers GSE33613 and GSE57566.

The Eukaryote Total RNA Nano assay of the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) was used to validate total RNA integrity. The protocol from the Ambion® WT Expression kit for Affymetrix® GeneChip® Whole Transcript (WT) Expression Arrays (Applied Biosystems) was followed to prepare cDNAs. The single-stranded cDNAs were treated with Uracil DNA glycosylase, fragmented with APE1 enzyme and labelled with Biotin Allonamide Triphosphate according to the instructions of the GeneChip® WT Terminal Labeling Kit (Applied Biosystems). Labelled cDNAs were hybridized for 16 hours at 45°C with rotation at 60 rpm on the appropriated DNA Gene Chip. The DNA chips were washed and stained in the Affymetrix Fluidics Station 400 according to the manufacturer's instructions and then scanned on a GeneChip® Scanner 3000 7G/4 Color Early Access (Affymetrix).

#### *Data normalization and analysis*

Data from triplicates of each condition were analyzed with the FlexArray 1.6.3 software (372) using Affymetrix default analysis settings. Raw data were normalized with a Robust Multi-array Average (RMA) algorithm, the mean fold change in the signal intensity between conditions was determined for all transcripts and a two-sample student's t-test was used to identify significant changes. Transcripts with a fold change greater than  $\pm 2$  and a p-value  $<0.05$  were considered for further analysis.

### **Bioinformatics analyses**

#### *Inferring biological functions*

A FatiGO single enrichment analysis with the Babelomics 4.3 platform (373) was performed to infer biological functions affected between experimental conditions. The Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) terms significantly

enriched among transcripts when compared with the rest of the genome were identified. These terms and their associated transcripts were grouped in general categories as indicated.

#### *Prediction of regulated transcription factors*

The Distant Regulatory Elements of Co-regulated genes (DiRE) web-based application (374) was used to predict regulated transcription factors (TF). A random set of 5000 genes was used as the source of background genes.

#### *Gene set enrichment analysis*

An unbiased global analysis of gene set enrichment with The Gene set Enrichment Analysis (GSEA) 2.0.14 software (375) was used to identify the relevant phenotypes significantly over represented in the experimental conditions of interest. A positive NES indicates a correlation with the phenotype that is compared to the phenotype used as a reference, while a negative NES indicates correlation with the opposite phenotype (the reference). The significance of NES values is determined by the False Discovery Rate (FDR; q-value) and by a nominal p-value calculated by using an empirical phenotype-based permutation test procedure. The threshold of significance was set at a p-value  $\leq 0.05$  and a q-value  $\leq 0.25$ . The ranking metric used was the signal-to-noise ratio and 1000 permutations were performed.

#### *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)*

DAVID v6.7 (376,377) was used for Figure 5a and 5b. An unbiased analysis of the whole microarray dataset was used to retrieve significant functional gene clusters, as well as the GO and KEGG terms enriched among these clusters.

#### **Quantitative PCR (qPCR)**

Total mRNA extracts were prepared in TRIzol (Invitrogen) as described before (231). Gene expression levels were determined with a lightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science) according to the SYBR Green technology and the relative quantification was determined by using the  $\Delta\Delta CT$  method. The primers used are presented below:

**Table 1.1. Primers used for qPCR analyses.**

<b>Target</b>	<b>Forward primer (5'→3')</b>	<b>Reverse primer (5'→3')</b>
<b>Actb*</b>	TCCTAGCACCATGAAGATCAAGATC	CTGCTTGCTGATCCACATCTG
<b>Angptl2</b>	CCCTGGAGGTTGGACTGTCATC	CGATGTTCCCAAACCCTTGCTT
<b>C2cd5</b>	GGTAAAGGTTGTCTTATTCAGGCAAGG	GGCAAGAGATTACTGATAGCTGTGG
<b>Ccl5</b>	CCCCTACTCCCCTCGGTCT	TGATTTCTTGGGTTTGCTGTGC
<b>Ccl7</b>	ATGAGGATCTCTGCCACGCTTC	TAGCAGCATGTGGATGCATTGG
<b>Cdkn1a</b>	TCCACAGCGATATCCAGACA	GGACATCACCAGGATTGGAC
<b>Cldn1</b>	CGACTCCTTGCTGAATCTGAACAGT	TGGACACAAAGATTGCGATCAG
<b>Fam214b</b>	CCCAAGGAGCCTGTTTTGGA	TCGAAGGGAGCTTAGCTTCAGG
<b>Gesh</b>	CACCGGATCTGCTTTGCTGTC	CTGATTCCCACCGTTCCAATA
<b>Glde</b>	TCAATAGCTCCTCCGAACCTTGC	GCACAAAGGGGTGGATGTTGG
<b>Glul</b>	CTCGCTCTCCTGACCTGTTC	TTCAAGTGGGAACCTTGCTGA
<b>Igfbp4</b>	CATTCCAAACTGTGACCGCAAC	CTGTCTTCCGATCCACACACCA
<b>Il15</b>	CAGAGGCCAACTGGATAGATGT	TGCAACTGGGATGAAAGTCACTG
<b>Il1a</b>	TCCATAACCCATGATCTGGAAGA	TTTGGTTGAGGGAATCATTAT
<b>Il23a</b>	TCCCTACTAGGACTCAGCCAACTC	GAACTCAGGCTGGGCATCTGTT
<b>Plk3</b>	CCCCAGAGCAGAGGAAAAAGAC	ATGGCCCTGTCTCAGCAGCA
<b>Plxna3</b>	TGTCACCAAGTACCGTCAGGAGA	GCTGGACACCAGGGTGATGAT
<b>Shmt2</b>	TGACCCTGAGATGTGGGAGCTT	AGCTCGGCTGCAGAAGTTCTCT
<b>Snai2</b>	TGTGGCAAGGCTTTCTCCAG	AGAAAGGCTTTTCCCCAGTGT
<b>Sparc</b>	AATTTGAGGACGGTGCAGAGGA	CATGTTTGCAATGATGGTTCTGG
<b>Stat3</b>	GCCTGTCTGCAGAGTTCAAGCA	GCAGCTCCTCAGTCACGATCAA
<b>Tbp*</b>	GTTTCTGCGGTCGCGTCATTTT	TCTGGGTTATCTTCACACACCATGA
<b>Tmem87b</b>	CCTGTCACAATGATTACCCTGATCT	CAGACATCTGGATCAGCATGAAGT



<b>Trdmt1</b>	GGTTGCGAGAGGATGGAACC	TGTGCAGGGATATGACTTTCTCG
<b>Tspan13</b>	TCCTCGTGCGCCCCATAAT	GTCAGCCAAACACCCAGGATCT
<b>Vim</b>	AAAGCGTGGCTGCCAAGAAC	CAGCCTCAGAGAGGTCAGCAAA

---

\*: housekeeping genes

### **3. Cibler la biogénèse ribosomique renforce la sénescence induite par ERK dans le cancer pancréatique**

### 3.1. Mise en contexte de l'article 2

Dans ce deuxième article, nous renforçons l'idée selon laquelle les lésions bénignes du pancréas sont sénescentes, en démontrant que celles-ci possèdent un haut niveau d'activation de p-ERK. Conséquemment, nous montrons également la forte diminution de cette signalisation dans le stade PDAC, appuyant le rôle de la sénescence comme barrière qui est cependant contournée lors de la progression. Toutefois, puisque la progression des PanIN en PDAC corrèle également avec la perte d'importants gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53 et p16, nous souhaitons déterminer si les cellules PDAC possédaient toujours des mécanismes actifs permettant une induction de sénescence suivant une réactivation génétique ou pharmacologique de la voie ERK. La réactivation de la voie ERK dans le stade avancé visait en quelque sorte à mimer un retour vers le stade PanIN.

Nous avons observé que la réactivation de la voie par une construction active de RAF1 est associée à l'induction d'une sénescence partielle, caractérisée par une réduction des marqueurs classiques de prolifération, mais également par un phénotype de stress nucléolaire. Sachant que le nucléole est un important senseur de stress cellulaire et que la ribogénèse est un processus qui requiert une fine régulation, notamment au niveau de la coordination entre les différentes polymérases d'ARN, nous pensons que l'altération de la ribogénèse demeure une cible de choix pour l'induction d'un mécanisme de suppression tumorale en absence de p53 et p16.

Finalement, nous avons posé l'hypothèse que les thérapies les plus efficaces dans le cancer pancréatique devaient également s'appuyer sur ces mécanismes résiduels pour promouvoir la suppression tumorale. Ainsi, c'est la conclusion à laquelle nous sommes arrivés dans cet article 2, soit que le FOLRIFINOX reproduit plusieurs caractéristiques de la sénescence, notamment l'activation de la voie ERK, l'altération de la ribogénèse, le stress nucléolaire, de même qu'une diminution protéique de facteurs rapportés comme faisant partie du SAPD. Une approche pro-sénescence est donc viable, et en fait, déjà exploitée pour le traitement du cancer pancréatique. Les mécanismes identifiés sont donc pertinents pour comprendre la susceptibilité résiduelle des cellules cancéreuses pancréatiques pour la sénescence, bien que celle-ci soit supposée comme réversible, vu les patients qui rechutent suite à ce traitement.

## 3.2. Contribution à l'article 2

L'article 2 est l'article principal de ma thèse. Les résultats des Figure 3.1, Figure 3.2, Figure 3.8, et Figure 3.9a-b, d ont été produits avant mon arrivée dans le laboratoire. De mon côté, j'ai observé que la diminution d'activation de la voie MAPK se produisait dans les PDAC de souris entre RAF et MEK, et j'ai initié les expériences à partir de la Figure 3.3 qui font appel à la réactivation de la voie MEK-ERK par une construction active de RAF. J'ai donc réalisé la plupart des répliques de la Figure 3.3a à i, Figure 3.10, des Figure 3.4 à Figure 3.6, Figure 3.11a, Figure 3.12 et Figure 3.13, notamment l'analyse des données de phosphoprotéomique, la recherche d'un phénotype nucléolaire ainsi que la découverte et la caractérisation des foci nucléolaires associés à la sénescence (SANF). Puis, j'ai proposé que le FOLFIRINOX pourrait récapituler les phénotypes que nous observions dans le modèle de sénescence par RAF, grâce à l'activation de ERK et au stress nucléolaire. J'ai donc effectué la plupart des expériences de la Figure 3.7a-b, d, Figure 3.14a-c, e. Finalement, j'ai reproduit les résultats des Figure 3.1a, Figure 3.2d, et fait la culture cellulaire pour Figure 3.7e-f et Figure 3.14e-f. J'ai préparé la vaste majorité des figures, de même que le texte des légendes et la section Matériel et méthodes du manuscrit. Pour voir la contribution des autres co-auteurs, voir la section correspondante à la fin du manuscrit (3.3.7).

### 3.3. Article 2

#### **Targeting ribosome biogenesis reinforces ERK-dependent senescence in pancreatic cancer**

Rowell MC<sup>1</sup>, Deschênes-Simard X<sup>2</sup>, Lopes-Paciencia S<sup>1</sup>, Le Calvé B<sup>3</sup>, Kalegari P<sup>1</sup>, Mignacca L<sup>3</sup>, Fernandez-Ruiz A<sup>1</sup>, Guillon J<sup>1</sup>, Lessard F<sup>3,4</sup>, Bourdeau V<sup>3</sup>, Igelmann S<sup>1,3</sup>, Stanom Y<sup>3</sup>, Kottakis F<sup>5</sup>, Deshpande V<sup>5</sup>, Krizhanovsky V<sup>6</sup>, Bardeesy N<sup>5</sup>, Ferbeyre G<sup>1,3</sup>.

*In review in Communications biology*

<sup>1</sup>Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC H2X 0A9, Canada

<sup>2</sup>Maisonnette-Rosemont Hospital, Université de Montréal, Montréal, QC H1T 2M4, Canada

<sup>3</sup>Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

<sup>4</sup>Present: Laboratory of Growth and Development, St-Patrick Research Group in Basic Oncology, Cancer Division of the Quebec University Research Centre, Québec, Canada

<sup>5</sup>Massachusetts General Hospital Cancer Center, Harvard Medical School, Boston, MA 02114, USA

<sup>6</sup>Department of Molecular Cell Biology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 7610001, Israel

Corresponding author: g.ferbeyre@umontreal.ca

### 3.3.1. Abstract

Pancreatic adenocarcinomas (PDAC) often possess mutations in K-Ras that stimulate the ERK pathway. Aberrantly high ERK activation triggers oncogene-induced senescence, which halts tumor progression. Here we report that low-grade pancreatic intraepithelial neoplasia display very high levels of phospho-ERK consistent with a senescence response. However, advanced lesions that have circumvented the senescence barrier exhibit lower phospho-ERK levels. Restoring ERK hyperactivation in PDAC using activated RAF leads to ERK-dependent growth arrest with senescence biomarkers. ERK-dependent senescence in PDAC was characterized by a nucleolar stress response including a selective depletion of nucleolar phosphoproteins and intranucleolar foci containing RNA polymerase I. Accordingly, combining ribosome biogenesis inhibitors with ERK hyperactivation reinforced the senescence response in PDAC cells. Notably, comparable mechanisms were observed upon treatment with the platinum-based chemotherapy regimen FOLFIRINOX, currently a first-line treatment option for PDAC. We thus suggest that drugs targeting ribosome biogenesis can improve the senescence anticancer response in pancreatic cancer.

### 3.3.2. Introduction

The extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 transmit signals from a variety of cellular receptors activated by growth factors, cytokines, hormones and other extracellular ligands (378). The intensity of ERK activation downstream oncogenic signaling controls the decision between proliferation, senescence and apoptosis (246,379-381). The mechanisms that translate signal intensity into different biological responses are not well understood. During oncogene-induced senescence in normal human fibroblasts, highly aberrant ERK activity was linked to proteasome-dependent degradation of several proteins required for cell cycle progression and ribosome biogenesis (190,246,378). High ERK activity was responsible for cell death after RAF inhibitor withdrawal in melanoma cells (148) or metabolic stress induced by lack of glucose in HEK293 cells (382). Thus, there are several potential mechanisms acting downstream high ERK signaling that can halt tumor progression.

The ERK pathway is often aberrantly activated by oncogenes in human cancers (378). Expression of mutant KRAS in mouse pancreatic epithelial cells induces pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) (29,187) a lesion that contains senescent cells (383). Cell lines established from PanIN also express senescence markers and are not tumorigenic (384). These results are consistent with the idea that PanIN cells undergo oncogene-induced senescence (OIS) *in vivo*, which halts malignant progression (384). However, some PanIN lesions eventually progress to pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC). Here, we report that during pancreatic cancer progression both in human and mice, PanIN lesions have the highest levels of ERK activity and that progression to malignancy correlates with phospho-ERK downregulation. Restoring high ERK signaling in malignant cells forced tumor cells into a senescent cell cycle arrest characterized by phosphoproteome alterations involving nucleolar proteins. In addition, several nucleolar proteins lose their normal localisation and form ERK-dependent intranucleolar foci. This ERK-dependent nucleolar phenotype causes sensitization to agents that affect ribosome biogenesis. Intriguingly, we show that FOLFIRINOX, which is a first-line chemotherapy regimen for pancreatic cancer (385), activates ERK and inhibits ribosome biogenesis. Together, we provide a molecular mechanism effective to halt pancreatic cancer progression.

### 3.3.3. Results

#### 3.3.3.1. Downregulation of ERK signaling correlates with progression of human and mouse pancreatic cancer

KRAS-driven pancreatic cancer pathogenesis consists of sequential premalignant steps leading to invasive pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) (386). Data from mouse models indicate that PDAC emerges from the conversion of differentiated acinar cells to immature duct-like cells (acinar-to-ductal metaplasia (ADM)), followed by progressive pancreatic intraepithelial neoplasia grade 1 to 3 (PanIN-1 to 3). While ERK is activated downstream of oncogenic KRAS, the established role of ERK inhibition in subverting differentiation decisions and escape from senescence (378) led to speculate that there may be additional modulation of this pathway to facilitate PDAC progression. To better define the role of ERK signaling in pancreatic cancer pathogenesis, we assessed ERK activation status by immunohistochemistry in a set of human specimens (from 16 patients) representing each of these different stages of tumor progression. We found that p-ERK levels are modestly increased in ADM and the tissue adjacent to the tumor. This is consistent with a proposed role for ERK activation in the dedifferentiation of acinar cells during ADM (387). Staining was dramatically increased in PanIN-1 and remained almost as high in PanIN-2, whereas p-ERK levels decreased significantly in PanIN-3 and PDAC. Notably, p-ERK levels correlated inversely with proliferation, with the strongly p-ERK-positive PanIN-1 lesions showing minimal proliferation compared to the p-ERK-low PanIN-3/PDAC lesions (Figure 3.1a and Figure 3.8a). Notably, in sections where both PanIN-1 or PanIN2 were close to PanIN-3 lesions, we can see the higher p-ERK levels associated with the most benign lesions (Figure 3.1b). PanIN-1 lesions are common in the general population and have a low risk of progression, whereas PanIN-3 are equivalent to carcinoma-in-situ and are invariably associated with development of invasive PDAC (8,388). Thus, our results link attenuation of the ERK pathway to malignant transformation of human pancreatic cells. Notably, the Pdx1-Cre;LSL-KRas<sup>G12D</sup> p53<sup>Lox/+</sup> mouse model of PDAC progression exhibited an identical profile of p-Erk activation (Figure 3.2a-c and Figure 3.8b).

To study the functional roles of ERK in PDAC pathogenesis, we established pancreatic epithelial cells from Pdx1-Cre;LSL-KRas<sup>G12D</sup> mice harbouring ADM/PanIN-1 lesions or advanced



PDAC (384). Notably, the ADM/PanIN-1 lines showed considerably higher levels of p-Erk (Figure 3.2d) and of transcriptional targets of the ERK pathway as compared to the PDAC-derived tumorigenic cell lines (Figure 3.2e-f and Figure 3.9a-b). We also measured phospho-ERK levels in several human pancreatic cancer cell lines, which in general were lower than in HPNE, a pseudodiploid human cell line obtained from pancreatic ducts and immortalized with hTERT (Figure 3.9c). Of note, the ability of PDAC cells to form colonies in soft agar was inversely correlated with their levels of phospho-ERK (Figure 3.9d) suggesting that ERK-dependent tumor suppression mechanisms operate both in premalignant and malignant cells.

### **3.3.3.2. Restoring high ERK signaling induces senescence in pancreatic cancer cells**

We next sought to investigate whether increasing ERK signaling changed the malignant phenotype of pancreatic cancer cells. Since most pancreatic cancer cell lines already express mutant KRAS, we used a constitutively activated allele of c-RAF fused to the estrogen receptor (RAF-ER). The fusion protein is inactive but can be activated by treatment with 4-hydroxytamoxifen. As a result, the ERK pathway is reactivated as shown in immunoblots for activated MEK and ERK both in human Panc-1 and KP-4 cells and mouse AH375 and NB508 cells (Figure 3.3a and Figure 3.10a). The activation of RAF-ER inhibited cell proliferation both in growth (Figure 3.3b and Figure 3.10b) and colony assays (Figure 3.3c and d and Figure 3.10c and d), induced the senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) (Figure 3.3e and Figure 3.10e), decreased KI67 levels (Figure 3.3f and Figure 3.10f) and increased p21/CDKN1A expression (Figure 3.3g and Figure 3.10g). Immunoblots analysis showed a decrease in phosphorylated RB and phosphorylation of H3 at serine 10 and an increase in the CDK inhibitor p21 (Figure 3.3h and Figure 3.10h). All these changes were prevented by treatment with the ERK inhibitor SCH772984 (Figure 3.3b-h and Figure 3.10b-h) indicating that the ERK kinases are the major targets of RAF-ER for the induction of a senescent-like cell cycle arrest.

To investigate whether ERK activation can also halt tumor progression *in vivo*, we injected mice with Panc-1 or AH375 cells expressing RAF-ER in nude mice and when tumors reached 50 mm<sup>3</sup> we induced ERK activation with tamoxifen. This treatment significantly slowed tumor growth (Figure 3.3i and Figure 3.11a) and increased the levels of phospho-ERK while decreasing the levels

of KI-67 (Figure 3.3j-1 and Figure 3.11b-d). In these immunocompromised mice, senescent cells were not eliminated and therefore tumors did not regress.

### **3.3.3.3. ERK dependent tumor suppression is associated to changes in the nucleolar phosphoproteome and nucleolar stress**

Since ERK kinases activation is responsible for the senescent cell cycle arrest triggered by RAF-ER in pancreatic cancer cells, we next sought to find ERK targets responsible for this phenotype. We thus performed label free phosphoproteomics to identify the changes within the phosphoproteome after induction of RAF-ER in Panc-1 cells. As expected, we observed a prominent increase in the phosphorylation of RAF1 consistent with its activated status (Figure 3.4a). We also detected a striking increase in the phosphorylation of ZNF185, which is a p53 target gene that plays a role in the DNA damage response and the cytoskeleton (389). The most downregulated phosphoproteins included several nuclear proteins, splicing factors and a network of nucleolar proteins such as the tumor antigen KI67, the ribosome biogenesis factors NPM1, TCOF1/Treacle, DDX21 and RSL1D1 (Figure 3.4a-e). Of note, downregulation of nucleolar phosphoproteins including RSL1D1 and DDX21 is a hallmark of oncogene-induced senescence (OIS) in normal human fibroblasts (190). The role of all the individual phosphorylation sites downregulated in RAF-ER induced cells is not yet known. It is likely that protein phosphorylation is linked to the activation of some of these proteins. For example, the nucleolar transcription factor UBF (390,391) and the nucleolar oncoprotein nucleophosmin/B23 (392) are positively regulated by phosphorylation. Also, the ARF tumor suppressor inhibits ribosome biogenesis in part by decreasing UBF phosphorylation (298). We thus reasoned that a decrease in phosphorylation of nucleolar proteins induced by RAF-ER could inhibit their functions and trigger a nucleolar stress response. We previously reported that depletion of RSL1D1 was sufficient to induce senescence (190,246) suggesting that decreasing the functions of nucleolar proteins is sufficient to trigger the process. To further strengthen the relationship between nucleolar proteins and senescence, we knocked-down TCOF1, another phosphoprotein whose levels were decreased by RAF in Panc-1 cells (Figure 3.4a). Disabling TCOF1 with two independent shRNAs decreased cell proliferation and triggered senescence in both Panc-1 and KP-4 cells (Figure 3.12a-f).

Agents that inhibit rRNA synthesis or induce rDNA damage induce a reorganization of the nucleolus leading to the formation of foci known as nucleolar caps (393). Nucleolar caps contain RNA polymerase I subunits and rRNA processing factors and they may function as sites for repair of damaged rDNA (394). To investigate the extent of nucleolar stress after induction of senescence in pancreatic cancer cells we looked for nucleolar caps using an antibody against the RNA polymerase I subunit RPA194. As a positive control we used cells where rRNA synthesis was inhibited using actinomycin D, a treatment that induces nucleolar caps (289). Actinomycin D inhibited rRNA synthesis (as assessed using by 5-Ethynyl Uridine (EU) incorporation) and induced characteristic nucleolar caps (visualized by staining with the anti-RPA194 antibody). However, induction of senescence by RAF-ER in Panc-1 cells did not inhibit rRNA synthesis at the time cells were fixed for staining and did not induce nucleolar caps. Nevertheless, clear foci containing RPA194 were visible in a substantial fraction of these senescent cells (Figure 3.5a). Unlike nucleolar caps that localize to the periphery of nucleoli, these RPA194 foci localized inside the nucleolus. This was revealed by co-staining the cells with an antibody against the rRNA processing factor RSL1D1, that localizes to the nucleolar periphery (Figure 3.5b). These foci were also visualized in KP-4 pancreatic cancer cells expressing RAF-ER and treated with 4-hydroxytamoxifen (Figure 3.13a) and in primary pancreatic epithelial cells (Figure 3.5c and Figure 3.13b-c) or normal human fibroblasts after induction of senescence with oncogenic Ras (Figure 3.13d). We thus designate them senescence-associated nucleolar foci (SANF). SANF also contained the RNA polymerase I core factor TIF-IA/RRN3 and the RNA polymerase I subunit RPA12 (Figure 3.13e and f).

The nucleolus is a membraneless organelle formed by co-existing but immiscible liquid sub-compartments that arise by the process of liquid-liquid phase separation (LLPS) (260). Nucleolar caps are likely formed via the same mechanism and RNA polymerase I that localizes there may remain in solution but in a different phase (395). However, treatment of senescent cells with 1,6-hexanediol, an aliphatic alcohol that disrupts the weak hydrophobic interactions that mediate LLPS (396), did not dissolve SANF (Figure 3.5d). As a control, 1,6-hexanediol was able to dissolve P-bodies, another membraneless organelle formed by LLPS that can be visualized using antibodies against AGO2 or DCP1A (Figure 3.5d). This result suggests that SANF are solid aggregates.

Since SANF were not present in every cell after induction of senescence, we next correlated their presence with the levels of SA- $\beta$ -Gal revealed with the fluorescent biomarker SPiDER- $\beta$ Gal. We found that SANF were present in cells with higher SPiDER- $\beta$ Gal fluorescence, suggesting that they may correlate with the full establishment of the senescence program (Figure 3.5e-f). Consistent with this idea, elimination of senescent cells from the population using the senolytic agent ABT-263 (a BCL2 family inhibitor) eliminated all SANF containing cells (Figure 3.5g-h). Taken together, these results indicate that a nucleolar stress response is an important component of the senescence program, thereby suggesting that agents targeting the nucleolus can promote senescence in cancer cells.

#### **3.3.3.4. Drugs targeting rRNA biogenesis improve the senescence response in pancreatic cancer cells.**

Ribosome biogenesis is a promising target for new anticancer therapies because the process is highly upregulated in tumor cells (397,398). A number of ribosome biogenesis inhibitors have been developed, including the RNA polymerase I inhibitor CX-5461, currently in clinical trials (399) and BMH-21 (400). Oxaliplatin, together with irinotecan, 5-fluorouracil and folinic acid form the drug combination known as FOLFIRINOX, a mainstay systemic therapy against pancreatic cancer (401,402). Oxaliplatin was initially thought to target tumor cells by causing DNA damage but more recently it was found that this drug acts by inhibiting ribosome biogenesis (315,317). We thus investigated whether oxaliplatin or BMH-21 could improve the senescence response to hyperactive ERK signaling in Panc-1 cells expressing RAF-ER. Both agents improved growth arrest (reduced RB and H3 phosphorylation) and induced cell death (increased cleaved caspase 3) after induction of ERK-dependent senescence in these cells (Figure 3.6a-d). These results demonstrate that nucleolar stress triggered by hyperactive ERK signaling and RNA polymerase I inhibitors cooperate to inhibit tumor cell proliferation.

We previously showed that induction of senescence in normal human fibroblasts reduced the expression of ribosome biogenesis factors such as RSL1D1 (190,246). However, hyperactive ERK signaling did not trigger this response in pancreatic cancer cells (Figure 3.6a and c). Of note, both oxaliplatin and BMH-21 reduced RSL1D1 levels suggesting that these agents restored pro-senescent signals lost during pancreatic cancer progression. We also looked at SANF after

combining hyperactive ERK signaling with oxaliplatin or BMH-21. We noticed that combining these treatments increased the size of the nucleolus as we previously reported during OIS in normal fibroblasts. SANF were also bigger and, in some cells, they localized to the periphery of the nucleolus (Figure 3.6e). We conclude that senescence induced by hyperactive ERK signaling can be reinforced by using ribosome biogenesis inhibitors.

### **3.3.3.5. FOLFIRINOX mimics Ras-induced senescence signaling in pancreatic cancer cells**

Pancreatic cancers are unusually resistant to DNA damaging chemotherapy and one of the best treatments found so far consists of a chemotherapy regime called FOLFIRINOX. It combines the RNA polymerase I inhibitor, oxaliplatin (315,316), irinotecan that targets topoisomerase I and also reduces pol I activity (403,404) and 5-FU that inhibits DNA synthesis and rRNA processing (405). As expected, treatment of pancreatic cancer cell lines Panc-1 and KP-4 with FOLFIRINOX induced a growth arrest and senescence (Figure 3.7a-b and Figure 3.14a-b). Intriguingly, the biochemical pattern of senescent biomarkers induced by FOLFIRINOX is reminiscent of OIS (190,246) as it includes an increase in phospho-ERK and p21, as well as a decrease in STAT3, ribosome biogenesis factors (RSL1D1, EBP2, DDX21) and phospho-H3. FOLFIRINOX also induced apoptosis in this setting as shown by the presence of cleaved caspase 3 (Figure 3.7c and Figure 3.14c). Nucleolar stress leads to accumulation of amyloid deposits labelled by Congo Red (406), which we confirmed in FOLFIRINOX-treated cells both in KP-4 and Panc-1 cells (Figure 3.7d-e and Figure 3.14d-e). The impact of this stress in ribosome biogenesis was reflected as a decrease in the levels of mature 5.8S and 28S rRNAs (Figure 3.7f and Figure 3.14f) Taken together, the data indicate that FOLFIRINOX restores the classic OIS pathway in pancreatic cancer cells involving both aberrant ERK signaling and nucleolar stress (Figure 3.7g).

### **3.3.4. Discussion**

Here we show that the strength of activation of the ERK pathway in pancreatic cancer is associated with cell fate. While moderate levels of ERK activation correlate with proliferative malignant lesions, strong levels of activation are present in benign premalignant lesions, and this both in samples from patients with pancreatic adenocarcinoma and in a mouse model of the disease. When

moderate ERK activation is further reinforced in PDAC cells, they arrest proliferation and display markers of cellular senescence, a phenotype reversed by ERK inhibition. These results extend to the context of PDAC progression previous work from us and others reporting that the output of the ERK pathway includes cell proliferation, senescence or apoptosis depending on the strength and context of its activation (145,246,378,382,384,407-409).

Given this complex relationship between ERK activation and cell fate we sought to investigate the specific mechanism acting downstream of ERK to halt tumor progression, thereby potentially identifying new targets for anticancer treatments. We found that ERK hyperactivation altered the nucleolar phosphoproteome, which led us to investigate the role of nucleolar stress in ERK-dependent senescence. The data show that ERK hyperactivation induced foci containing RNA polymerase I in a significant fraction of the cells, correlating with high levels of the senescence marker SA- $\beta$ -Gal. Unlike previously described nucleolar caps, these foci -which we designated SANF-, localized inside the nucleolus and were not dissolved by the aliphatic alcohol 1,6-hexanediol, suggesting that they represent solid aggregates that have lost the liquid properties of the normal nucleolus (260). Although the composition and dynamics of these foci require further studies, our findings point to the nucleolus and rRNA biogenesis as key targets for efficient tumor suppression and senescence mediated by ERK hyperactivation in the absence of classic senescence regulators such as p53 and p16INK4a.

The potential for targeting nucleolar pathways to reinforce the senescent response in pancreatic cancer cells was demonstrated here by combining hyperactive ERK signaling and the ribosome biogenesis inhibitors BMH-21 or oxaliplatin. Importantly, FOLFIRINOX combines ERK activation with ribosome biogenesis inhibition to induce both cell death and senescence in pancreatic cancer cells. Most patients with pancreatic cancer eventually relapse after treatment with FOLFIRINOX. Our work suggests that this relapse restores ribosome biogenesis but retargeting the process may improve progression-free survival and prognosis of pancreatic cancer patients. Future clinical trials could be designed with these molecules in order to answer this question.

### **3.3.5. Materials and methods**

*Drugs, reagents and plasmids*

4-hydroxytamoxifen (4OHT, Sigma) was dissolved in ethanol and added to cells at 0.1  $\mu$ M every 48h. The ERK inhibitor SCH772984 (Selleckchem) was dissolved in DMSO and added to cells at 0.1  $\mu$ M every 24h. Tamoxifen for mice experiments was dissolved in ethanol at 100mg/mL by incubating at 55°C for 5-10 min. Then it was diluted to 10mg/mL with sunflower oil, vortexed and let to stand for 15 min, aliquoted and stored at 4°C in the dark. Actinomycin D (Sigma) was dissolved in DMSO and added to cells for 18h at 50ng/mL to favor specific inhibition of RNA polymerase I. Oxaliplatin (S1224, Selleckchem) was dissolved in dH<sub>2</sub>O, BMH-21 (S7718, Selleckchem) was dissolved in DMSO, 5-Fluorouracil (S1209, Selleckchem) was dissolved in DMSO, SN38 (S4908, Selleckchem) was dissolved in DMSO, and those drugs were added to cells at indicated concentrations. FOLFIRINOX combination is achieved by treating Panc-1 cells with 5  $\mu$ M 5-FU, 10nM SN38 and 1  $\mu$ M Oxaliplatin, and by treating KP-4 cells with 3.5  $\mu$ M 5-FU, 10nM SN38 and 6  $\mu$ M Oxaliplatin. Treatments with BMH-21, Oxaliplatin or FOLFIRINOX was renewed every 3 days. ABT263 (ApexBio) was dissolved in DMSO and cells were treated once at 5  $\mu$ M.

Congo Red (Sigma, C6277) was dissolved in dH<sub>2</sub>O. 1,6-hexanediol (240117, Sigma) was dissolved in dH<sub>2</sub>O. Cells were treated with 1% 1,6-HD for 1h before immunofluorescence procedure. X-Gal was purchased from Wisent (800-145-UG) and dissolved in DMF. SPiDER- $\beta$ Gal assay was purchased from Dojindo (SG04), EU Click-it 488 RNA synthesis detection kit was purchased from ThermoFisher Scientific (C10329), MTT reagent from Sigma (Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide, M5655), and crystal violet from Sigma (C6158).

Plasmids pWZL-hygro and pWZL-H-RAS<sup>V12</sup>-hygro used in HPNE cells and pBabe-puro and pBabe-H-RAS<sup>V12</sup>-puro used in IMR90 cells were obtained from Dr. Scott W. Lowe (Sloan Kettering). pBabe- $\Delta$ RAF1-hER-puro and pBabe-ER-puro control vector were obtained from Dr. Martin McMahon (Huntsman Cancer Institute, University of Utah). The CDS from pBabe- $\Delta$ RAF1-hER starts with amino acids MEY before S306 of full-length RAF1 and aa Y340 and Y341 are changed for DD. pAMPHO plasmid was obtained from Dr. Garry Nolan, Stanford. Short hairpin RNAs (shRNAs) were obtained from Sigma, (pLKO.1-shTCOF1-2-puro: TRCN0000008631; pLKO.1-shTCOF1-4-puro: TRCN0000008633) and non-targeting control shRNA (pLKO.1-shNTC-puro: SHC002). Sequences of shRNAs are given in Supplemental Table 1 (p.Erreur !

Signet non défini.). pCMV-VSV-G (Addgene #8454) and pCMV-dR.91 (Delta8.9, Addgene #8455) were from R. Weinberg's laboratory (Whitehead Institute, Cambridge, MA).

#### *Cell culture and viral-mediated gene transfer*

All cell lines were cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Cell lines 1497, 1498, 1499, NB508 and AH375 isolation and culture method were described in (384). Human pancreatic normal epithelial (HPNE hTERT) cells were obtained from Dr. M. Ouellette (University of Nebraska Medical Center). IMR90 were obtained from Coriell Institute (I90-79). Pancreatic cancer cell lines were obtained from ATCC or from Massachusetts General Hospital Center for Molecular Therapeutics (CMT). The following cell lines were cultured in DMEM (319-015-CL, Wisent) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Wisent) and 10% FBS (Wisent or Gibco): NB508, Panc-1, KP-4, HPAC, HPAF-II, Panc8.13, SW1990, IMR90, Phoenix ampho and HEK293T. The cell line HPNE hTERT was cultured in media made of 75% DMEM (219-060-XK) and 25% M3 Base (M300F-500, Incell), supplemented with 1g/L D-glucose (Sigma), 1.5g/L sodium bicarbonate (Bioshop), 5% FBS (Wisent), 2mM L-glutamine (Wisent), 10ng/mL of human epidermal growth factor (hEGF, Gibco) and phenol red (Sigma). All cells were passaged using Trypsin (Wisent) except for 1497, 1498, 1499, AH375 and HPNE hTERT cells that were passaged using TrypLE (Gibco).

Retroviral and lentiviral-mediated gene transfers were done as previously described (246) with only modification for lentivirus being the use of 3µg of an expression vector, with 2µg of pCMV-dR.91 vector and 1µg of pCMV-VSV-G vector for the transfection of HEK293T cells.

#### *Proliferation assays (Crystal violet, MTT and colony assay)*

For growth curves and growth assays, 1x10<sup>4</sup> Panc-1 cells or 6x10<sup>3</sup> KP-4 cells were seeded in four 12-wells plates in triplicates. A plate was fixed the following day for day 0, then one at three other time points. Each time, cells were washed with PBS1X and then incubated for 15 min at room temperature with fresh solution of 1% glutaraldehyde in PBS1X. Cells were washed again and stained with 0.1% Crystal violet in PBS1X for 30 min, then rinsed thoroughly in water and let to dry. Crystal violet was retrieved by dissolving it in 10% acetic acid in water during 1h under



mild agitation, then OD was measured at 590nm. Plotted data represent relative change of OD over day 0 value.

For colony assays,  $2 \times 10^3$  Panc-1 cells or  $1 \times 10^3$  KP-4, NB508 or AH375 were seeded in 6-wells plates in triplicates. Crystal violet staining was performed when colonies were observed in vehicle-treated cells, 10 days post-seeding.

For MTT assays, cells were seeded in 96-wells plates in triplicates. At indicated time points, media was replaced by DMEM without phenol red containing 0.5mg/mL MTT reagent for 3h at 37°C. Plates were then spun down at 1000 rpm for 10 min, and media was replaced by 100 $\mu$ L DMSO. Plates were left to rotate at room temperature for 15 min, then OD was measured at 570nm.

#### *Senescence-associated $\beta$ -galactosidase assay*

Cells were seeded in 6-wells plates then, at indicated time points, cells were washed with PBS1X and fixed for 15 min at room temperature with fresh solution of 0.5% glutaraldehyde in PBS1X. Cells were then washed twice with PBS1X + MgCl<sub>2</sub> solution (1mM MgCl<sub>2</sub>, PBS1X, pH 5.5) for 4 min, then incubated in hot (37°C) and 0.45 $\mu$ m-filtered X-Gal staining solution (0.164% w/v Potassium hexacyanoferrate (III), 0.21% w/v Potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate, 1mg/mL X-Gal in PBS1X + MgCl<sub>2</sub> solution) overnight at 4°C, followed by another 6h incubation at 37°C in renewed X-Gal staining solution. Cells were then washed three times with 100mM Tris pH 8.0 and kept in that solution to stop the enzymatic reaction. Then pictures were taken under the 20X objective of the EVOS XL Core imaging system (ThermoFisher Scientific). Mean percentage of positive cells was assessed by manual counting of at least 3 fields containing  $\geq 100$  cells.

#### *Sphere-forming assay*

The procedure was performed as described in (384) with only modification being the use of DMEM F12 media from Wisent (319-085-C1).

#### *Western blots*

Adherent cells were washed twice with PBS1X and scraped in Laemmli 2X buffer (4% SDS, 20% glycerol, 120mM Tris-HCl pH 6.8). For immunoblots in Fig. 6-7 and S7, floating cells

were also collected by centrifugation to assess Caspase 3 status in all cells. Protein extracts were then boiled at 95°C for 5 min and let to cool down to room temperature. Concentration was then assessed using the Nanodrop, and concentrations were equalized between samples by completing with Laemmli 2X, and then adding 10%  $\beta$ -mercaptoethanol and 0.05% of bromophenol blue. Samples were then boiled again for 5 min and 25 $\mu$ g of proteins were loaded on SDS-PAGE. After migration, proteins were transferred to 0.45 $\mu$ m nitrocellulose membranes and blocked for 1h in PBS-T (PBS1X, 0.05% Tween20) containing 5% milk. Membranes were then washed three times 10 min with PBS-T, then primary antibodies were added in PBS1X, 0.1% BSA, 0.02% Sodium azide and incubated on membranes. All antibodies were incubated overnight at 4°C except  $\beta$ -Actin (30 min at room temperature) and STAT3 (20 min at room temperature). Then membranes were washed three times 10 min with PBS-T, then appropriate HRP-conjugated secondary antibodies in PBS1X 1% milk were incubated for 1h at room temperature (or 30 min following  $\beta$ -actin immunoblot, or 20 min following STAT3 immunoblot). After that, membranes were washed again three times 10 min and were incubated with ECL Western blotting reagent (RPN2106, Amersham). Chemiluminescent signal was revealed by exposition on Super-RX X-ray films (Fujifilm). Membranes were stripped between incubation with different antibodies using Stripping buffer (25mM glycine, 1% SDS in dH<sub>2</sub>O, pH 2.0).

#### *EU incorporation*

EU incorporation was performed with the Click-it RNA AlexaFluor 488 imaging kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded on coverslips in order to be at a ~60% confluency at the day of the experiment and treated as indicated. 1mM EU (or equivalent volume of vehicle) was added to the cells (without media change), which were left for one hour at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Then, media was removed and cells were fixed for 15 min at room temperature with 4% PFA in PBS1X. Cells were washed once with PBS1X and then permeabilized in 0.5% Triton X-100 in PBS1X for 15 min at room temperature. Click-it reaction cocktail was prepared fresh and according to manufacturer's instructions. Permeabilization buffer was removed, then cells were washed once with PBS1X, then incubated with the reaction cocktail for 30 min at room temperature in the dark. Then, the cocktail was removed and cells were rinsed once with the rinse buffer (component F of the kit). Then the immunofluorescence protocol was

followed from the blocking step, but in the dark. AlexaFluor 568 secondary antibodies were used to detect primary antibodies and not interfere with EU-Click-it-488 signal.

### *Congo Red staining*

Cells were seeded on coverslips and treated as indicated. Cells were then washed twice with PBS1X then fixed with 4% PFA in PBS1X for 10 min at 4°C. Cells were washed three times and then kept at 4°C in PBS1X + 0.01% Sodium azide or used right away for staining. Cells were washed three times for 10 min in PBS1X then permeabilized with Triton X-100 0.3% in PBS1X for 5 min. Cells were rinsed with dH<sub>2</sub>O then stained for 15 min in 0.05% w/v Congo Red in dH<sub>2</sub>O in the dark. Then cells were washed again four times 3 min with dH<sub>2</sub>O and mounted on slides using Vectashield with DAPI mounting media (H-1200, Vectorlabs) and sealed with nail polish. Congo Red staining was revealed using the 63X objective and the TexasRed channel on the Zeiss Axio Imager Z2 microscope.

### *Immunofluorescence*

Cells were seeded on coverslips in 6-well plates. At indicated time points, cells were washed twice with PBS1X then fixed for 10 min at 4°C with 4% PFA in PBS1X. Cells were washed three times with PBS and then kept at 4°C in PBS1X + 0.01% Sodium azide or used right away (no sodium azide) for staining. If sodium azide was used to preserve cells, then three other 10 min washes were performed with PBS1X, then cells were incubated for 10 min in permeabilization buffer (0.2% Triton-X-100, 2% BSA, PBS1X). Then cells were blocked for three times 10 min with 2% BSA in PBS1X. Coverslips were incubated on slides overnight at 4°C with primary antibodies in humidity chamber. The following day, coverslips were retrieved and washed 3 times 10 min with PBS+BSA then stained on slides in a humidity chamber with secondary antibodies for 1h at room temperature in the dark. Coverslips were retrieved then washed 4 times 10 min with PBS1X and mounted on slides with Vectashield containing DAPI and sealed using nail polish. Pictures were taken with Zeiss Axio Imager Z2 microscope.

For SANF quantification, cells containing at least 1 and up to ~5 big bright foci of RPA194 per nucleolus were considered positive, whereas cells harbouring diffuse nucleolar staining were considered negative.

### *Senescence-associated SPiDER-βGal assay*

SPiDER-βGal assay was performed according to manufacturer's instructions (Dojindo, SG04). Briefly, cells were seeded on coverslips. Then, at indicated time points, media was removed and cells were washed with PBS1X then fixed for 3 min at room temperature with 4% PFA in PBS1X. Cells were washed again three times with PBS1X then incubated for 30 min at 37°C without CO<sub>2</sub> with SPiDER-βGal solution or diluted McIlvaine buffer. To prepare SPiDER-βGal solution, SPiDER-βGal reagent was reconstituted in 7μL DMSO then diluted 1:1000 in McIlvaine buffer (pH 6.0) 0.2X. After incubation, cells were kept in the dark for the following steps. Solutions were prepared fresh and used right away. Staining solution was removed, then cells were washed twice with PBS1X. Then cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS1X for 30 min at room temperature. Cells were washed again twice with PBS1X then blocked with 1% BSA in PBS1X for 1h at room temperature. Then immunofluorescence procedure was followed. SPiDER-βGal staining was revealed under the 20X objective and using the AlexaFluor 500 channel on the Zeiss Axio Imager Z2 microscope.

### *Mouse xenograft experiments*

Mouse experiments were performed in accordance with the CDEA (Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux) of the University of Montreal.  $1 \times 10^6$  Panc-1 RAF-ER cells or AH375 RAF-ER cells were subcutaneously injected in a 1:1 PBS1X+cells:Matrigel (Corning, 354234) mix in both flanks of Hsd:Athymic Nude-*Foxn1*<sup>tm</sup> mice (Envigo). Successful engraftment was obtained for 9 mice out of 10. When mean tumor volume reached  $\geq 50 \text{ mm}^3$ , approximately one month post-Panc-1 injection and one week post-AH375 injection, mice were separated in two groups, 4 mice in control group and 5 in Tamoxifen group. Mice were treated every 48h by intraperitoneal injection of 100 μL containing 1mg Tamoxifen in 9:1 sunflower oil:ethanol mix, or Tamoxifen-free mix as a control. Tumors were measured every two days and mice were weighted twice per week to ensure they were not experiencing weight loss. Tumor volume was calculated using the formula: (Length x width x height)/2. Mice were sacrificed and tumors were harvested when any endpoint was reached.

### *RT-qPCR*

RT-qPCR were performed as published in (410). The complete list of primers used for qPCR and their sequence is available in Supplementary Table 1.

#### *Microarray and GSEA analyses*

Microarray data were published and described in (384). New analyses were performed using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software (version 4.0.3) (375), using the same criteria as previously described, to assess enrichment for signatures of MAPK pathway status of activation as indicated in Fig. 2 and S2.

#### *Statistical analyses*

To determine statistical significance, Student t-test were performed using the GraphPad Prism Software version 8 or 9, or ANOVA with Tukey HSD tests were performed using the online platform [astatsa.com](http://astatsa.com). Differences between conditions were considered statistically significant at (\*)  $P < 0.05$ , (\*\*)  $P < 0.01$ , (\*\*\*)  $P < 0.001$ , (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$ . Analyses performed on the phosphoproteomics data are described in the corresponding section. Error bars represent standard deviation (SD) in all graphs except in Fig. 3I-L and Fig. S4 for *in vivo* xenograft data where standard error of the mean (SEM) was determined. For qPCR data, immunoblots, growth assays, beta-gal staining, immunofluorescences and immunohistochemistry staining, one representative biological replicate is shown. The “n” value in the figure legends represent the number of biological replicates for which, in the case of qPCR, SA- $\beta$ -gal and growth assays, three technical replicates were done for each “n”.

### **3.3.6. Competing interest statement**

The authors declare no competing interest.

### **3.3.7. Acknowledgments**

For phosphoproteomics analyses, we thank Dr. Bonneil and the Center for Advanced Proteomics Analyses. We thank Drs Roy, Desgroseillers, Lowe, McMahon, Nolan, Oeffinger, Ouellette and Weinberg for access to equipment, reagents and/or advice. Thanks to M. Vasseur and Dr. Stifani for help at the Microscopy Platform of University of Montreal’s Biochemistry

Department. This work was supported by Canada Graduate Scholarships Michael Smith Foreign Study Supplements to M.C. Rowell and X. Deschênes-Simard and by FRQS (Fonds de recherche Québec - Santé) fellowships to M.C. Rowell, S. Lopes-Paciencia and P. Kalegari. We thank the Montreal Cancer Institute's Canderel funds and the Pierre-Saul Funds for pancreatic cancer research for financial support. V. Krizhanovsky is supported by the Israel Science Foundation-Canada program (2633/17) and the European Research Council (856487). Nabeel Bardeesy was supported by NIH/NCI P01CA117969. G. Ferbeyre is supported by the Joint Canada-Israel Research Program of IDRC, CIHR PJT-153217 and the CIBC chair for breast cancer research.

*Author contributions:* M.C.R performed most replicates of experiments for Fig. 3a-i, 4-6, 7a-c, S2c, S3, S4a, S5-6, S7a-c, e, reproduced data from Fig. 1a and 2d and did tissue culture and Congo Red stainings for Fig. 7d-e and S7d-e. M.C.R analysed phosphoproteomics data for Fig.4. X.D.S performed experiments for Fig.1-2, S1, S2a-b, and quantified data for Fig7b and S7b. S.L.P performed experiments for Fig. 5d, quantified Fig.5f, optimized conditions for Fig. S5, did tissue culture for Fig. S6d and performed qPCR experiments for Fig. 7f and S7f. S.L.P also gave conceptual and technical input, and performed many exploratory experiments in the course of project development. B.L.C co-performed experiments for Fig.3a-e, i Fig. 4a, Fig. S3 a-e, S4a, performed IHC and quantification for Fig. 3j-l and S4b-d, and performed tumor sphere assay for Fig S2. P.K. reproduced data from Fig. 3f-g, and optimized drug dosage for Fig.6-7 and S7. L.M. and A.F.R. reproduced experiments for Fig. S5. J.G. reproduced experiments in Fig. 7a-c, and f and Fig. S7a-c and f. F.L. gave conceptual and technical input during all the project. V.B. designed the qPCR primers for rRNA qPCR, reproduced qPCR experiments for Fig.7f and S7f, and helped in the design of experiments. S.I. did the image acquisition and quantification for Fig. 7d-e and S7d-e. Y.S. reproduced data from Fig.S5a-c. F.K. helped in IHC scoring for Fig.1-2, and S1. V.D. reviewed histology for Fig. 1-2 and Fig.S1. V.K. supervised the project and provided conceptual input regarding the use of senolytics and the analysis of senescence in PanIN and PDAC samples. N.B. provided patient samples and mouse samples of different stages of progression of PDAC for Fig.1-2 and S2, pancreatic cancer cell lines, and conceptual input regarding pancreatic cancer biology. G.F. supervised the project, provided conceptual input and wrote the manuscript, except for Figures legends and Material and methods that were written by M.C.R. Figures were prepared

by M.C.R. with help from X.D.S., S.L.P, B.L.C. and S.I. All authors participated in reviewing manuscript.

### 3.3.8. Main figures and legends

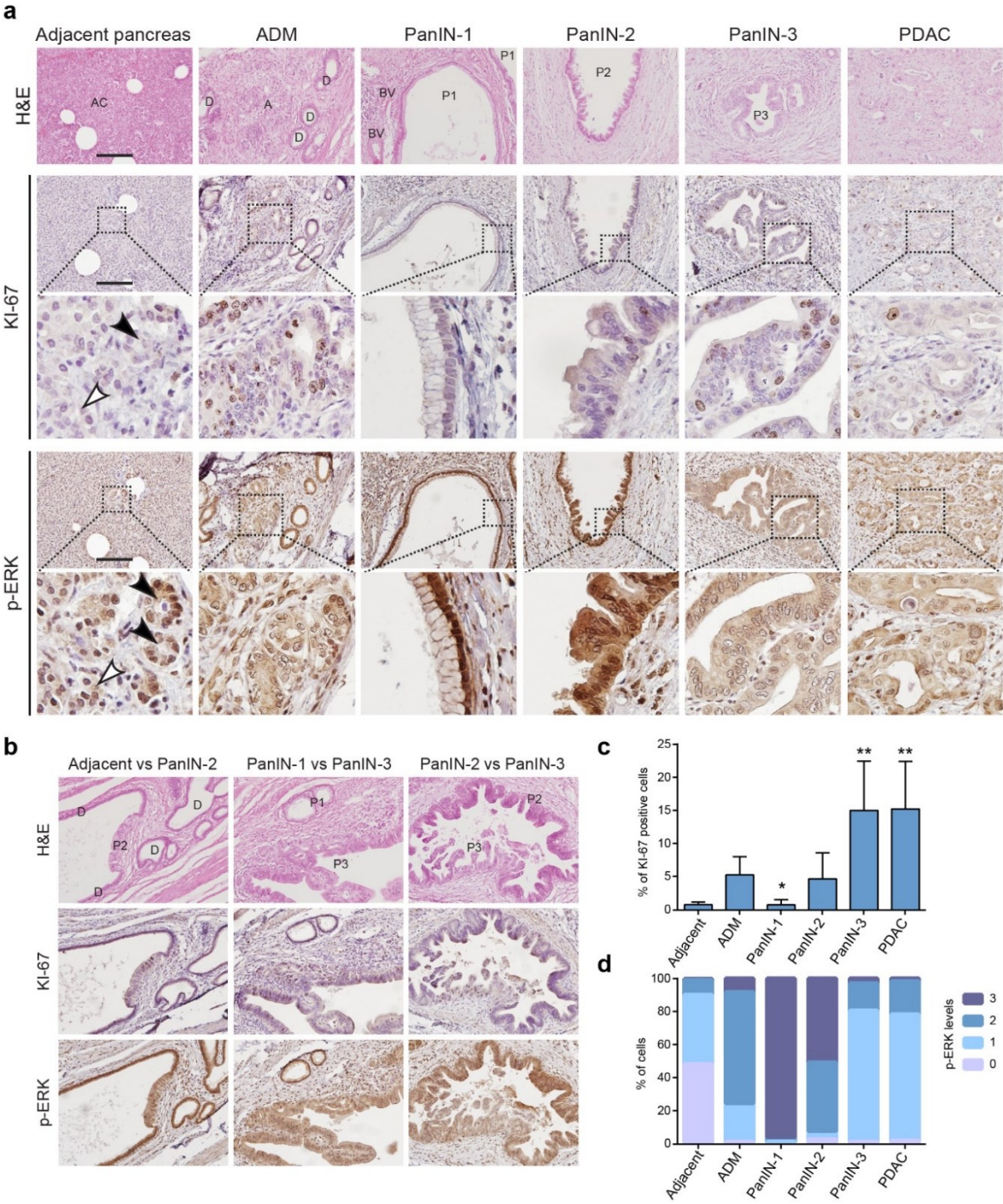
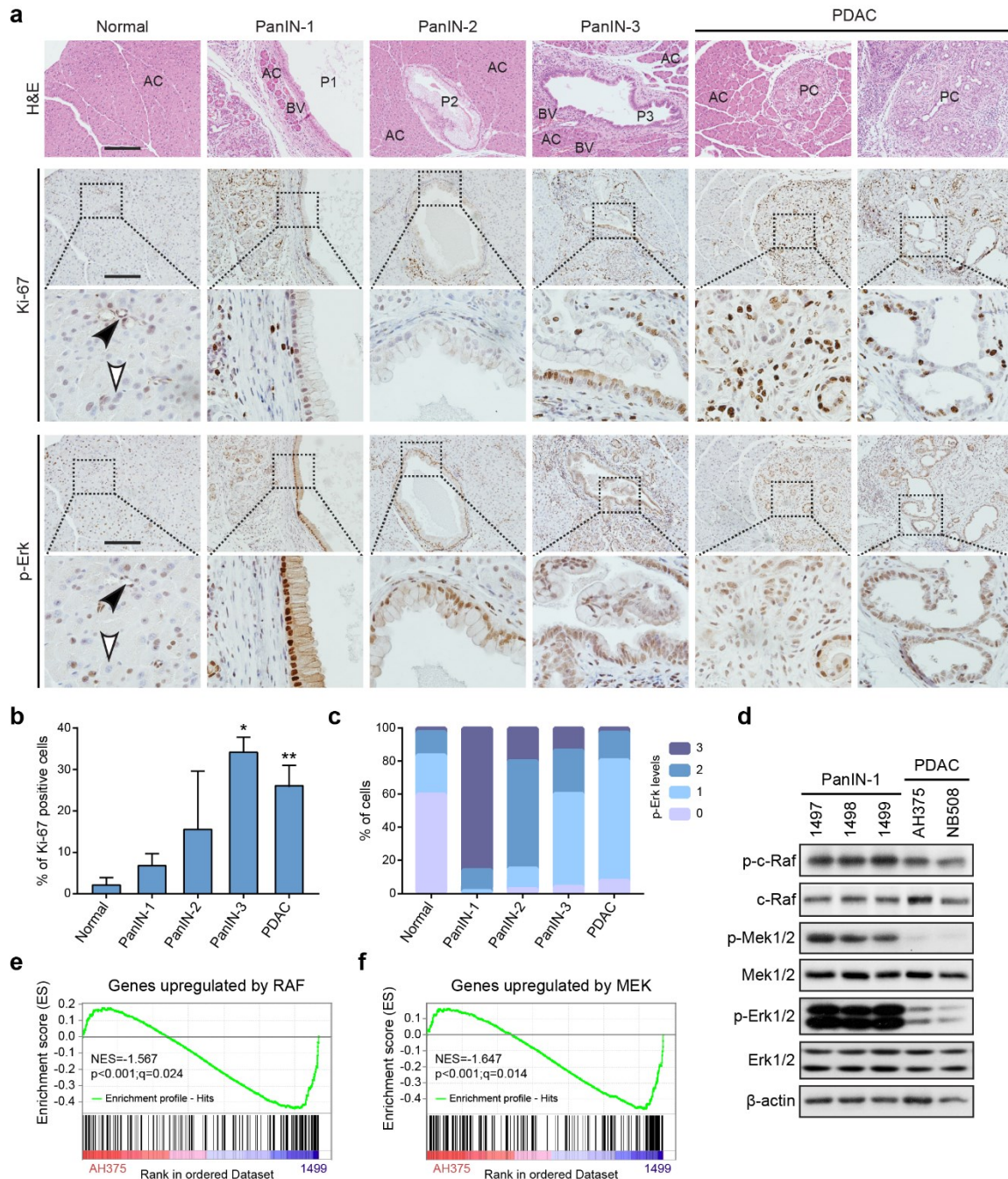


Figure 3.1. Decreased p-ERK levels correlate with progression of human pancreatic cancer.



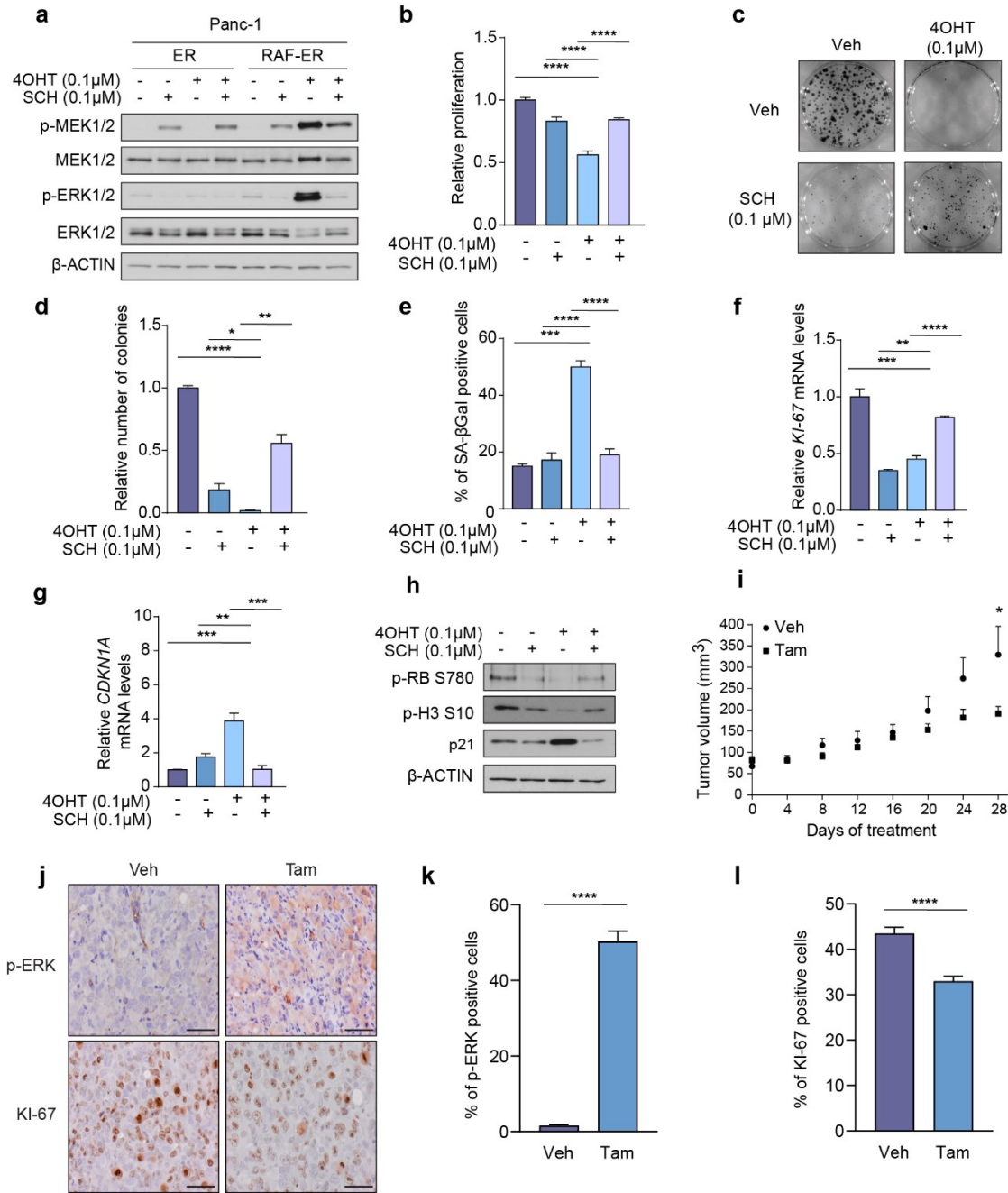
**a** Immunohistochemistry of p-ERK and KI-67 of human adjacent pancreas and different grades of pancreatic neoplasms. Insets: ADM, acinar-to-ductal metaplasia; PanIN-1 to 3 (P1-3), pancreatic intraepithelial lesions (grades 1 to 3); PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; H&E, hematoxylin and eosin; BV, blood vessel; AC, acinar cells; D, normal duct; A, ADM. Black arrows, adjacent ducts; white arrows, acinar cells; scale bars = 100 $\mu$ m. **b** Staining as in (a), but fields showing two different types of pancreatic lesions. **c** Quantification of KI-67-positive epithelial cells in (a). Data are presented as the average percentage of positive cells  $\pm$  SD, n = 16 patients; (\*) P < 0.05 compared to ADM, two-sample t-test; (\*\*) P < 0.01 compared to PanIN-1, two-sample t-test. **d** Quantification of p-ERK staining of epithelial cells in (a) according to four intensities of staining (none, 0; low, 1; moderate, 2; high, 3). The average percentage of cells for each staining intensity is shown. Patients as in c; PanIN-1 vs ADM P < 0.001, PanIN-3 vs PanIN-2 P < 0.05, PanIN-3 vs PanIN-1 P < 0.001, PDAC vs PanIN-1 P < 0.001, two-sample t-test. See also Figure 3.8.



**Figure 3.2. Decreased p-ERK levels correlate with tumor initiation in a KRas-driven mouse model of pancreatic cancer.**

**a** Immunohistochemistry of p-Erk and Ki-67 of pancreatic tissues from *Pdx1-Cre;LSL-KRas<sup>G12D</sup>* mice. Normal pancreatic tissues, pancreatic intraepithelial lesions (PanIN; grades 1 to 3) and PDAC are shown. Insets: higher magnification of representative regions. PC, pancreatic cancer; black arrows, normal ducts; white arrows, acinar cells; scale bars = 100 $\mu$ m. **b** Quantification of Ki-67-positive epithelial cells in (**a**). Data are presented as the average percentage of positive cells  $\pm$  SD,  $n = 14$  mice; (\*)  $P < 0.05$ , (\*\*)  $P < 0.01$  compared to PanIN-1, two-sample t-test. **c**

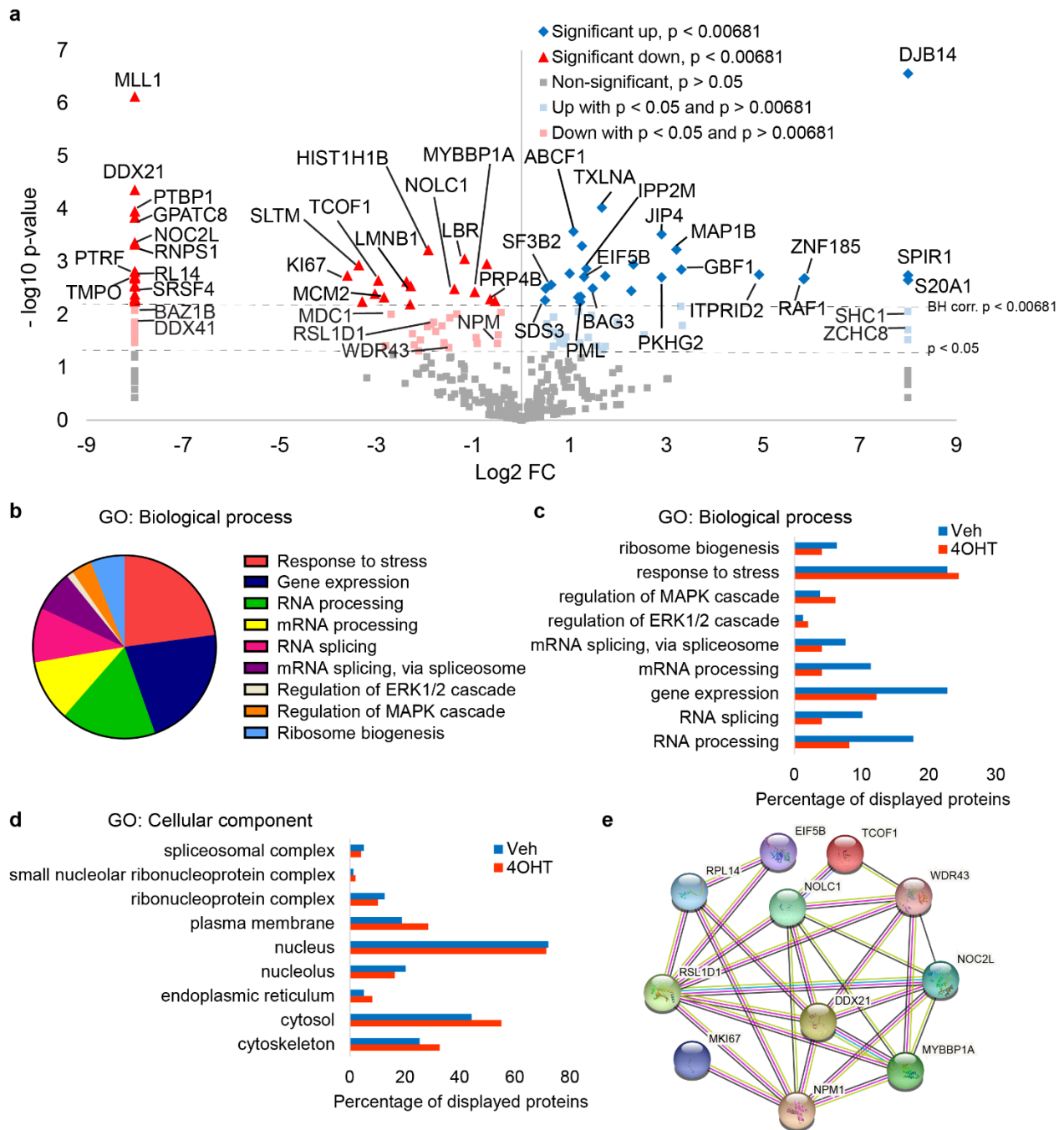
Quantification of p-Erk staining of epithelial cells in **(a)** according to four intensities of staining (none, 0; low, 1; moderate, 2; high, 3). The average percentage of cells for each staining intensity is shown. Mice as in **b**; PanIN-1 vs normal  $P < 0.001$ , PanIN-2 vs PanIN-1  $P < 0.05$ , PanIN-3 vs PanIN-1  $P < 0.001$ , PDAC vs PanIN-1  $P < 0.001$ , two-sample t-test. **d** Immunoblots for the indicated proteins in cell lines established from the *Pdx1-Cre;LSL-KRas<sup>G12D</sup>* mouse model in **(a)**: PanIN-1 (1497 to 1499) vs PDAC (AH375). The NB508 PDAC cell line was established from the *Pdx1-Cre;LSL-Kras<sup>G12D</sup>;p53<sup>loxP</sup>;p16<sup>loxP</sup>* mouse model. P-c-Raf, c-Raf phosphoserine 338; p-Mek1/2, Mek1/2 phosphoserine 217/221; p-Erk1/2, Erk 1 (p44, upper band) and 2 (p42, lower band) phosphothreonine 202 and phosphotyrosine 204. **e** RNA from 1499 and AH375 cells was collected for microarray gene expression analysis (GEO accession number: GSE57566). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) revealed a gene expression signature of RAF activation in 1499 cells (RAF\_UP.V1\_UP; M2728) and **f** MEK activation in 1499 cells (MEK\_UP.V1\_UP; M2725). See also Figure 3.8b-Figure 3.9.



**Figure 3.3. Reactivation of ERK signaling in PDAC induces a senescent-like phenotype in an ERK-dependent manner.**

**a** Immunoblots for the indicated proteins in Panc-1 human pancreatic cancer cells expressing  $\Delta$ RAF1-ER<sup>+</sup> (RAF-ER) or ER<sup>-</sup> control vector (ER) following a 48h treatment with indicated drugs. 4OHT, 4-hydroxytamoxifen; SCH, ERK inhibitor SCH772984. p-MEK1/2, MEK1/2 phosphoserines 217/221; p-ERK1/2, ERK 1 (p44, upper band) and 2 (p42, lower band) phosphorylated on threonine 202 and tyrosine 204. **b** Proliferation of Panc-1 cells expressing the RAF-ER vector, measured by MTT assay. The relative proliferation represents the fold of OD at 570 nm over 48h of treatment with indicated drugs. Each bar represents the mean of three replicates  $\pm$  SD. **c** Phenotype of colonies as

revealed by crystal violet staining 10 days post-seeding at low density with a single 48h treatment of 4OHT and/or repeated treatments with SCH772984. **d** Quantification of colonies from **c**. Each bar represents the mean number of colonies relative to colonies from vehicle-treated cells from three replicates  $\pm$  SD. Co-treatment with ERK inhibitor SCH772984 rescues the growth defect caused by 4OHT-induced RAF activation. **e** SA- $\beta$ -gal assay on cells as in **(b)**. Each bar indicates the mean percentage of SA- $\beta$ -gal-positive cells from three  $\geq 100$  cell counts  $\pm$  SD. **f-g** Quantitative PCR (qPCR) for on cells as in **(b)**. Each bar represents the mean fold-change ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) over the vehicle-treated condition from three replicates  $\pm$  SD. **h** Immunoblots for the indicated proteins on cells as in **(b)**. p-RB S780, Retinoblastoma protein phosphorylated on serine 780; p-H3 S10, Histone 3 phosphorylated on serine 10. **i** Tumor volume, starting at day 0 of treatment, 1 month after subcutaneous injection of  $1 \times 10^6$  Panc-1 cells expressing the RAF-ER construct into Hsd:Athymic Nude-*Foxn1*<sup>-</sup> mice. Mice were treated every 48h intraperitoneally with tamoxifen (Tam) or vehicle (Veh) starting from when mean tumor volume reached  $\geq 50$  mm<sup>3</sup>. Data are shown as mean volume + SEM. Veh, n = 8 tumors from 4 mice; Tam, n = 10 tumors from 5 mice. **j** Immunohistochemistry of p-ERK and KI-67 of tissue sections from tumors harvested at the endpoint of **(i)**. Scale bars = 50 $\mu$ m. **k-l** Quantification of p-ERK-positive cells and KI-67-positive cells from **(j)**. Data are presented as the mean percentage of positive cells, from  $\geq 2$  fields with  $\geq 100$  cells for each tumor,  $\pm$  SEM. Veh, n = 20 fields; Tam, n = 22 fields. For panels **b**, **d-g**, **i**, **k-l**, (\*\*\*\*) P < 0.0001, (\*\*\*) P < 0.001, (\*\*) P < 0.01, (\*) P < 0.05, Student t-test. Experiments **a-h** were performed independently at least twice in Panc-1 cells and were repeated with similar results in three additional pancreatic cancer cell lines. Experiments **i-l** were repeated with similar results in one additional pancreatic cancer cell line. See also Figure 3.10-Figure 3.11.

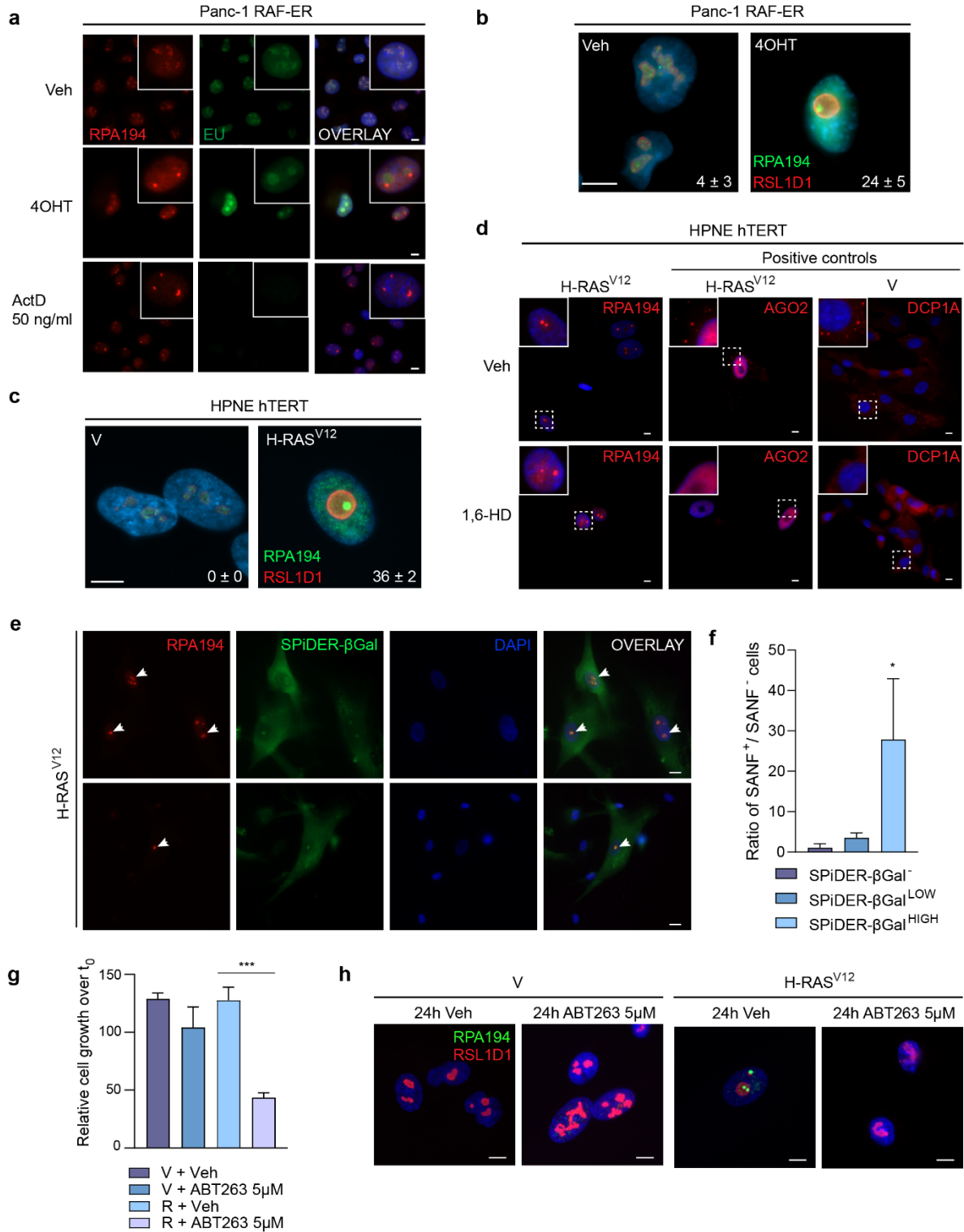


**Figure 3.4. Phosphoproteomics of Panc-1 cells under high ERK signaling reveal changes associated with nucleolar stress.**

**a** Volcano plot summarizing phosphoproteomic changes in Panc-1  $\Delta$ RAF1-ER<sup>+</sup> (RAF-ER<sup>+</sup>) cells treated for 48h with 4OHT relative to vehicle-treated cells. Proteins whose phosphopeptides are enriched following RAF activation are shown in blue, whereas proteins whose phosphopeptides are downregulated are shown in red. Significance was assessed by t-test with Benjamini-Hochberg correction for multiple testing. BH  $P < 0.00681$ ,  $n = 3$ . **b** Gene ontology for biological processes, using Scaffold 4 Proteomics Software, of proteins whose phosphopeptides are significantly

up- or downregulated following RAF pathway activation as in **(a)**. **c** Percentage of proteins from each condition (Veh or 4OHT) that are associated with GO terms of biological processes from **(b)**. **d** Percentage of proteins from each condition (Veh or 4OHT) that are associated with GO terms of cellular components. **e** STRING network representation of hits from *A* that are linked to nucleolar functions, ribosome biogenesis and translation.

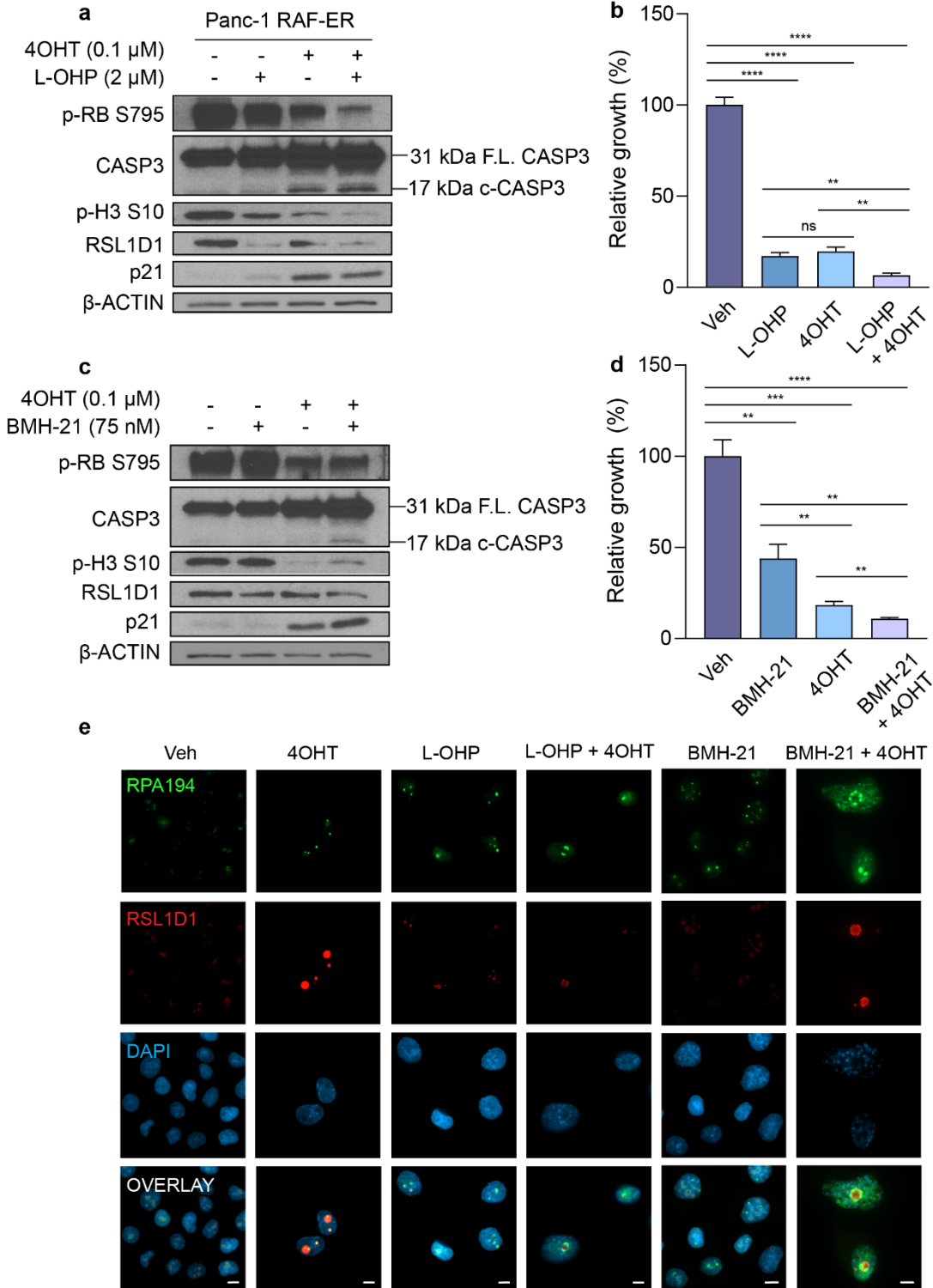




**Figure 3.5. ERK-induced senescence is linked to nucleolar stress and senescence-associated nucleolar foci (SANF) formation.**

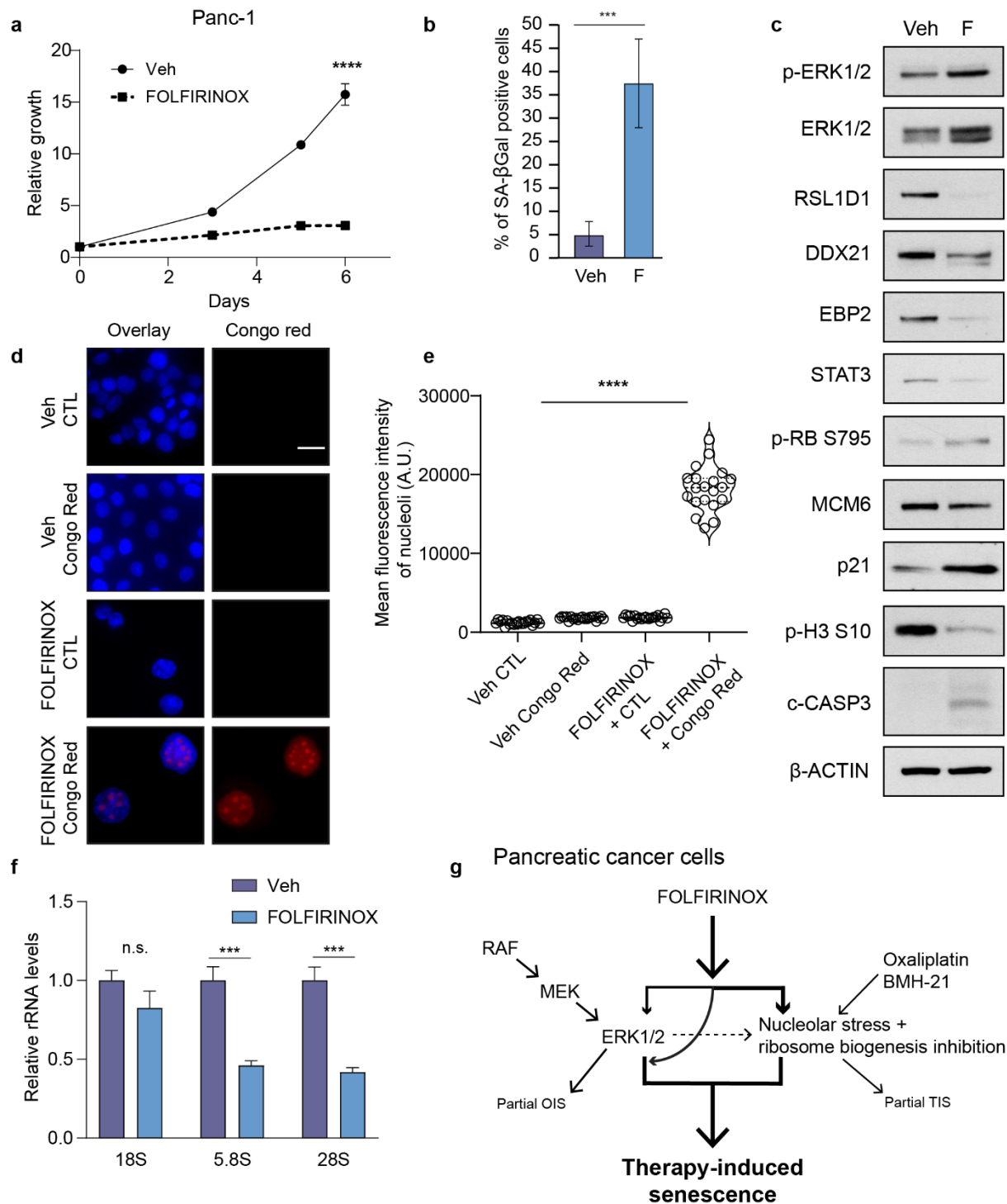


**a** 5-Ethynyl uridine (EU) incorporation RPA194 in Panc-1 RAF-ER cells treated for 72h with either vehicle or 4OHT, or for 18h with Actinomycin D (ActD) 50ng/ml. Nuclei are counterstained with DAPI. Scale bar = 10 $\mu$ m, n = 2. **b** Immunofluorescence for RPA194 and RSL1D1 of Panc-1 RAF-ER cells treated for 48h with Vehicle, Veh or 4-hydroxytamoxifen, 4OHT. Quantification of cells harboring senescence-associated nucleolar foci (SANF) is shown in bottom right corner. Data represents mean percentage of cells  $\pm$  SD from 3 counts of  $\geq$  100 cells, (\*\*),  $p = 0.0036$ , Student t-test. Scale bar = 10 $\mu$ m, n = 3. **c** Immunofluorescence for RPA194 and RSL1D1 of HPNE hTERT cells expressing H-RAS<sup>V12</sup> or control vector (V), 12 days post-infection. Quantification was performed as in *B*, (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$ , Student t-test, scale bar = 10 $\mu$ m, n = 3. **d** Immunofluorescence for RPA194, or AGO2 and DCP1A as positive controls, on cells from (**c**) treated for 1h with 1% 1,6-hexanediol or vehicle prior to fixation. SANF are not dissolved by hexanediol whereas P-bodies containing AGO2 or DCP1A are. Scale bar = 10 $\mu$ m, n = 3. **e** SPiDER- $\beta$ Gal assay on H-RAS<sup>V12</sup>-expressing HPNE hTERT cells and immunofluorescence using anti-RPA194 antibodies showing presence of SANF (white arrows) in SPiDER- $\beta$ Gal<sup>High</sup> cells compared to surrounding SPiDER- $\beta$ Gal<sup>Low</sup> or negative cells. Scale bar = 20 $\mu$ m, n = 2. **f** Quantification of the ratio of SANF-positive cells over negative cells among the indicated categories of SPiDER- $\beta$ Gal staining intensities from cells in **e**. Data represents mean ratio of cells from three counts of  $\geq$  60 cells  $\pm$  SD, (\*)  $p < 0.05$ , One-way ANOVA with Tukey HSD. **g** Relative percentage of cell proliferation after a 24h treatment with 5 $\mu$ M ABT263 of cells as in **c**. Data represent the mean of triplicates  $\pm$  SD, as measured by crystal violet staining and quantification of OD at 590nm relative to time 0, (\*\*\*)  $P < 0.001$ , Student t-test, n = 1. **h** Immunofluorescence using antibodies against RPA194 and RSL1D1 on cells from *G*, showing phenotype of nucleoli and loss of SANF in cells remaining after senolysis. Scale bar = 10 $\mu$ m, n = 2.



**Figure 3.6. Nucleolar stressors and ERK activation cooperate to arrest the proliferation of pancreatic cancer cells and to promote structural changes in the nucleolus.**

**a** Immunoblots for the indicated proteins on cell extracts from Panc-1 RAF-ER cells treated for 72h with vehicle, 4OHT, oxaliplatin (L-OHP, 2 $\mu$ M) or a combination of both drugs. p-RB S795, Retinoblastoma protein phosphorylated on serine 795; p-H3 S10, Histone 3 phosphorylated on serine 10, F.L. CASP3, full-length caspase 3; c-CASP3, cleaved caspase 3. **b** Relative proliferation over 7 days of cells as in *A* as measured by the fold of OD at 590nm from a crystal violet assay. Data represent the mean percentage of proliferation from triplicates  $\pm$  SD, n = 3. **c** Immunoblots for the indicated proteins on cell extracts from Panc-1 RAF-ER cells treated for 72h with vehicle, 4OHT, BMH-21 (75nM) or a combination of both drugs. **d** Relative proliferation over 7 days of cells as in *c* as measured by the fold of OD at 590nm from a crystal violet assay. Data represent the mean percentage of proliferation from triplicates  $\pm$  SD, n = 3. **e** Immunofluorescence for RPA194 and RSL1D1 of Panc-1 RAF-ER cells treated with indicated drugs for 5 days. Scale bar = 10 $\mu$ m, n = 2. For panels **b** and **d**, (\*\*\*\*) P < 0.0001, (\*\*\*) P < 0.001, (\*\*) P < 0.01, (\*) P < 0.05, Student t-test.



**Figure 3.7. FOLFIRINOX efficiently restores high ERK signaling and features of senescence to promote tumor suppression in PDAC cells.**

**a** Proliferation of Panc-1 cells treated every 3 days with FOLFIRINOX (5-FU 5 $\mu$ M, SN38 10nM, Oxaliplatin 1 $\mu$ M) or vehicle (Veh, DMSO) as measured by crystal violet assay. Data represent relative fold change of OD at 590nm.

Each point represents the mean of triplicates  $\pm$  SD, n = 3. **b** SA- $\beta$ -gal assay at day 6 on cells as in *A*. F, FOLFIRINOX. Each bar indicates the mean percentage of SA- $\beta$ -gal-positive cells from three  $\geq 100$ -cell counts  $\pm$  SD, n = 3. **c** Immunoblots of indicated proteins on cells as in **(b)**. p-ERK1/2, Extracellular-signal regulated kinases 1 (p44, upper band) and 2 (p42, lower band) phosphorylated on threonine 202 and tyrosine 204; p-RB S795, Retinoblastoma protein phosphorylated on serine 795; p-H3 S10, Histone 3 phosphorylated on serine 10, c-CASP3, cleaved caspase 3, n = 3. **d** Fluorescence imaging of cells as in **(b)** stained with Congo Red or control vehicle (CTL). Scale bar = 20 $\mu$ m, n = 3. **e** Quantification of Congo Red intensity in nucleoli from cells in *E*. Each dot represents assessment of intensity in a different cell from 20 cells assessed per replicate. **f** qPCR on cells as in **(b)** with primers targeting the 18S, 5.8S or 28S portion of both precursor and mature rRNAs, relative to *HMBS* and *TBP* housekeeping genes. Data represent mean of triplicates  $\pm$  SD. (n.s., non-significant), p = 0.0725, Student t-test, n = 3. **g** Model describing the involvement of both p-ERK activation, nucleolar stress and ribosome biogenesis inhibition in the senescence phenotype of FOLFIRINOX-treated pancreatic cancer cells. For panels **a-b**, **e** and **f** (\*\*\*\*) P < 0.0001, (\*\*\*) P < 0.001, (\*\*) P < 0.01, (\*) P < 0.05, Student t-test.

### **3.3.9. Supplemental Material**

#### **3.3.9.1. List of supplemental material**

Supplemental methods

Supplemental Table 2.1

Supplemental Figure 3.8 related to Figure 3.1 and Figure 3.2

Supplemental Figure 3.9 related to Figure 3.2 and Figure 3.3

Supplemental Figure 3.10 related to Figure 3.3

Supplemental Figure 3.11 related to Figure 3.3

Supplemental Figure 3.12 related to Figure 3.4

Supplemental Figure 3.13 related to Figure 3.5

Supplemental Figure 3.14 related to Figure 3.7

#### **3.3.9.2. Supplemental methods**

##### *Antibodies*

Antibodies used for immunohistochemistry: anti-KI-67/Ki-67 (1:200, ab15580, rabbit polyclonal, Abcam), anti-p-ERK1/2 (1:400, phospho-p44/42 MAPK Thr202/Tyr204, clone E10, #9106, mouse monoclonal, Cell signaling), anti-p-Erk1/2 (1:400, phospho-p44/42 MAPK Thr202/Tyr204, clone D13.14.4E XP, #4370, rabbit monoclonal, Cell signaling). Secondary antibodies used for immunohistochemistry: biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200; BA-1000, Vector Labs), biotinylated goat anti-mouse IgG (1:200; BA-9200, Vector Labs).

Primary antibodies used for Western blots: p-c-Raf Ser338 (1:1000, 56A6, #9427, rabbit monoclonal, Cell signaling), c-Raf (1:1000, sc-133, rabbit polyclonal, Santa Cruz biotechnology), p-MEK Ser 217/221 (1:1000, #9121, rabbit polyclonal, Cell signaling), MEK (1:1000, #9122,

rabbit polyclonal, Cell signaling), p-ERK1/2 (1:1000, phospho-p44/42 MAPK Thr202/Tyr204, clone D13.14.4E XP, #4370, rabbit monoclonal, Cell signaling), ERK1/2 (1:1000, #9102, rabbit polyclonal, Cell signaling),  $\beta$ -Actin (1:2000, 8H10D10, #3700, mouse monoclonal, Cell signaling), p-RB Ser780 (1:1000, #9307, rabbit polyclonal, Cell signaling), p-Histone 3 Ser10 (1:1000, 06-570, rabbit polyclonal, Millipore), p21 (1:1000, clone SXM30, 556431, mouse monoclonal, BD Pharmingen), RSL1D1 (1:4000, HPA043483, rabbit polyclonal, Sigma), Caspase 3 (1:1000, clone E87, ab32351, rabbit monoclonal, Abcam), DDX21 (1:1000, D-8, sc-376953, mouse monoclonal, Santa Cruz biotechnology), EBP2 (1:1000, N-13, goat polyclonal, sc-46316, Santa Cruz biotechnology), p-RB S795 (1:500, #9301, rabbit polyclonal, Cell signaling), MCM6 (1:1000, A300-194A, rabbit polyclonal, Bethyl laboratories), RAS (1:1000, clone 9A11.2, 05-1072, mouse monoclonal, Millipore), NS (1:1000, H-270, sc-67012, rabbit polyclonal, Santa Cruz biotechnology), and STAT3 (1:2500, 124H6, #9139, mouse monoclonal, Cell signaling).

Secondary antibodies used for Western blots: Goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP (1:3000, 170-6516, Bio-Rad), Goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP (1:3000, 170-6515, Bio-Rad), and Mouse anti-goat-HRP (1:10 000, sc-2354, Santa Cruz biotechnology).

Primary antibodies used for immunofluorescence: RPA194 (1:250, clone C-1, sc-48385, mouse monoclonal, Santa Cruz biotechnology), RSL1D1(1:500, HPA043483, rabbit polyclonal, Sigma), AGO2 (1:200, Millipore, clone 9E8.2, #06-642), DCP1A (1:100, clone 56-Y, sc-100706, mouse monoclonal, Santa Cruz biotechnology), RPA12/ZNRD1 (1:150, clone D-10, sc-393406, mouse monoclonal, Santa Cruz biotechnology), and TIF-IA/RRN3 (1:200, clone D-9, sc-390464, mouse monoclonal, Santa Cruz biotechnology).

Secondary antibodies used for immunofluorescence: goat anti-rabbit IgG conjugated to AlexaFluor 568 (1:1000, A11036, Life technologies), goat anti-mouse IgG conjugated to AlexaFluor 488 (1:1000, A11029, Life technologies), and goat anti-mouse IgG conjugated to AlexaFluor 568 (1:1000, A11031, Life technologies).

### *Histology and Immunohistochemical Analyses*

Pancreatic tissue samples from 16 patients diagnosed with PDAC and/or pre-malignant lesions, including ADM and PanINs, were analysed for p-ERK levels and KI-67 expression.

Specimens were obtained from consenting patients and the experiments were performed in accordance with the Partners Healthcare Institutional Review Board (IRB) policies. Pancreatic tissue samples from 14 *Pdx1-Cre;LSL-KRas<sup>G12D</sup>* mice were also analysed for p-Erk levels and Ki-67 expression. Tissue samples were melted at 55°C for 1h and then deparaffinized and rehydrated by sequential incubation in xylenes (2 x 5 min), 100% ethanol (1 x 5 min), 95% ethanol (1 x 3 min), 75% ethanol (1 x 3 min) and 40% ethanol (1 x 3 min). Samples were washed in PBS1X/0.3% Triton X-100 for 5 min and then in dH<sub>2</sub>O for 3 min. Heat-induced epitope retrieval was performed using a pressure cooker for 20 min in citrate-based buffer (H-3300, Vector Labs). Samples were cooled down for at least 1h and then washed 3 times during 3 min with PBS/0.3% Triton X-100. Endogenous peroxidase was inactivated by incubation for 10 min at room temperature in a solution of 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Samples were washed 3 times for 3 min in PBS1X/0.3% Triton X-100 and tissues were delimited using a hydrophobic barrier pen. Tissues were blocked for 1h at room temperature with 5% goat serum in PBS1X/0.3% Triton X-100, and then incubated with primary antibodies diluted in the same buffer overnight at 4°C. Tissues were washed 3 times for 3 min in PBS1X/0.3% Triton X-100 and then incubated with secondary antibodies diluted in PBS1X/0.3% Triton X-100 + 5% goat serum during 1h at room temperature. Slides were incubated with ABC Elite reagent (PK-6100, Vector Labs) for 30 min at room temperature (prepared 30 min before incubation), and then washed 3 times for 3 min with PBS1X/0.3% Triton X-100. Finally, the specimens were stained for peroxidase with Di-amine-benzidine (DAB) substrate kit (SK-4100, Vector Labs). The reaction was stopped by washing with water when the coloration was sufficient; the same incubation time was applied to all samples. Tissues were counterstained with hematoxylin (H9627, Sigma) and dehydrated by sequential incubation in 40% ethanol (1 x 1 min), 75% ethanol (1 x 1 min), 95% ethanol (1 x 1 min), 100% ethanol (1 x 1 min) and xylenes (2 x 5 min). Finally, slides were mounted with Sub-X Mounting Medium (#13519, EMS). H&E and immunostained slides were analysed with an Olympus DP72 microscope. Lesions and colorations have been validated by a pathologist. For KI-67, the percentage of stained epithelial cells was evaluated in the different types of lesions. For p-ERK, a grading system based on a scale of 4 staining intensities was used (0 for no staining to 3 for strong staining). The percentage of epithelial cells for each intensity was evaluated in the different types of lesions.

### *Phosphoproteomics*



1.75 x 10<sup>6</sup> Panc-1 RAF-ER cells were seeded in 15-cm dishes in triplicates. The following day, cells were treated with 4OHT 0.1 μM or ethanol as control vehicle for 48h. For the last 6h prior to harvesting, fresh media and drugs were added to the petri dishes. Then cells were washed twice in ice-cold PBS1X containing 1X Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail and 1X PhosStop phosphatase inhibitor cocktail (Roche), pelleted and snap frozen on liquid nitrogen. Pellets were then resuspended in the same buffer and sonicated. For each sample, 500mg of cell lysate (measured by Bradford assay) were reconstituted in 50mM ammonium bicarbonate with 10mM TCEP [Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride; Thermo Fisher Scientific], and vortexed for 1h at 37°C. Chloroacetamide (Sigma-Aldrich) was added for alkylation to a final concentration of 55mM. Samples were vortexed for another hour at 37°C. 10mg of trypsin was added, and digestion was performed for 8h at 37°C. Samples were dried down in a speed-vac. For the TiO<sub>2</sub> enrichment procedure, sample loading, washing, and elution were performed by spinning the microcolumn at 8000 rpm at 4°C in a regular Eppendorf microcentrifuge. The spinning time and speed were adjusted as a function of the elution rate. Phosphoproteome enrichment was performed with TiO<sub>2</sub> columns from GL Sciences. Digests were dissolved in 400 μL of 250mM lactic acid (3% TFA/70% ACN) and centrifuged for 5 min at 13000 rpm, and the soluble supernatant was loaded on the TiO<sub>2</sub> microcolumn previously equilibrated with 100 μL of 3% TFA/70% ACN. Each microcolumn was washed with 100 μL of lactic acid solution followed by 200 μL of 3% TFA/70% ACN to remove nonspecific binding peptides. Phosphopeptides were eluted with 200 μL of 1% NH<sub>4</sub>OH pH 10 in water and acidified with 7 μL of TFA. Eluates from TiO<sub>2</sub> microcolumns were desalted using Oasis HLB cartridges by spinning at 1200 rpm at 4°C. After conditioning with 1mL of 100% ACN/0.1% TFA and washing with 0.1% TFA in water, the sample was loaded, washed with 0.1% TFA in water, then eluted with 1mL of 70% ACN (0.1% TFA) prior to evaporation on a SpeedVac. The extracted peptide samples were dried down and solubilized in 5% ACN-0.2% formic acid (FA). The samples were loaded on an Optimize Technologies C18 precolumn (0.3-mm inside diameter [i.d.] by 5 mm) connected directly to the switching valve. They were separated on a home-made reversed-phase column (150-μm i.d. by 150 mm) with a 70-min gradient from 10 to 30% ACN-0.2% FA and a 600-nl/min flow rate on a EasynLC-2 connected to a Q-Exactive HF (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Each full MS spectrum acquired at a resolution of 60,000 was followed by 12 tandem-MS (MS-MS) spectra on the most abundant multiply charged precursor ions.

Tandem-MS experiments were performed using higher-energy collisional dissociation (HCD) at a collision energy of 25%. The data were processed using PEAKS 8.5 (Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON) and a Uniprot human database. Mass tolerances on precursor and fragment ions were 10 ppm and 0.01 Da, respectively. Variable selected post-translational modifications were carbamidomethyl (C), oxidation (M), deamidation (NQ), acetyl (N-term) and phosphorylation (STY). The data were visualized with Scaffold 4.3.0 (protein threshold, 99%, with at least 2 peptides identified and a false-discovery rate [FDR] of 0.1% for peptides). The data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD032257 and 10.6019/PXD032257:

**Username:** reviewer\_pxd032257@ebi.ac.uk, **Password:** ldqHSuTW.

#### *Scaffold and STRING analyses*

Analyses on phosphoproteomics data, normalized among the two conditions and biological triplicates for each, were performed using Scaffold 4.10.0 Proteomics Software. Statistical significance between 4OHT and vehicle-treated condition was assessed using a Student t-test ( $P < 0.05$ ) with Benjamini-Hochberg correction for multiple testing ( $P < 0.00681$ ). Data were extracted from Scaffold Quantitative analysis to build the Volcano Plot in Excel. GO-term enrichment analysis was performed in Scaffold, by importing GO terms for biological processes and cellular components from NCBI. STRING network was performed using STRING database version 11.5 using the phosphoproteins identified that were associated with the following GO-terms: ribosome biogenesis, nucleolus, large ribosomal subunit biogenesis, ribosome, translation or protein synthesis.

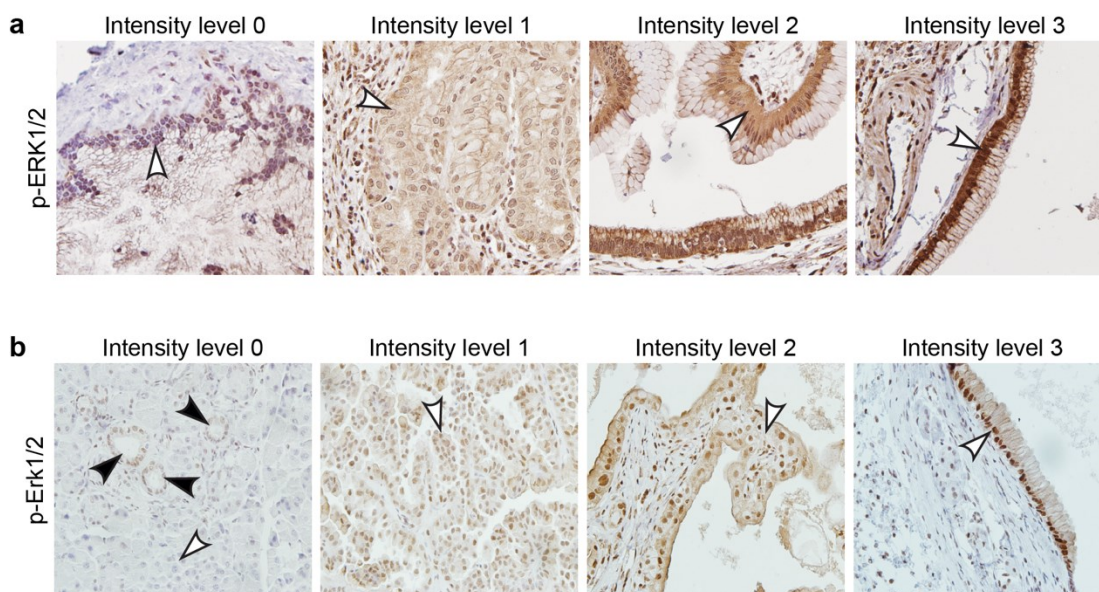
**Table 2.1 Primers and shRNAs sequences**

Primer/shRNA name	Sequence
Sh <i>TCOF1</i> -2: TRCN0000008631	CCCAAGACTAGCATCTACCAA
Sh <i>TCOF1</i> -4: TRCN0000008633	GAGTCATCAGACAGCAGTGAT
ShNTC: SCH002	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
qPCR primer <i>KI67</i> Hs* forward	AGAAGACAGTACCGCAGATGA
qPCR primer <i>KI67</i> Hs reverse	CGGCTCACTAATTTAACGCTGG
qPCR primer <i>Ki67</i> Mm forward	AGGGTAACTCGTGGAACCAA
qPCR primer <i>Ki67</i> Mm reverse	TTAACTTCTTGGTGCATACAATGTC
qPCR primer <i>CDKN1A/p21</i> Hs forward	ACCCTTGTGCCTCGCTCAGG
qPCR primer <i>CDKN1A/p21</i> Hs reverse	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCTGT
qPCR primer <i>Cdkn1a/p21</i> Mm forward	TCCACAGCGATATCCAGACA
qPCR primer <i>Cdkn1a/p21</i> Mm reverse	GGACATCACCAGGATTGGAC
qPCR primer <i>TCOF1</i> Hs forward	GGACTTGCCATCAAGCATGAAA
qPCR primer <i>TCOF1</i> Hs reverse	TTCCAGTCTTGCCAGCTTTCT
†qPCR primer <i>HMBS</i> Hs forward	GGCAATGCGGCTGCAA
†qPCR primer <i>HMBS</i> Hs reverse	GGGTACCCACGCGAATCAC
†qPCR primer <i>TBP</i> Hs forward	GCTGGCCCATAGTGATCTTTGC
†qPCR primer <i>TBP</i> Hs reverse	CTTCACACGCCAAGAAACAGTGA
†qPCR primer <i>Tbp</i> Mm forward	GTTTCTGCGGTCGCGTCATTTT
†qPCR primer <i>Tbp</i> Mm reverse	TCTGGGTTATCTTCACACACCATGA
†qPCR primer Beta-actin Mm forward	TCCTAGCACCATGAAGATCAAGATC
†qPCR primer Beta-actin Mm reverse	CTGCTTGCTGATCCACATCTG
qPCR primer 18S rRNA Hs forward (region: 4422-4441)	CTCTTAGCTGAGTGTCCCGC
qPCR primer 18S rRNA Hs reverse (region: 4555-4577)	TCGGAACTGAGGCCATGATTAAG
qPCR primer 5.8S rRNA Hs forward (region: 6623-6645)	CGACTCTTAGCGGTGGATCACTC
qPCR primer 5.8S rRNA Hs reverse (region: 6712-6733)	CATCGACACTTCGAACGCACTT
qPCR primer 28S rRNA Hs forward (region: 10702-10723)	GTACCCATATCCGCAGCAGGTC
qPCR primer 28S rRNA Hs reverse (region: 10802-10823)	AAGGATTGGCTCTAAGGGCTGG

\*Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*.

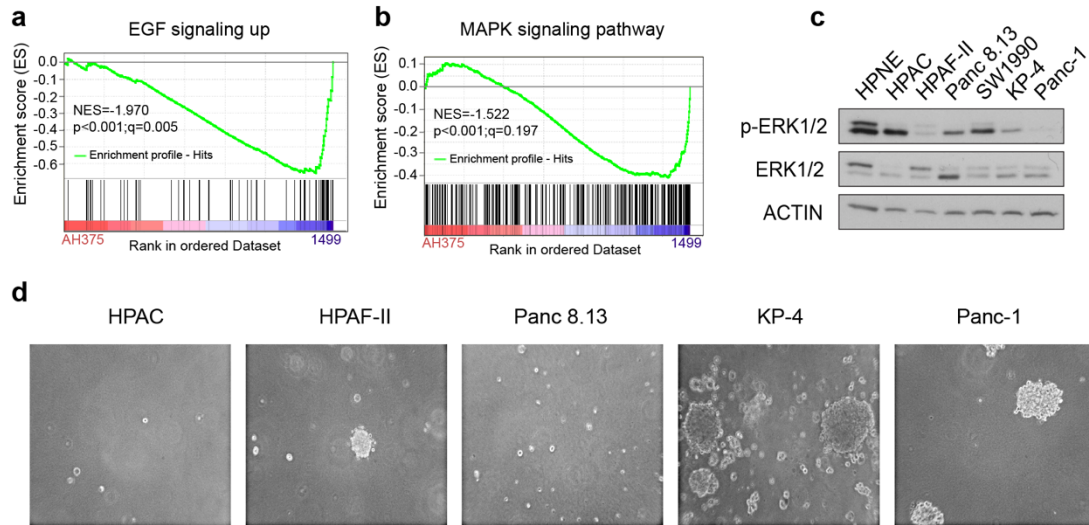
† Housekeeping gene.

### 3.3.9.3. Supplementary results



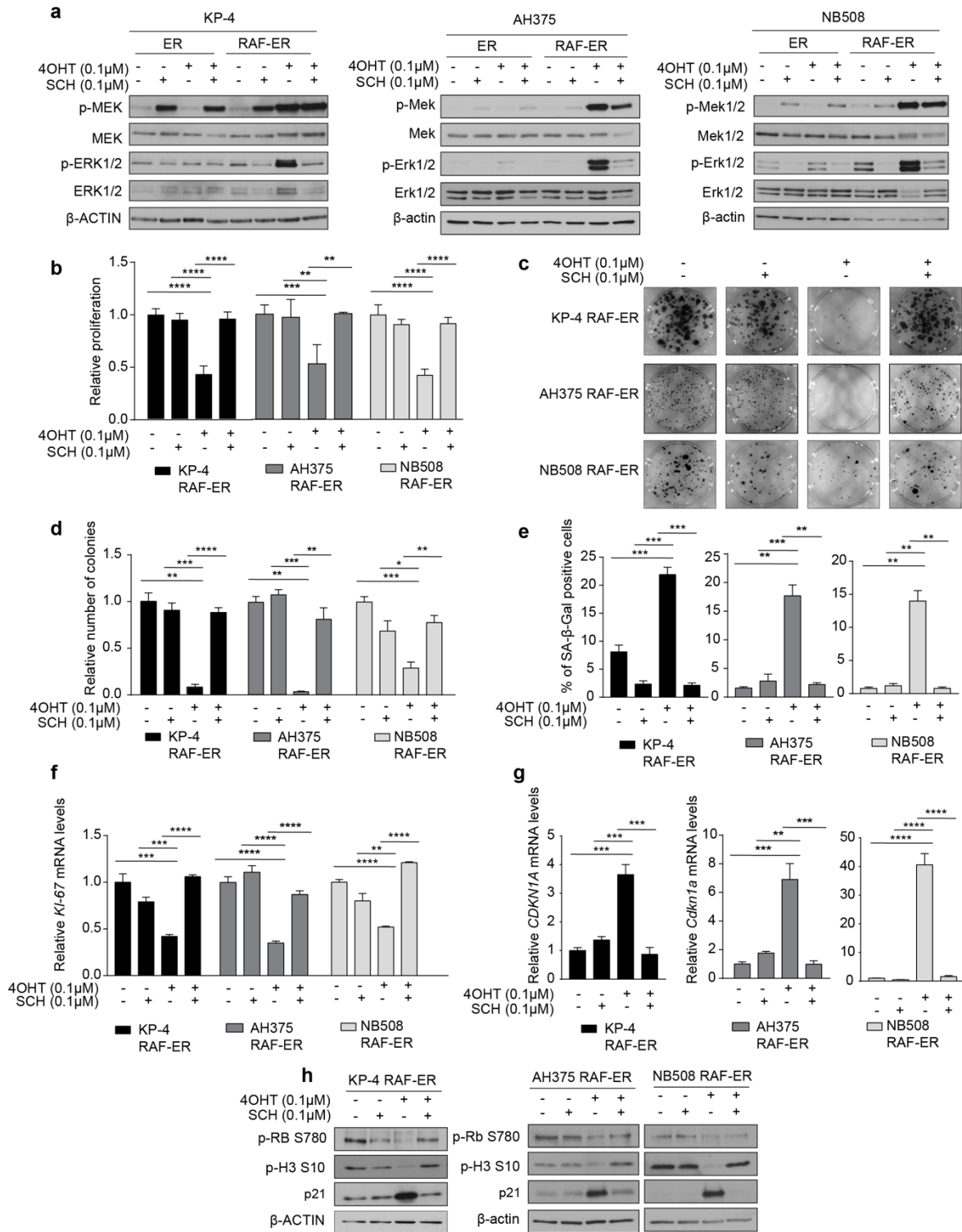
**Figure 3.8. (Fig. S1) Scoring key for human and mouse tissues stained by immunocytochemistry against p-ERK.**

**a** Intensity levels used as references for scoring p-ERK staining of human pancreatic tissues from Fig. 1. White arrows, epithelial cells considered for staining intensity. **b** Intensity levels used as references for scoring p-Erk staining of mouse pancreatic tissues from Fig. 2. White arrows, epithelial cells considered for staining intensity; black arrows, cells to exclude from intensity level 0. Related to Figure 3.1 and Figure 3.2.



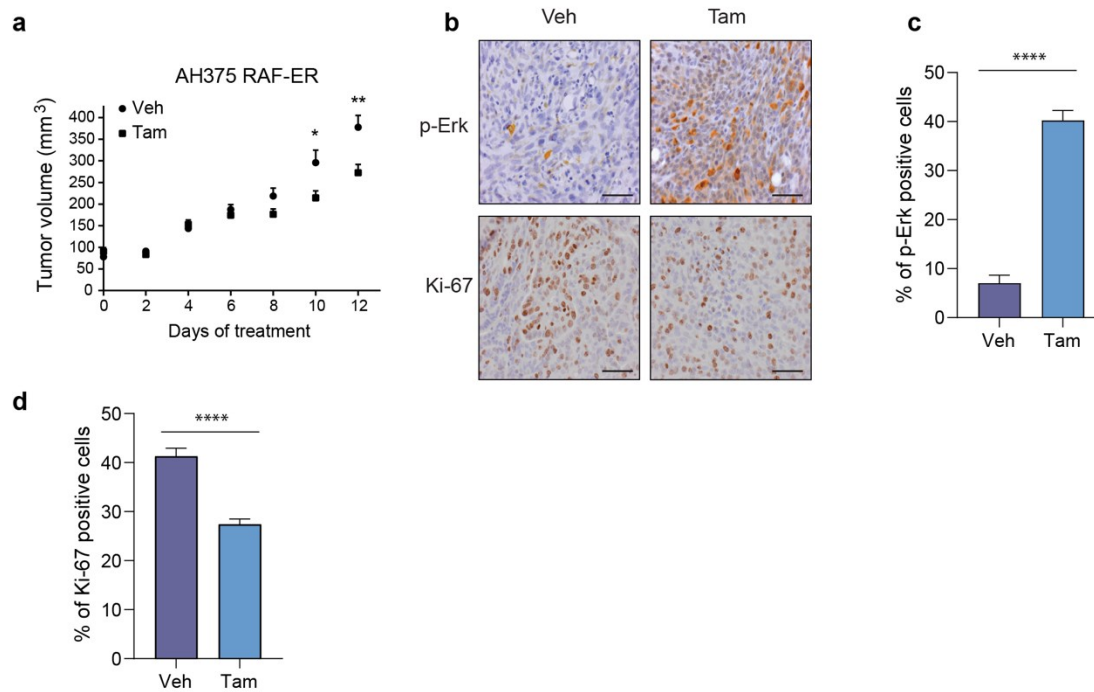
**Figure 3.9. (Fig. S2) Additional characterization of cell lines used in this study.**

**a-b** Microarray data analysis (GEO accession number: GSE57566) by GSEA showing gene expression signatures of **a** EGF signaling (NAGASHIMA\_EGF\_SIGNALING\_UP; M16311), and **b** MAPK activation (MAP\_KINASE\_ACTIVITY; M4513), in 1499 cells. **c** Immunoblots for indicated proteins showing p-ERK1/2 levels in a panel of human pancreatic cell lines. Pancreatic normal epithelial cells, HPNE; Human pancreatic cancer cells, HPAC, HPAF-II, Panc8.13, SW1990, KP-4, Panc-1, n = 2. **d** Phenotype of sphere formation by a subset of human pancreatic cancer cell lines from C with lower p-ERK levels, n = 1. Related to Figure 3.2 and Figure 3.3.



**Figure 3.10. (Fig. S3) ERK hyperactivation in various PDAC cell lines induces a senescent-like phenotype.**

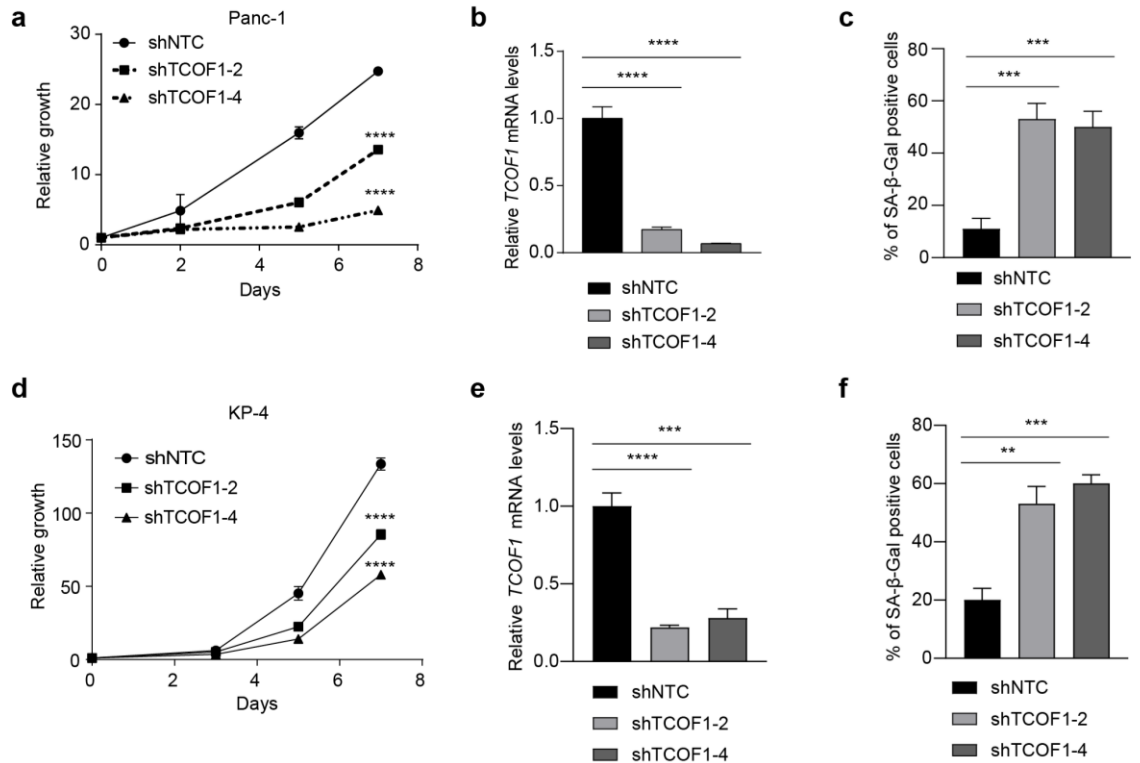
**a** Immunoblots for the indicated proteins in human KP-4, and murine AH375 and NB508 pancreatic cancer cells expressing  $\Delta$ RAF1-ER (RAF-ER) or ER control vector (ER) following a 48-hour treatment with indicated drugs. 4OHT, 4-hydroxytamoxifen; SCH, ERK inhibitor SCH772984. **b** Proliferation of cells from **(a)** as measured by MTT assay. The relative proliferation represents the fold of OD at 570nm over 48h of treatment with indicated drugs. Each bar represents the mean of three replicates  $\pm$  SD. **c** Phenotype of colonies as revealed by crystal violet staining 10 days post-seeding at low density with a single 48h treatment of 4OHT and/or repeated treatments with SCH772984. **d** Quantification of colonies from **(c)**. Each bar represents the mean number of colonies relative to vehicle-treated cells from three replicates  $\pm$  SD. Co-treatment with ERK inhibitor SCH772984 rescues the growth defect caused by 4OHT-induced RAF activation. **e** SA- $\beta$ -gal assay on cells as in **(b)**. Each bar indicates the mean percentage of SA- $\beta$ -gal-positive cells from three 100-cell counts  $\pm$  SD. **f-g** Quantitative PCR (qPCR) for KI-67/Ki-67 mRNA (**f**) and CDKN1A/Cdkn1a mRNA (**g**) on cells as in **(b)**. Each bar represents the mean fold-change (2) relative to the vehicle-treated condition from three replicates  $\pm$  SD. **h** Immunoblots for the indicated proteins on cells as in **(b)** showing senescence and decreased proliferation markers. p-RB S780, Retinoblastoma protein phosphorylated on serine 780; p-H3 S10, Histone 3 phosphorylated on serine 10. For panels **b**, **d-g**, (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$ , (\*\*\*)  $P < 0.001$ , (\*\*)  $P < 0.01$ , (\*)  $P < 0.05$ , two-sample t-test. All panels one biological replicate but 3 different cell lines.



**Figure 3.11. (Fig. S4) ERK activation slows tumor growth in a xenograft model of pancreatic cancer.**

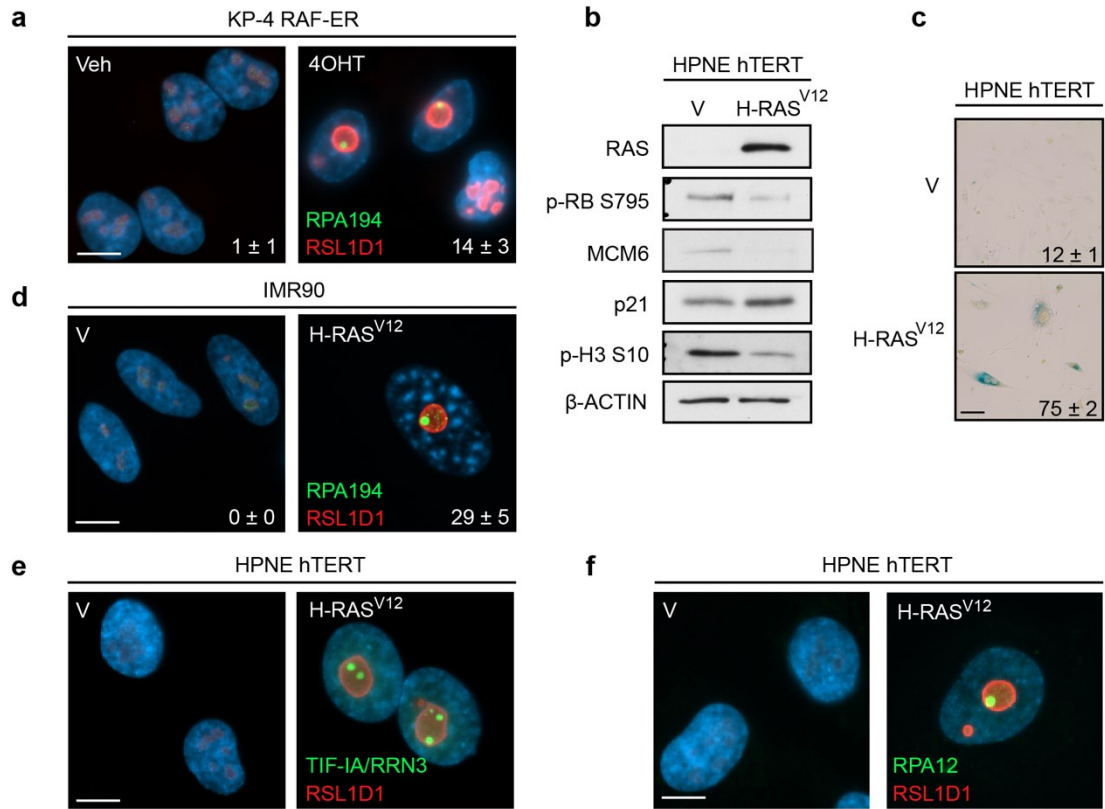
**a** Tumor volume, starting at day 0 of treatment, 1 week after subcutaneous injection of  $1 \times 10^6$  AH375 cells expressing the RAF-ER construct into Hsd:Athymic Nude-Foxn1 mice. Mice were treated every 48h intraperitoneally with tamoxifen (Tam) or vehicle (Veh) starting from when mean tumor volume reached  $\geq 50$  mm<sup>3</sup>. Data are shown as mean volume + SEM. Veh, n = 8 tumors from 4 mice; Tam, n = 10 tumors from 5 mice. (\*)  $P < 0.05$ , (\*\*)  $P < 0.01$ , Student t-test. **b** Immunohistochemical staining with anti-p-Erk and anti-Ki-67 antibodies of tissue sections from tumors harvested at the endpoint of (a). Scale bars = 50 $\mu$ m. **c-d** Quantification of p-Erk-positive cells (c) and Ki-67-positive cells (d) from tissue sections as in (b). Data are presented as the mean percentage of positive cells, from  $\geq$  one field with  $\geq 100$  cells for each tumor,  $\pm$  SEM. Veh, n = 18 fields; Tam, n = 16 fields. (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$ , Student t-test.





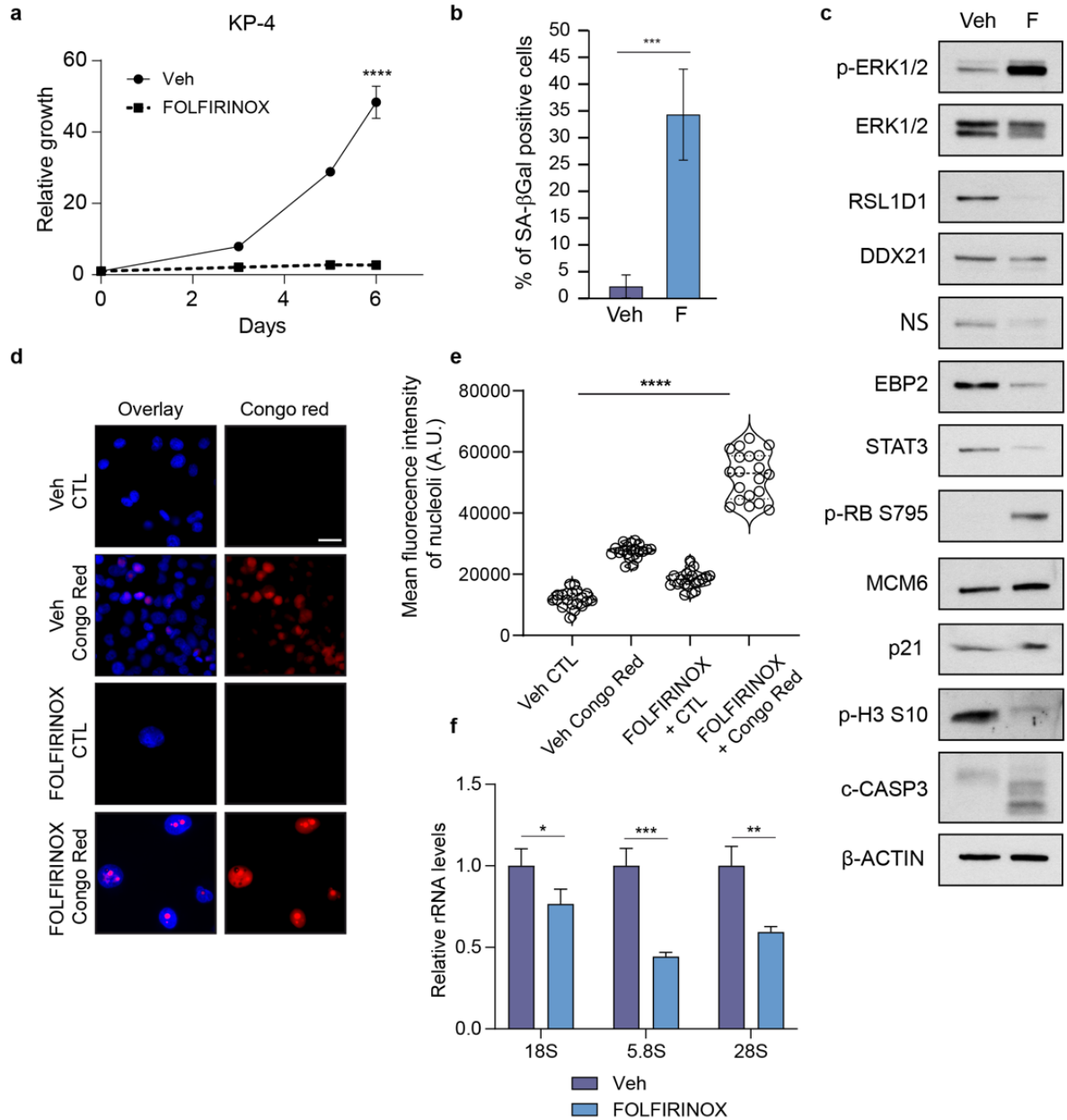
**Figure 3.12. (Fig. S5) Knockdown of the RNA polymerase I associated factor TCOF1 induces senescence in pancreatic cancer cells.**

**a,d** Proliferation by crystal violet staining of Panc-1 cells (a) or KP-4 cells (d) expressing different short hairpin RNAs (shRNAs) against RNA polymerase-I associated factor TCOF1 (shTCOF1-2, -4) or non-targeting control shRNA (shNTC). Data represent the relative fold of OD at 590nm starting from day 9 post-infection (day 0 of the curve). Each point represents the mean of triplicates  $\pm$  SD. (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$  versus shNTC, Student t-test,  $n = 3$ . **b,e** qPCR for TCOF1 mRNA levels at day 11 post-infection (day 2 of the growth curve) for (b) Panc-1 cells from (a), or **e** KP-4 cells from (d). Data is normalized to HMBS and TBP housekeeping genes and represent mean of triplicates  $\pm$  SD,  $n = 3$ . **c,f** SA- $\beta$ -gal assay on (c) Panc-1 cells from (a) or (f) KP-4 cells from (d). Each bar indicates the mean percentage of SA- $\beta$ -gal-positive cells from three  $\geq 100$ -cell counts  $\pm$  SD,  $n = 3$ . For panels b-c, e-f, (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$ , (\*\*\*)  $P < 0.001$ , (\*\*)  $P < 0.01$ , Student t-test.



**Figure 3.13. (Fig. S6) SANF are a new marker associated with nucleolar stress in oncogene-induced senescence.**

**a** Immunofluorescence using antibodies against RPA194 and RSL1D1 of KP-4 RAF-ER cells treated for 48h with Veh or 4OHT. Quantification of cells harboring senescence-associated nucleolar foci (SANF) is shown in bottom right corner. Data represent the mean percentage of cells  $\pm$  SD from 3 counts of  $\geq 100$  cells. (\*\*\*)  $P = 0.0012$ , Student t-test. Scale bar =  $10\mu\text{m}$ ,  $n = 2$ . **b** Immunoblots for the indicated proteins on HPNE hTERT cells from Figure 3.5c expressing HRAS V12 or empty vector (V) at day 12 post-infection. p-RB S795, Retinoblastoma protein phosphorylated on serine 795; p-H3, Histone 3 phosphorylated on serine 10.  $n = 3$ . **c** SA- $\beta$ -gal assay on cells from Figure 3.5c. Data in the bottom right corner indicate the mean percentage of SA- $\beta$ -gal-positive cells from three  $\geq 100$ -cell counts  $\pm$  SD. (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$ , Student t-test. Scale bar =  $100\mu\text{m}$ ,  $n = 3$ . **d** Immunofluorescence using anti-RPA194 and anti-RSL1D1 antibodies on IMR90 lung fibroblasts expressing either HRAS V12 or empty control vector (V) at day 12 post-infection. Quantification of cells harboring SANF is shown in bottom right corner. Data represent the mean percentage of cells  $\pm$  SD from 3 counts of  $\geq 100$  cells. (\*\*\*)  $P = 0.0006$ , Student t-test. Scale bar =  $10\mu\text{m}$ ,  $n = 3$ . **e-f** Immunofluorescence using antibodies against TIF-IA or RPA12 and RSL1D1 on cells as in (**b**), showing the presence of different RNA polymerase I-associated factors in SANF. Scale bar =  $10\mu\text{m}$ ,  $n = 1$ . Panels **e-f** were repeated once in Panc-1 RAF-ER, IMR90 H-RAS V12 and F in KP-4 RAF-ER with similar results.



**Figure 3.14. (Fig. S7) Characterization of FOLFIRINOX-induced senescence in KP-4 pancreatic cancer cells.**

**a** Proliferation of KP-4 cells treated every 3 days with FOLFIRINOX (5-FU 3.5 $\mu$ M, SN38 10nM, Oxaliplatin 6 $\mu$ M) or vehicle (DMSO) as measured by crystal violet assay. Data represent relative fold change of OD at 590nm. Each point represents the mean of triplicates  $\pm$  SD. (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$ , Student t-test,  $n = 3$ . **b** SA- $\beta$ -gal assay at day 6 on cells as in A. Each bar indicates the mean percentage of SA- $\beta$ -gal-positive cells from three  $\geq 100$ -cell counts  $\pm$  SD,  $n = 3$ . **c** Immunoblots of indicated proteins on cells as in (b). p-ERK1/2, Extracellular-signal regulated kinases 1 (p44, upper band) and 2 (p42, lower band) phosphorylated on threonine 202 and tyrosine 204; p-RB S795, Retinoblastoma protein phosphorylated on serine 795; p-H3 S10, Histone 3 phosphorylated on serine 10, c-CASP3, cleaved caspase 3,

n = 3. **d** Fluorescence imaging of cells as in (b) stained with Congo Red or control vehicle (CTL). Scale bar = 20 $\mu$ m, n = 2. **e** Quantification of Congo Red intensity in nucleoli from cells in (c). Each dot represents assessment of intensity in a different cell from 20 cells assessed per replicate. **f** qPCR on cells as in (b) with primers targeting the 18S, 5.8S or 28S portion of both precursor and mature rRNAs, relative to HMBS and TBP housekeeping genes. Data represent mean of triplicates  $\pm$  SD, n = 2.

**4. Un criblage CRISPR-Cas9 génome-entier permet l'identification des vulnérabilités des cellules cancéreuses pancréatiques sénescents pour promouvoir la sénolyse**

## 4.1. Mise en contexte de l'article 3

L'article 3 découle directement des travaux présentés dans l'article 2, alors que les deux projets ont évolué en parallèle dès la fin de ma deuxième année de doctorat. Alors que l'article 2 suggérait que la sénescence des cellules cancéreuses médiée par l'activation de la voie MAPK était seulement partielle, induisant un ralentissement de croissance tumorale et non une régression, un criblage pour déterminer les moyens de stabiliser cet arrêt ou de promouvoir plutôt la mort cellulaire s'imposait. Lorsque le criblage a été réalisé, nous n'avions pas encore imaginé le modèle de sénescence induite par le FOLFIRINOX, c'est pourquoi le criblage a été réalisé avec une activation génétique de la voie ERK via RAF-ER.

Parmi les résultats obtenus par cette approche, la découverte que l'inhibition de facteurs associés à la ribogénèse permettait une meilleure suppression tumorale a influencé la conclusion de l'article 2. Ainsi, dans l'article 3, nous nous sommes focalisés sur d'autres découvertes issues du criblage, soit la contribution de la ferroptose, un type de mort cellulaire reposant sur la peroxydation de lipides en présence de fer, et du gène GPX4 dans la sénolyse des cellules cancéreuses pancréatiques sénescents.

Nos résultats servent de preuve de concept *in vitro* que l'inhibition de GPX4 et l'induction de la ferroptose pourraient représenter une façon d'améliorer le traitement du cancer pancréatique, en prolongeant l'effet thérapeutique du FOLFIRINOX et en réduisant l'échappement de cellules agressives. Ainsi, par cet article, nous souhaitons faire la démonstration que l'approche « one-two punch » est à envisager comme nouveau moyen de cibler ce cancer.

## **4.2. Contribution à l'article 3**

Pour l'article 3, j'ai planifié et effectué le criblage CRISPR-Cas9 avec l'aide technique de S. Lopes-Paciencia. Puis j'ai fait l'analyse des résultats par différentes méthodes. J'ai produit les résultats présentés aux Figure 4.1, Figure 4.2, et Figure 4.3a, et j'ai effectué les clonages des vecteurs portant les petits ARN guides pour la validation de GPX4. Finalement, j'ai formé et supervisé P. Kalegari pour sa prise en charge de la suite du projet. J'ai préparé avec son aide les figures finales de l'article, et j'ai rédigé le manuscrit. Pour voir les contributions des autres co-auteurs, se référer à la section correspondante du manuscrit (section 4.3.7).

### 4.3. Article

#### **A genome-wide CRISPR-Cas9 screening identifies specific vulnerabilities of senescent pancreatic cancer cells to promote senolysis**

Rowell MC<sup>1\*</sup>, Kalegari P<sup>1\*</sup>, Lopes-Paciencia S<sup>1</sup>, Guillon J<sup>1</sup>, Saint-Germain E<sup>2</sup>, Mignacca L<sup>2</sup>, Bourdeau V<sup>2</sup>, Ferbeyre G<sup>1,2</sup>.

*In preparation for BioRxiv.*

<sup>1</sup>Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC H2X 0A9, Canada

<sup>2</sup>Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

Corresponding author: [g.ferbeyre@umontreal.ca](mailto:g.ferbeyre@umontreal.ca)

\* These authors contributed equally to this work.



### 4.3.1. Abstract

Pancreatic cancer cells evolve from the benign stage as they disable anti-tumor barriers such as cellular senescence. Senescence occurs early during pancreatic cancer development as a consequence of high intensity signals through the ERK pathway, triggered by KRAS mutations. These signals are attenuated once pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) are established but reactivation of the ERK pathway or the use of senescence-inducing chemotherapies such as FOLFIRINOX restore a partial senescent state which some cells can circumvent. Here we report the results of a genome-wide CRISPR-Cas9 screen that identified specific vulnerabilities of senescent pancreatic cancer cells to promote stable tumor suppression. Our results show that targeting pathways such as glucose and pyrimidine metabolism, lysosomal activity, ribosome biogenesis, or redox metabolism could be promising to target this killer disease. Strikingly, inhibition of the glutathione peroxidase 4 (GPX4) led to senolysis by ferroptosis induction in multiple models of oncogene and therapy-induced senescence in pancreatic cancer cells. GPX4 inhibitors were more efficient than the senolytic drug Navitoclax (ABT-263) in blocking colony formation upon release of FOLFIRINOX treatment. Taken together, these results suggest that ferroptosis-inducing drugs can be used for the treatment of pancreatic cancer in combination with senescence inducing chemotherapy.

[*Keywords:* CRISPR-Cas9 screen, senescence, pancreatic cancer, senolysis, GPX4, ferroptosis, FOLFIRINOX, one-two punch]

### 4.3.2. Introduction

Of all cancers, pancreatic cancer is one of the most difficult to treat. Highly refractory to treatments, this disease is lethal in almost 50% of patients within 4 months post-diagnosis (2). The best currently available therapies for this metastatic disease include the FOLFIRINOX regimen that prolongs patients' life for approximately 11 months, and the combination of gemcitabine and nab-paclitaxel which is less efficient with barely 9 months of mean survival (308). Therefore, scientists and physicians need to think of new strategies to target more efficiently pancreatic cancer and overcome drug resistance. A recent and promising new approach in cancer treatment relies on the induction of senescence in cancer cells followed by the use of a senolytic drug to kill these senescent cancer cells (411,412).

Senescence is a tumor suppression mechanism, because it leads to a stable cell cycle arrest and activation of an immune response against cancer cells (413). However, senescence induction alone is not sufficient to promote efficient tumor regression in clinical settings, as cells tend to circumvent this arrest (33,414-416). Persistence of senescent cells in a tumor is often linked to inflammation that promotes neighbouring cells' proliferation, ultimately leading to relapse and secondary cancers (417). That is why a second punch killing senescent cells is needed to promote efficient tumor suppression. One advantage of this strategy is that the induction of senescence in cells might be a way to make the phenotype of these cells more homogenous, and it becomes easier to decipher the vulnerabilities of such cells (418). This so-called one-two punch approach has proven promising in multiple settings, especially with the senolytic drug navitoclax (ABT-263), but significant challenges remain regarding its universality, depending on the senescence inducer and cancer model (419,420). Consequently, specific senolytic drugs and one-two punch combos are not yet uncovered in the pancreatic cancer field.

An additional consideration when it comes to pancreatic cancer is the fact that in the bulk of a tumor, many cells have inactivating mutations and deletions of major tumor suppressors such as CDKN2A/p16 and TP53 (21,22). Such strategies must then be able to promote senescence and senolysis in p53/p16-deficient background. In our previous work, we demonstrated that pancreatic cancer cells are still sensitive to senescence induction by high ERK signalling (Rowell *et al.* in review in *Commun. Biol.*). High ERK signalling is also a hallmark of cells at the pancreatic

intraepithelial neoplasia (PanIN) stage. Therefore, the development of new senolytic drugs targeting cancer cells with high ERK might be a successful approach to delay or block the progression of PanINs to pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Finally, even if our work and the work of others demonstrated that many cells in the PDAC stage have lost the dependency upon the RAS oncogene and have consequently a natural loss of ERK signalling (41,67), a senolytic approach that is based on high ERK signalling might be able to target both cells still having active ERK signalling, and cells where high ERK signalling is promoted by senescence-inducing therapies.

In the present article, we uncover specific vulnerabilities of senescent pancreatic cancer cells. To do so, we report the results of a whole-genome CRISPR-Cas9 screen performed in Panc-1 cells rendered senescent by the activation of a constitutive allele of the c-RAF oncogene. Results from this screen include different pathways on which senescent cancer cells rely to survive and proliferate, such as glycolysis, pyrimidine metabolism, ribosome biogenesis and ROS detoxification. The glutathione peroxidase GPX4 strikes out as one of the genes that senescent pancreatic cancer cells critically need to overcome the stress of senescence induction. Therefore, inactivation of this gene during senescence induction leads to cell death by lipid peroxidation, a form of iron-dependent cell death called ferroptosis. Finally, combination of GPX4 inhibitors and senescence-inducing chemotherapeutic drugs brought us to the conclusion that GPX4 is a new promising target for senolysis in pancreatic cancer cells.

### **4.3.3. Results**

#### **4.3.3.1. Vulnerable pathways revealed by CRISPR-Cas9 screening in senescent pancreatic cancer cells**

To discover the specific vulnerabilities of senescent pancreatic cancer cells, we used the Panc-1 cell line, established from a primary PDAC. This quasi-triploid model harbors the activating KRAS<sup>G12D</sup> mutation, a deletion of INK4A/ARF exon 1-3 inactivating both p16 and ARF pathways, and the TP53<sup>P72R, R273H</sup> mutations disabling p53 (421). Previous work classified Panc-1 cells in the quasi-mesenchymal subtype, one of the most aggressive and refractory subtypes, that is insensitive to KRAS ablation, showing its loss of oncogene dependency (41). With their basal low levels of p-ERK1/2, those cells were a suitable model to work with.

To induce senescence in Panc-1 cells, we infected them with a constitutively active allele of the c-RAF kinase acting upstream of MEK/ERK pathway, fused to the ligand-binding domain of the estrogen receptor ( $\Delta$ RAF1-ER<sup>T</sup>), a construct inducible by the addition of 4-hydroxytamoxifen (4OHT). Senescence features of Panc-1 RAF-ER cells with 4OHT were described in Rowell *et al.* (in review in *Commun. Biol.*, 2022) and include increased SA- $\beta$ -Gal activity, loss of proliferation markers such as decreased phosphorylation of the retinoblastoma protein and the histone H3 on serine 10. Panc-1 cells senescence was also characterized by nucleolar stress and presence of senescence-associated nucleolar foci (SANF) (Rowell *et al.* in review in *Commun. Biol.*). Here, Panc-1 RAF-ER cells were transduced with the pooled genome-wide CRISPR knock-out (GeCKOv2) library (422) at a MOI below 0.5 to insure only one integration of a small guide RNA vector (sgRNA) per cell and using a representation of 500 cells for each of the 123 411 guides of the pooled A and B half-libraries (Figure 4.1A). The library contains up to 6 sgRNAs per protein-coding gene and 4 per microRNA. Following selection with puromycin, we waited for 2 weeks to allow cells with toxic sgRNAs to be eliminated from the population. Then, small guides present in the population were sequenced before the activation of RAF-ER (day 0) and again 3 days after the induction of senescence by RAF with 4OHT addition.

SgRNAs that were lost from the population during senescence induction represent drop-outs, i.e. genes whose inactivation potentiate the growth arrest or kill senescent pancreatic cancer cells. Such targets represent specific vulnerabilities of senescent pancreatic cancer cells. Among the most differentially regulated guides, we identified CDIPT, a phosphatidylinositol synthase; the lysosomal V-type H<sup>+</sup> ATPase subunit V0C (ATP6V0C) involved in lysosomal pH regulation; the deoxyuridine triphosphatase (DUT) known to provide precursors for thymidine synthesis and to protect against cell death mediated by uracil incorporation into DNA; and the glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Figure 4.1B-C). Work done by Dr. Schmitt and colleagues with inhibitors of lysosomal acidification or glucose metabolism highlighted some of these pathways as vulnerabilities of senescent cancer cells (423). When performing analyses to combine the mean response of all guides targeting the same gene between day 0 and day 3, the most striking drop-outs were GAPDH, a second glycolytic enzyme Enolase 1 (ENO1), and the glutathione peroxidase enzyme GPX4, involved in protection of cells against toxic lipid peroxidation and ferroptosis (Figure 4.1D).

Results from the screen were also analysed globally to find signatures of vulnerable pathways. Gene set enrichment analyses (GSEA) performed using the total CPM (counts per million) values for all guides per gene showed signatures of pyrimidine metabolism, reactive oxygen species and glycolysis among the drop-outs, meaning that these pathways represent vulnerabilities of senescent pancreatic cancer cells (Figure 4.1E-G). Of note, among all statistically significant drop-outs ( $P < 0.05$ ), more than 40 ribosome biogenesis factors and ribosomal subunits were found, confirming our previous work suggesting that ribosome biogenesis inhibition was one of the key pathways to potentiate ERK-dependent senescence in pancreatic cancer (Figure 4.2A-C). Drop-outs include genes involved in multiple steps of ribosome biogenesis, from rRNA transcription, modification and processing to large ribosomal subunit biogenesis and export from the nucleus (Figure 4.2D). Such results are consistent with the fact that in a p16/p53-deficient cell line, one way to promote tumor suppression is to act on the nucleolus, increasingly recognized as a major cellular stress sensor (424). When rRNA transcription is affected, unassembled ribosomal proteins can accumulate and halt cell cycle through direct CDK/cyclins inhibition (190,191) or by promoting expression of cell cycle inhibitors such as p21<sup>CIP</sup> and p27<sup>KIP</sup> (296,425). Among these genes involved in ribosome biogenesis, we identified the AAA-ATPases SPATA5 (426) and WDR74 (427) that play a role in the late stages of assembly of the large subunit and the RNA helicase DDX5, implicated in multiple steps of ribosome biogenesis and previously identified as a targetable vulnerability of RAS<sup>G12V</sup>-transformed cells (428).

By cross-checking our 50 best hits from the GSEA ranking, our 50 hits with the greatest fold-change among the drop-outs and a database of the druggable genome, we narrowed down our list to 13 druggable hits (Figure 4.3A). We validated that inactivation of the deubiquitinase USP5, a known oncogene in PDAC (429), potentiates the growth arrest of cells induced to senesce by RAF induction (Figure 4.6A-C). However, with some exciting new literature describing ferroptosis as a promising anti-cancer mechanism (430,431), we chose to focus our efforts on GPX4.

#### **4.3.3.2. GPX4 inactivation cooperates with RAF induction to block PDAC cells proliferation and induce ferroptosis**

With their frequent K-RAS mutation, PDAC cells might be intrinsically susceptible to ferroptosis (432). Indeed, K-RAS mutations have been linked to increased ROS production, higher autophagy

flux known to promote iron release in cells, and higher lipid scavenging properties providing all necessary components for lipid peroxidation by the Fenton reaction during ferroptosis (433-435). However, it has also been shown that a subset of pancreatic cancer cells expresses high levels of GPX4 generating better redox defense, increased EMT and resistance to therapy (436). Senescent cancer cells with higher ERK signalling are also generally recognized as important ROS producers due to mitochondrial dysfunction, have increased lysosomal activity and accumulate damages due to oxidative stress (437). However, they are also more resistant to apoptosis. Therefore, altering redox defenses in cells with senescence- and cancer-associated oxidative stress through GPX4 inactivation seems like a logical avenue to explore to promote tumor cell death by ferroptosis (438,439).

Hence, to validate our findings about GPX4 being a key target to potentiate tumor suppression in Panc-1 RAF-ER cells, we cloned three individual sgRNAs against GPX4 and a sgRNA against EGFP, previously used as a non-targeting control (422). This validation was performed in two cell lines, Panc-1 and KP-4, at a whole population level. When tested in growth assays, all three sgGPX4 produced a better proliferation arrest following RAF activation by 4OHT than sgEGFP. Of note, sgGPX4s affected only moderately the growth of non-senescent pancreatic cancer cells (Figure 4.3B-D, and Figure 4.7A-C). To determine if this cooperation was based on a better growth arrest or to cell death, we quantified the latter using trypan blue staining and observed that the combination of sgGPX4 and RAF activation by 4OHT led to increased cell death (Figure 4.3E and Figure 4.7D).

Several GPX4 inhibitors were described (432,440). We first tested ML210 and found that its activity was more potent on senescent pancreatic cancer cells in comparison to non-senescent cells in cell viability assays (Figure 4.7E) or cell proliferation assays (Figure 4.3F and Figure 4.7F). Since GPX4 is a key regulator of ferroptosis, a non-apoptotic cell death mediated by iron-dependent lipid peroxidation, we tested if the addition of inhibitors of different types of cell death or ROS quenchers could reverse the phenotype. We observed that the reduction in cell growth could be reversed by the ferroptosis inhibitor and iron chelator Ferrostatin-1 (FER-1) and by two ROS quenchers, N-acetylcysteine (NAC) and Trolox (Figure 4.3F and Figure 4.7F-G) (441). However, it could not be reversed by the necroptosis inhibitor Necrostatin-1 (Nec-1) that targets

RIPK1 nor by the pan-caspases and apoptosis inhibitor Z-VAD-FMK (Z-VAD). Those results confirmed that senescent pancreatic cancer cells are vulnerable to ferroptosis that can be achieved by GPX4 inhibition or genetic inactivation.

We then used the fast-growing KP-4 PDAC cell line to derive clones expressing either one of the three sgGPX4 or the sgEGFP. Partial loss of GPX4 expression was validated at the protein level by western blot, most probably corresponding to deletion of one or two copies of the gene in a polyploid cell line (Figure 4.4A). After clonal expansion, we infected the cells with the RAF-ER construct and activated the RAF pathway with 4OHT. In all sgGPX4 clones tested, the cooperation of senescence and GPX4 inactivation led to a better decrease in cell growth than at the population level (Figure 4.4B). That decrease could be rescued with the addition of Ferrostatin-1. Interestingly, in these clones, the partial deletion of GPX4 was sufficient on its own to affect cell growth, but since this defect could also be rescued by FER-1 addition, it is likely that targeting GPX4 even in non-senescent cancer cells could induce ferroptosis in some of them (442). Targeting GPX4 with ML210 in the normal pancreatic cell line HPNE expressing hTERT with or without activation of the Ras oncogene to promote normal cell senescence, did not significantly affect cell growth even at higher doses than in cancer cells (Figure 4.4C). This result points toward a specific vulnerability of senescent cancer cells to GPX4 inhibition.

#### **4.3.3.3. GPX4 inhibition promotes senolysis and prevents escape in FOLFIRINOX-induced senescence of PDAC cells**

Next, we aimed to validate the potential of GPX4 inhibition in other senescence models, such as therapy-induced senescence in PDAC. Some drugs susceptible to promote senescence in cancer cells are the topoisomerase I inhibitors irinotecan and camptothecin (443). Indeed, GPX4 inhibition by ML210 could potentiate the growth arrest of camptothecin-treated PDAC cells (Figure 4.5A and Figure 4.8A). Camptothecin is closely related to the SN38 metabolite of irinotecan, one of the components of the FOLFIRINOX regimen. FOLFIRINOX drugs 5-fluorouracil, SN38 and oxaliplatin can induce senescence in PDAC cells *in vitro*, and this phenotype includes ERK stimulation and ribosome biogenesis inhibition (Figure 4.5B-D and Figure 4.8B-D) (Rowell *et al.* in review in *Commun. Biol.*). In fact, ML210's IC50 was strikingly reduced in PDAC cells that were rendered senescent by a 4-day pre-treatment with FOLFIRINOX (Figure 4.5E and Figure

4.8E) indicating a potent senolytic effect of ML210 in FOLFIRINOX treated PDAC cells. In cells pre-treated for 4 days with FOLFIRINOX, a 4-day treatment with ML210 or RSL3 (another GPX4 inhibitor) was better at promoting senolysis than ABT-263 (navitoclax) a widely used senolytic drug currently in clinical trials for acute myeloid leukemia and non-small cell lung cancer (Figure 4.5F and Figure 4.8F). Finally, we wondered how stable the tumor suppressive effect was in cells that were pre-treated with FOLFIRINOX and then with the different drugs ABT-263, ML210 or RSL3 compared to vehicle. Strikingly, only the GPX4 inhibitors and not ABT-263 were able to prevent escape and colony formation in FOLFIRINOX-treated cells after 14 days (Panc-1) or 21 days (KP-4) following treatment release (Figure 4.5G-H and Figure 4.8G-H). Taken together, these results suggest that GPX4 is a bona fide senolytic target and GPX4 inhibitors could be used in addition to FOLFIRINOX in a one-two punch strategy to prevent resistance and relapse in pancreatic cancer (Figure 4.5I).

#### **4.3.4. Discussion**

Pancreatic cancer is one of the deadliest cancers in western countries and there is an urgent need for new therapeutic strategies. In this study, by conducting a genome-wide CRISPR-Cas9 screen to find sgRNAs that would cooperate with RAF-induced senescence, we have uncovered a new promising target for senolysis in pancreatic cancer: GPX4.

Many CRISPR screens have been performed in pancreatic cancer cells to uncover specific vulnerabilities (444). We expected different targets in ours because we target senescent pancreatic cancer cells not proliferating cells. Consistently, we did not identify targets directly related to cell cycle progression. Also, the brief window during which we observed the changes in sgRNAs' representation led us to catch predominantly vulnerabilities implicated in acute senescence induction or MAPK activation. Our results can be relevant to cells that experience the “ERK rebound” effect described by Peeper group in melanoma cells after withdrawal of MAPK pathway inhibitors (148). Inhibition of GPX4 efficiently killed senescent Panc1 or KP-4 cells. Panc-1 cells exhibits a lipogenic metabolism and anti-redox defenses while KP-4 cells are of the glycolytic subtype, with rapid proliferation and strong EMT features (61). It is possible that senescence triggers a common vulnerability in these two dissimilar cell lines and suggest that GPX4 inhibition is a general senolytic strategy. However, additional studies are needed to validate the effect of



GPX4 inhibitors on senescence induced in the classical and slow-proliferating PDAC subtypes (41).

Regarding the inactivation of GPX4, more refined studies would be needed to determine if its inactivation is to be performed concomitantly with senescence induction, or if the efficiency is the same before or after senescence induction. In our hands, the screen setup showed that initial inactivation of GPX4 was working just as well as adding GPX4 inhibitors after 4 days or therapy-induced senescence. However, it is primordial to assess more extensively if its inhibition is safe for normal cells and to which extent it can be inhibited without adverse effects on normal cells (445).

GPX4, our main target to promote ferroptosis in senescent cells, is difficult to target pharmacologically, and currently available GPX4 inhibitors lack good bioavailability. In principle, targeting other ferroptosis-associated genes would be desirable. However, ferroptosis genes are still poorly understood. Recently, ENO1, another hit from our screen, was linked to ferroptosis induction (431). Additional candidates targets to induce ferroptosis as a senolytic treatment are the ferritin heavy chain (446), GOT1 (447) and SLC7A11 (439).

We also identified sgRNAs against the mitochondrial protease LONP1 as drop-out in our screen following RAF activation. Conversely, inhibition of LONP1 was reported to decrease PDAC sensitivity to ferroptosis induction by erastin, through the upregulation of GPX4 (448). This discrepancy suggests that targeting LONP1 might affect senescent PDAC cells viability by a non-ferroptosis pathway, such as increased proteotoxic stress. Interestingly, another hit from our screen was previously identified as a vulnerability of PDAC cells. HILPDA promotes the storage of polyunsaturated fatty acids in lipiddroplets in PDAC cells (449). That lipid accumulation is favorable for tumor growth but also constitutes an increased susceptibility to lipid peroxidation (450).

As for the general pathways identified, pyrimidine metabolism is a known vulnerability in PDAC cells, as gemcitabine and fluorouracil have been standards of care since multiple years. Ribosome biogenesis is also targeted to some extent by different drugs in the FOLFIRINOX regimen such as oxaliplatin (315). Lysosomal activity has been studied for many years without marked success, and glycolysis inhibition is hard to achieve *in vivo* due to important toxicity for

the brain. In conclusion, redox metabolism and ferroptosis strike out as new pathways to study for pancreatic cancer treatment while keeping in mind that all those results should be validated *in vivo* since oxidative stress-induced ferroptosis might be greatly affected by the hypoxic tumor microenvironment of the pancreas.

#### 4.3.5. Material and methods

##### *Antibodies, drugs, reagents, and plasmids*

Primary antibodies used for Western blots: p-MEK Ser 217/221 (1:1000, #9121, rabbit polyclonal, Cell signaling), p-ERK1/2 (1:1000, phospho-p44/42 MAPK Thr202/Tyr204, clone D13.14.4E XP, #4370, rabbit monoclonal, Cell signaling),  $\beta$ -Actin (1:2000, 8H10D10, #3700, mouse monoclonal, Cell signaling), p21 (1:1000, clone SXM30, 556431, mouse monoclonal, BD Pharmingen), p-RB S795 (1:500, #9301, rabbit polyclonal, Cell signaling), GPX4 (1:1000, clone EPNCIR144, ab125066, rabbit monoclonal, Abcam), USP5 (1:1000, clone C-11, sc-390943, mouse monoclonal, Santa Cruz biotechnology). Secondary antibodies used for Western blots: Goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP (1:3000, 170-6516, Bio-Rad), Goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP (1:3000, 170-6515, Bio-Rad).

4-hydroxytamoxifen (4OHT, Sigma) was dissolved in ethanol and added to cells at 0.1 $\mu$ M every 48h. Oxaliplatin (S1224, Selleckchem) was dissolved in dH<sub>2</sub>O, 5-Fluorouracil (S1209, Selleckchem) was dissolved in DMSO, SN-38 (S4908, Selleckchem) was dissolved in DMSO, and those drugs were added to cells at indicated concentrations to make the FOLFIRINOX combination. Camptothecin (C9911, Sigma), ABT-263 (ApexBio), ML210 (SML0521, Sigma), RSL3 (19288, Cayman Chemical), Necrostatin-1 (S8037, Selleckchem), Ferrostatin-1 (17729, Cayman Chemical), Trolox (238813, Sigma) and Z-VAD-FMK (14463, Cayman Chemical) were dissolved in DMSO. N-acetylcysteine (A9165, Sigma) was dissolved in dH<sub>2</sub>O. X-Gal was purchased from Wisent (800-145-UG) and dissolved in DMF, and Crystal violet was from Sigma (C6158). Trypan blue stain 0.4% was from Invitrogen (T10282)

The pLentiCRISPRv2 cloning vector was obtained from Addgene #52961. The pBabe- $\Delta$ RAF1-hER-puro was a gift from Dr. McMahon (University of Utah). PWZL-hygro and pWZL-HRAS-V12-hygro were described previously (Rowell *et al.* in review in *Commun. Biol.*). pWZL- $\Delta$ RAF1-

hER-hygro was subcloned from pBabe- $\Delta$ RAF1-hER-puro by amplifying the  $\Delta$ RAF1-hER sequence with primers containing restriction sites for BamHI-SnaBI. PWZL-hygro vector and the amplicon were then digested with BamHI and SnaBI (NEB) to allow insertion of the insert in the linearized vector and ligation with T4 ligase (NEB). Correct insertion was confirmed by sequencing.

#### *Cell culture and viral-mediated gene transfer*

Cell culture and provenance of Panc-1, KP-4, HPNE hTERT, HEK293T and Phoenix packaging cells, as well as retroviral and lentiviral infection procedures were previously described in Rowell *et al.* (in review in *Commun. Biol.*, 2022).

#### *CRISPR library amplification*

Libraries A and B amplification was performed according to the protocol on Addgene (#1000000048) for GeCKOv2 library amplification, by using DH5-alpha electrocompetent bacteria (NEB). Plasmid purification was performed using Invitrogen PureLink HiPure Plasmid MaxiPrep kit (K2100-07).

#### *CRISPR screening*

The design of the CRISPR screening was done based on previous publications using the GeCKOv2 library (422,451,452).

#### *Optimization of the multiplicity of infection*

Panc-1 cells were transduced with pWZL- $\Delta$ RAF1-ER-hygro, selected and amplified. The lentiviral vector pLentiCRISPRv2-sgEGFP-puro was used to optimize the multiplicity of infection at around 0.3-0.5 for the library to favor 1 vector integration per cell. MOI was determined using the formula  $P(n) = (m^n \cdot e^{-m})/n!$ , where P = % of cells infected by n copies of the plasmid, n = number of copies of the plasmid integrated by the cell (n = 1 integration for this screen); m = multiplicity of infection.

$1.25 \times 10^5$  Panc-1 RAF-ER cells were seeded in 6-wells plates representing the same density at which they would be for library infection in 15 cm dishes, and were transduced once for 24h with

various dilutions of the viral soup from a full soup (1X, 1.5 mL) to 1/25 soup (0.04X, 60 $\mu$ L viral soup in 1.5 mL) from a 9-mL soup obtained from a 10cm dish of transfected HEK293T. Wells with virus-free media were also used for killing control following selection (0% infection). Additional wells (MOI controls) without infection or selection were plated with different number of cells to represent different target MOIs relative to the  $1.25 \times 10^5$  cells plated initially (ex:  $3.7875 \times 10^4$  cells mimicking a MOI of 0.5). After a 3-day complete selection with puromycin (except on the MOI controls wells), remaining cells were fixed and stained with crystal violet. The best soup dilution was determined by comparing the conditions having the same OD at 590 (meaning similar number of cells remaining) as the MOI controls wells of 0.3-0.5. It was determined that 1/9 (0,11X) of viral soup was reproducibly sufficient to produce a MOI between 0.3-0.5.

#### *Library transfection, infection, and selection*

HEK293T cells from the same passage (passage 19), and reagents from the same lot/batch as the MOI test were used. Transfections were done on  $\sim 32 \times 10$ cm dishes of HEK293T and were performed as described in Rowell *et al.* (in review in *Commun. Biol.*, 2022), by using the calcium phosphate method and 3 $\mu$ g of the CRISPR-Cas9 GeCKOv2 library (1.5  $\mu$ g of library A and 1.5  $\mu$ g of library B), with 2 $\mu$ g of pCMV-dR.91 vector and 1 $\mu$ g of pCMV-VSV-G vector. The day after HEK293T transfection,  $2.036 \times 10^9$  Panc-1 RAF-ER cells were seeded at  $2 \times 10^6$  cells per 15 cm dishes, for a total of 500 representativity of each of the 123 411 sgRNAs of the library (A+B) aiming for an infection efficiency of 30.3% (MOI of 0.5). The following day, Panc-1 RAF-ER cells were transduced once for 24h using 2.66 mL of viral soup in  $\sim 18$ mL of media containing polybrene, and the correct MOI was confirmed with the same method as previously described. After 24h of infection, media was changed and puromycin selection was added 6h after. Selection was performed during 3 days until the killing control (no transduction) was completely dead.

Cell confluence was avoided to ensure no cells would detach and lead to sgRNAs loss. At each passage, cells were detached using trypsin, pooled altogether then counted and replated while maintaining the minimum number of cells required for the 500-fold representativity of each guide ( $> 6,17 \times 10^7$  cells). After two weeks, to allow for lethal sgRNAs to be removed from the cell population, a first population of cells was harvested to determine the sgRNAs present in the initial population. To do so, twice the minimum number of cells required to maintain representativity (to

allow for loss of material in the following steps of gDNA isolation, etc.) were detached using trypsin, neutralized with media, then counted. Then cells were rinsed twice with PBS and pelleted in 2 x 21 microcentrifuge tubes containing  $\sim 3 \times 10^6$  cells. Pellets were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at  $-80^\circ\text{C}$ .

Remaining Panc-1 RAF-ER cells in culture were then plated again and the following day, were treated for 3 days with 4OHT to activate the RAF-MEK-ERK pathway and induce senescence. After 3 days, again twice the minimum number of cells required to maintain representativity were harvested, pelleted and frozen as previously described.

#### *Isolation of genomic DNA (gDNA)*

The protocol used for gDNA isolation was modified from the Sambrook's manual (Molecular cloning). Cells pellets were thawed and incubated in 1mL of SNET buffer (1% SDS w/v, 400 mM NaCl, 5mM EDTA pH 8.0, 20 mM Tris-HCl pH 8.0) with 0.2mg/mL RNase A for 1 hour at  $37^\circ\text{C}$ . Then Proteinase K was added at  $400\mu\text{g/mL}$  and tubes were incubated overnight at  $55^\circ\text{C}$  with agitation. The following day, each sample was split between two tubes and an equal volume of 1:1:1 Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol was added. Samples were incubated on a rocker for 30 min at room temperature, then samples were centrifuged at  $16\,000 \times g$  for 5 min, and the top aqueous phase was carefully collected. DNA was precipitated by adding an equal volume of isopropanol and mixing thoroughly before being centrifuged at Vmax for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . The pellet was rinsed with ethanol 70% and air dried. Genomic DNA from each tube was resuspended in  $\sim 200\ \mu\text{L}$  of TE0.1X (1mM Tris-Base, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) through 3 cycles of snap-freezing in liquid nitrogen and thawing at  $55^\circ\text{C}$ . Then, samples were kept at  $-80^\circ\text{C}$ . 500 ng of gDNA were run on a 0.8% agarose gel in TAE1X buffer and detected using RedSafe (Froggabio) to verify integrity and absence of RNA contamination before proceeding to next steps.

#### *PCR on genomic DNA and next-generation sequencing*

The gDNA concentrations were quantitated by UV Spectroscopy (Nanodrop). PCRs were then performed on sufficient gDNA to account for 500 representations of the 123 411 sgRNAs assuming that the cells were  $\sim$ triploids (3.3 pg of gDNA per cell with haploid genome, meaning 9.9 pg per cell), meaning  $\sim 611\mu\text{g}$  of gDNA per condition. For PCR amplification, gDNA was divided into

100  $\mu$ L reactions such that each well had 6.37 $\mu$ g of gDNA. Per 96 well plate, a master mix consisted of 20  $\mu$ L Herculase II Buffer 5X (Agilent Technologies), 1  $\mu$ L of 10x Herculase II DNA Polymerase, 1  $\mu$ L of dNTP (25 mM each) provided with the enzyme, 8  $\mu$ L F/R primer with Nextera overhang mix (stock at 10  $\mu$ M concentration), and 48  $\mu$ L water per reaction. PCR cycling conditions were determined to stay in the linear range of amplification: an initial 3 min at 95 °C; followed by 20 s at 95 °C, 20 s at 60 °C, 30 s at 72 °C, for 20 cycles; and a final 3 min extension at 72 °C. PCR1 band size is 196bp.

After PCR1, all wells were pooled (9600  $\mu$ l) and 1/20th of PCR1 was used as template (480  $\mu$ l) for PCR2 with Nextera oligos (Illumina). PCR1 product (480  $\mu$ l) was column purified using the ZymoSpin (C1003-50, Zymo Research) and resuspended in 480  $\mu$ l of 10 mM Tris Hcl pH7. Column-purified PCR1 product was divided into 13 reactions of 100  $\mu$ l total, each containing 37  $\mu$ l of purified PCR1 product. Per well, a master mix consisted of 20  $\mu$ L Herculase II Buffer 5X (Agilent Technologies, kit # 600679), 1  $\mu$ L of 10x Herculase II DNA Polymerase, 1  $\mu$ L of dNTP (25 mM each) provided with the enzyme, 8  $\mu$ L Nextera oligos with different barcodes (used to multiplex the two conditions), and 33  $\mu$ L water per reaction. PCR cycling conditions: an initial 3 min at 98 °C; followed by 20 s at 98 °C, 20 s at 55 °C, 30 s at 72 °C, for 8 cycles; and a final 3 min extension at 72 °C. PCR products were purified with Agencourt AMPure XP SPRI beads according to manufacturer's instructions (Beckman Coulter, A63880) and resuspended in 20  $\mu$ l. PCR2 band size is 265bp. Samples were sequenced on a Nextseq HighOutput 75 cycles (Illumina), loaded with a 1% spike-in of PhiX DNA, using 24 dark cycles to hide the constant region in front of the sgRNA.

### *Bioinformatics analyses*

Sequences were trimmed to 20bp and aligned to the reference GeCKOv2 library database, part A+B, using Bowtie version 2.3.3.1 (453). Quantification of each guide RNA was computed directly from the alignment using CRISPRAnalyzeR version 1.5 to yield the following raw counts file (454). Counts were then normalized with regard to each sample sequencing size by converting to counts per million reads and transforming into log<sub>2</sub> values. In order to analyze sample differences, normalized counts were compared between samples for each targeted gene. Both a Student's t-test and Mann-Whitney test were performed to estimate the significance of the difference in distribution of sgRNA from each sample for each gene. False discovery rate was also

estimated for both tests using the Benjamini & Hochberg adjustment method for multiple comparisons.

In addition to directly comparing sgRNA distributions for each gene between samples, fold changes for each sgRNA were also computed independently in order to estimate if the distribution of these fold changes for each gene is significantly different than the distribution for non-targeting guides. Again, both a Student's t-test and a Mann-Whitney, corrected for large measurements were performed.

#### *Pathway analysis by Gene Set enrichment analysis (GSEA)*

For Gene set enrichment analysis (GSEA), all reads (counts per million) for the different sgRNAs of a same gene were summed. Both conditions were compared in GSEA version 4.0.3 (375,455) using the following parameters: 1000 permutations, no collapse, permutation type: gene\_set. Sets larger than 500 and smaller than 15 were excluded. Genes' implication in the various steps of ribosome biogenesis was determined based on current literature and annotation in human or by homology with yeast proteins using the homology tool from the website yeastgenome.org.

#### *Design and cloning of sgRNAs used to validate screen targets*

Sequence of the sgEGFP used as a control was previously published (422). The sequences for sgGPX4 and sgUSP5 were taken from the GeCKOv2 library, sgGPX4-1, HGLibA\_21179; sgGPX4-2, HGLibB\_21152; sgGPX4-3, HGLibB\_21150; sgUSP5-1, HGLibB\_54323; sgUSP5-2, HGLibB\_54322; sgUSP5-3, HGLibA\_61677, and confirmed to have high predicted efficiency and no off-target activity using the genome-engineering.org platform from the Zhang lab (MIT). Sequences are given in italic in Table 3 with primer overhangs to fit in the pLentiCRISPRv2 vector BsmBI restriction site. Cloning was performed following the Zhang lab cloning protocol available on the Addgene page for product #52961 but using BsmBI enzyme from NEB (R0580) and NEB buffer 3.1 (B7203).

#### *Limiting dilutions and clonal expansion*

KP-4 cells transduced with sgEGFP or the different sgGPX4 were seeded in a 96-well plate at the confluence of 0.8 cell/well. After 24h, only the wells with 1 cell/well were considered for

expansion. They were monitored for growth and expanded for 10-14 days. Reaching the confluence in the well, cells were expanded to a 48-well plate. The same criteria were used to continue the expansion in 24 well-plate, 12 well-plate, 6 well-plate until a 10 cm plate. Therefore, a clonal population was obtained for validation.

#### *Western blots*

Proteins harvesting and western blotting were done as previously described in Rowell *et al.* (in review in *Commun. Biol.*, 2022) with only modifications being the use of TBS-T (TBS1X, 0.05% Tween20) containing 5% milk for blocking membranes and the use of TBS-T for washing membranes. For western blots in the FOLFIRINOX model, floating cells were also recovered for protein extracts.

#### *RT-qPCR*

RNA isolation, reverse transcription and qPCR procedures were performed as previously described in Rowell *et al.* (in review in *Commun. Biol.*, 2022). Sequences of primers used are described in Table 3.

#### *Growth assays, IC50 dose-response and cell death assays*

Growth curves were done as previously described in Rowell *et al.* (in review in *Commun. Biol.*, 2022). For dose-response assays in RAF-ER model,  $6 \times 10^2$  KP-4 cells expressing RAF-ER were seeded in 96 well plates with 4 technical replicates and after 24h, media was replaced with media containing ethanol or 4OHT and different doses of ML210 or DMSO. Media change and treatment was repeated at day 3, and cells were fixed and stained at day 6 using the crystal violet protocol as in growth assays. For dose-response assays in FOLFIRINOX model,  $10^3$  Panc-1 cells or  $10^3$  KP-4 cells were pre-treated for 4 days with DMSO or FOLFIRINOX. Then they were seeded in 96 well plates in triplicate and after 24h they were treated with different doses of ML210 or DMSO for 3 days. Fixation and staining were performed as described before.

For Trypan blue assay, cells were seeded in 6 cm plates in triplicates. At indicated time points following treatments, floating cells were recovered by centrifugation and attached cells were



detached using trypsin 0.5X. Total cell suspension was mixed with 0.4% trypan blue (1:1). Cells were counted using a hemocytometer on a light microscope.

#### *Senescence-associated $\beta$ -Gal staining*

Senescence-associated  $\beta$ -Gal staining was done as previously described in Rowell *et al.* (in review in *Commun. Biol.*, 2022).

#### *Statistical analyses and data reproducibility*

To determine statistical significance, Student t-test was performed using either GraphPad version 9.3.1 or 6, or for ANOVA with Tukey HSD tests, those were performed using the website [astatsa.com](http://astatsa.com). Difference between conditions were considered statistically significant at (\*)  $P < 0.05$ , (\*\*)  $P < 0.01$ , (\*\*\*)  $P < 0.001$ , (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$ . For all panels, one representative replicate is shown, and the n value determines the number of independent biological replicates performed. For qPCR, SA- $\beta$ -Gal assays, growth curves, cell death assays and IC50, between 3 and 4 technical replicates were also performed on which statistics are shown.

### **4.3.6. Competing interest statement**

The authors declare no competing interest.

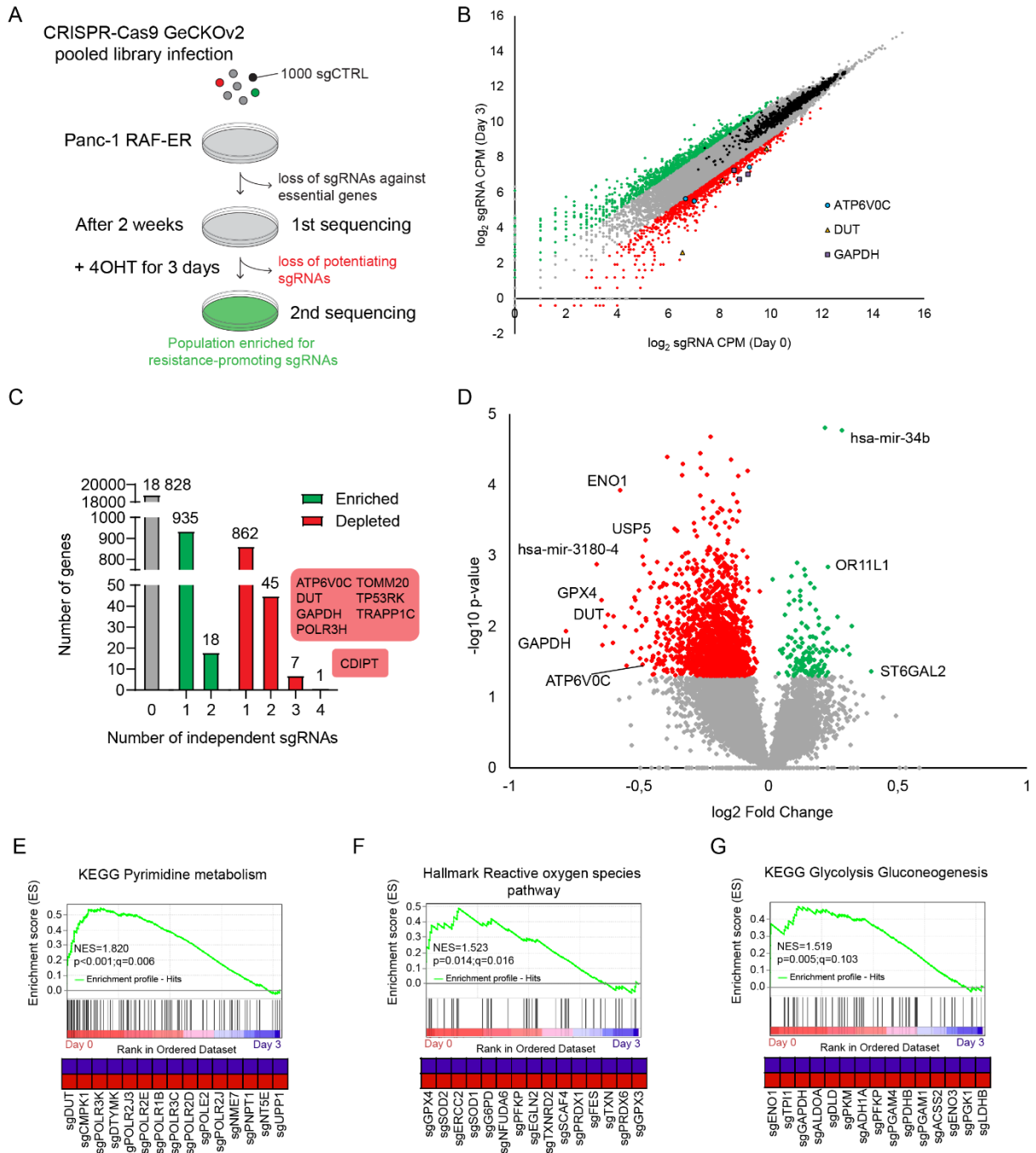
### **4.3.7. Acknowledgements**

We thank Drs P.J. Paddison (Seattle), M. Ouellette, N. Bardeesy, M. McMahon, R. Weinberg, G. Nolan and S.W. Lowe for reagents. For the NGS sequencing, we thank Jennifer Huber and the Genomic platform at IRIC (Institute for Research on Immunology and Cancer). For bioinformatics analyses, we thank Patrick Gendron (IRIC). This work was supported by FRQS (Fonds de recherche Québec - Santé) fellowships to M.C. Rowell, P. Kalegari and S. Lopes-Paciencia. We thank the Montreal Cancer Institute's Canderel funds and the Pierre-Saul Funds for pancreatic cancer research for financial support. G. Ferbeyre is supported by the Joint Canada-Israel Research Program of IDRC, CIHR PJT-153217 and the CIBC chair for breast cancer research.

*Author contributions:* M.C.R. and G.F. designed the CRISPR screen. M.C.R. and S.L.P. co-performed the screen. M.C.R. analysed the results. P.K., M.C.R. and J.G. validated targets from

the screen. P.K. performed all experiments related to GPX4 and characterized the ferroptosis phenotype. E.S.G., L.M. and V.B. helped in the isolation of genomic DNA. S.L.P. subcloned the  $\Delta$ RAF1-ER in pWZL-hygro. M.C.R. cloned the sgGPX4s and sgEGFP, P.K. cloned the sgUSP5. J.G. helped in the design of experiments for therapy-induced senescence. M.C.R. and P.K. prepared the figures and legends. M.C.R. wrote the manuscript. G.F. and P.K. revised the manuscript.

### 4.3.8. Main figures and legends



**Figure 4.1. A whole-genome CRISPR-Cas9 screen identifies vulnerabilities of senescent pancreatic cancer cells.**

(A) Outline of the CRISPR-Cas9 screen performed in Panc-1 cells expressing  $\Delta$ RAF1-ER<sup>T</sup> (RAF-ER) and using the GeCKOv2 pooled CRISPR libraries. (B) Scatter plot showing log<sub>2</sub> normalized library sgRNA read counts comparing day 3 to day 0, CPM, counts per million. Each dot represents a specific sgRNA. Green dots represent significantly overrepresented sgRNAs following 4OHT addition ( $\log_2FC > 1$ ), whereas red dots represent significant drop-outs from cell population ( $\log_2FC < -1$ ). Black dots show all 1000 sgCTRL and grey dots all insignificant sgRNAs. (C) Number of genes with indicated number of significantly enriched ( $\log_2FC > 1$ ) or depleted ( $\log_2FC < -1$ ) sgRNAs. Genes for which 3 or 4 sgRNAs are significantly depleted are depicted in the red box. (D) Volcano plot showing genes for which the mean change in sgRNAs representation was significant with  $p < 0.05$  between day 0 and day 3. Drop-outs are shown in red whereas significantly enriched sgRNAs are shown in green. (E-G) Gene set enrichment analysis showing some significantly depleted pathway signatures at day 3.

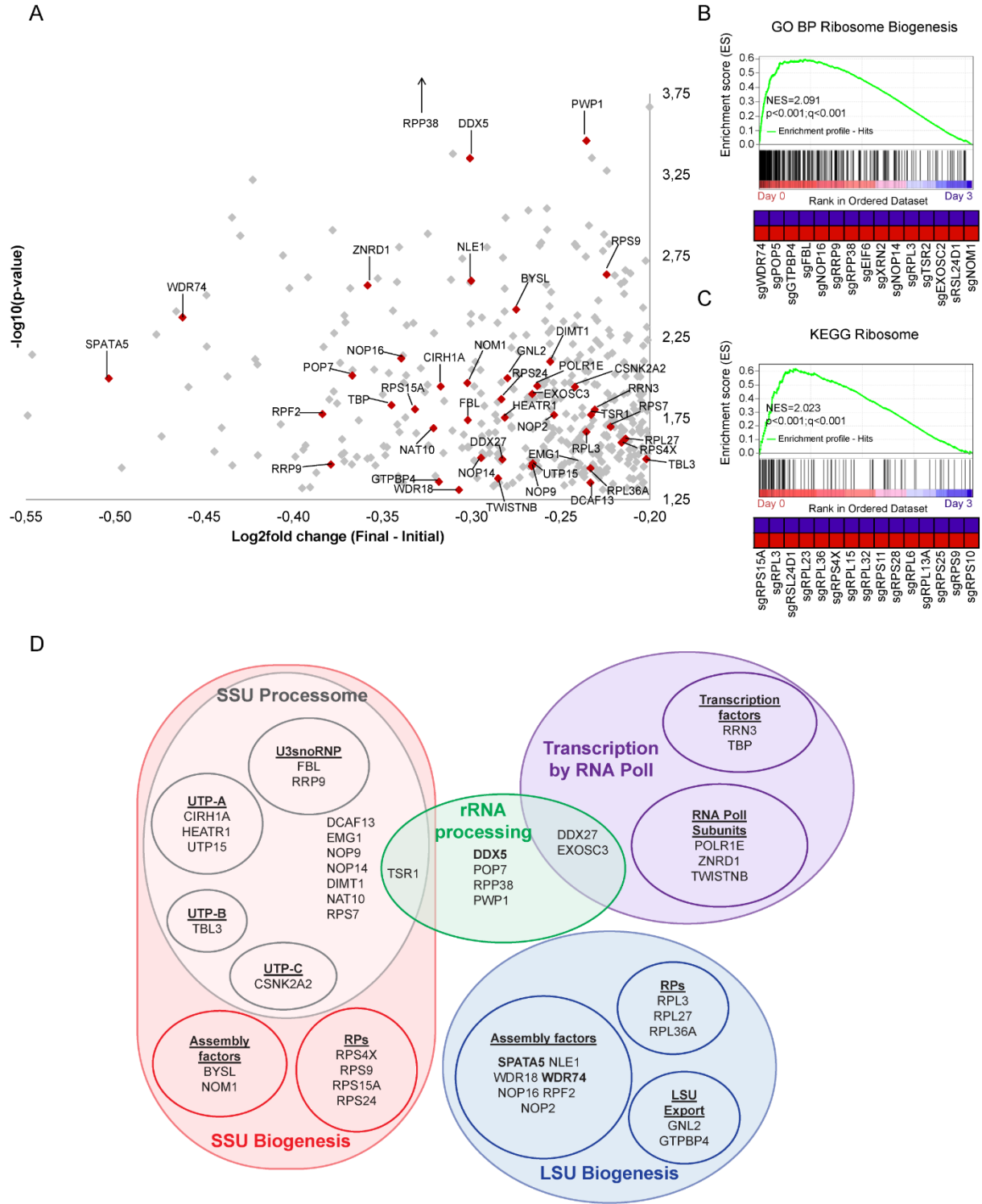
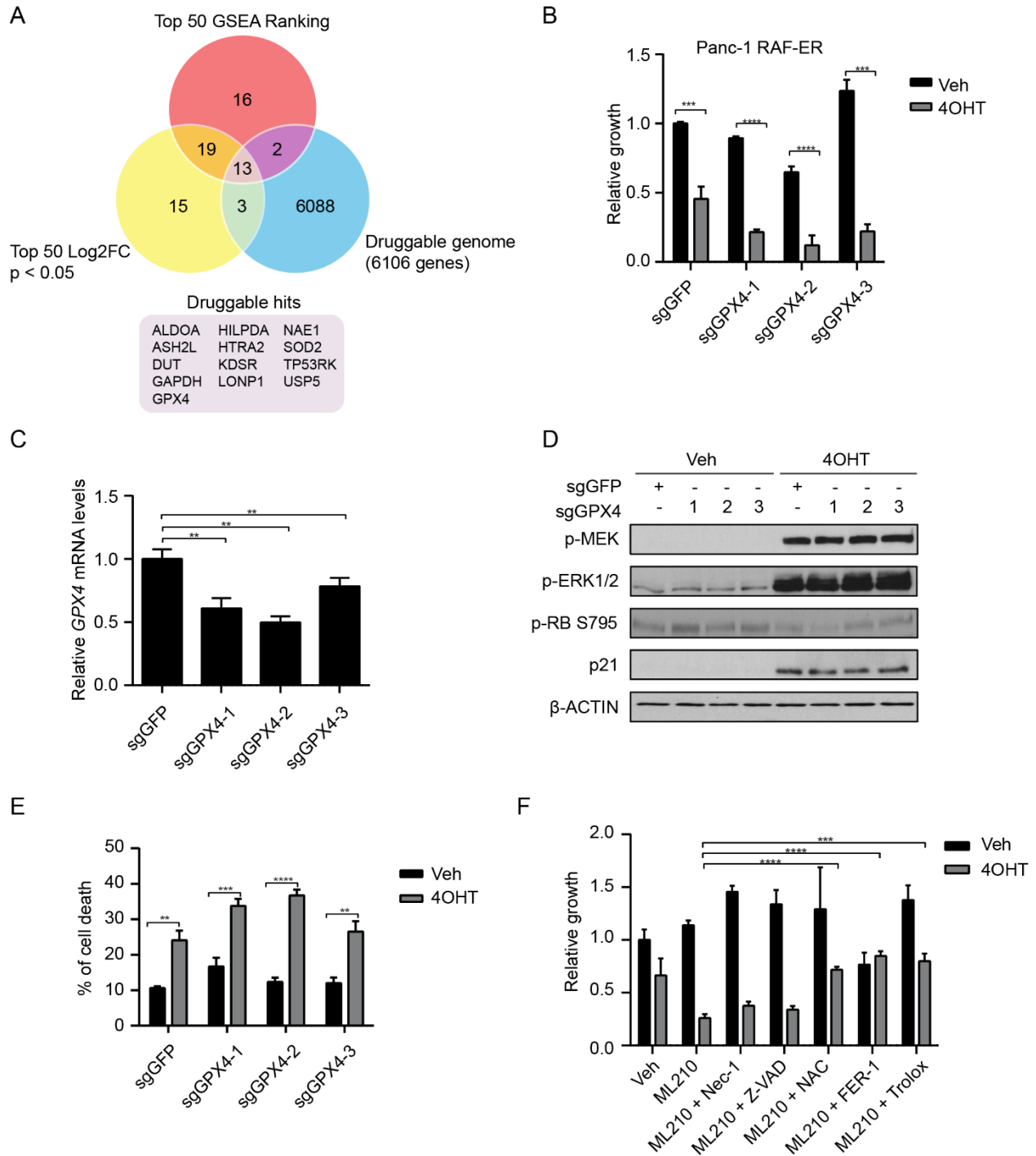


Figure 4.2. Pathways analysis reveal multiple targets of interest in ribosome biogenesis.

(A) Alternative representation of the Volcano Plot from Figure 1D highlighting in red some significantly depleted sgRNAs at day 3 that target ribosome biogenesis factors or ribosomal subunits. (B-C) Gene set enrichment analysis showing signatures of ribosome biogenesis (B) or ribosome (C) among depleted sgRNAs following RAF activation. (D) Schema representing the implication of all genes highlighted in A in the different steps of ribosome biogenesis, based on literature review in mammalian cells or by homology with yeast genes.

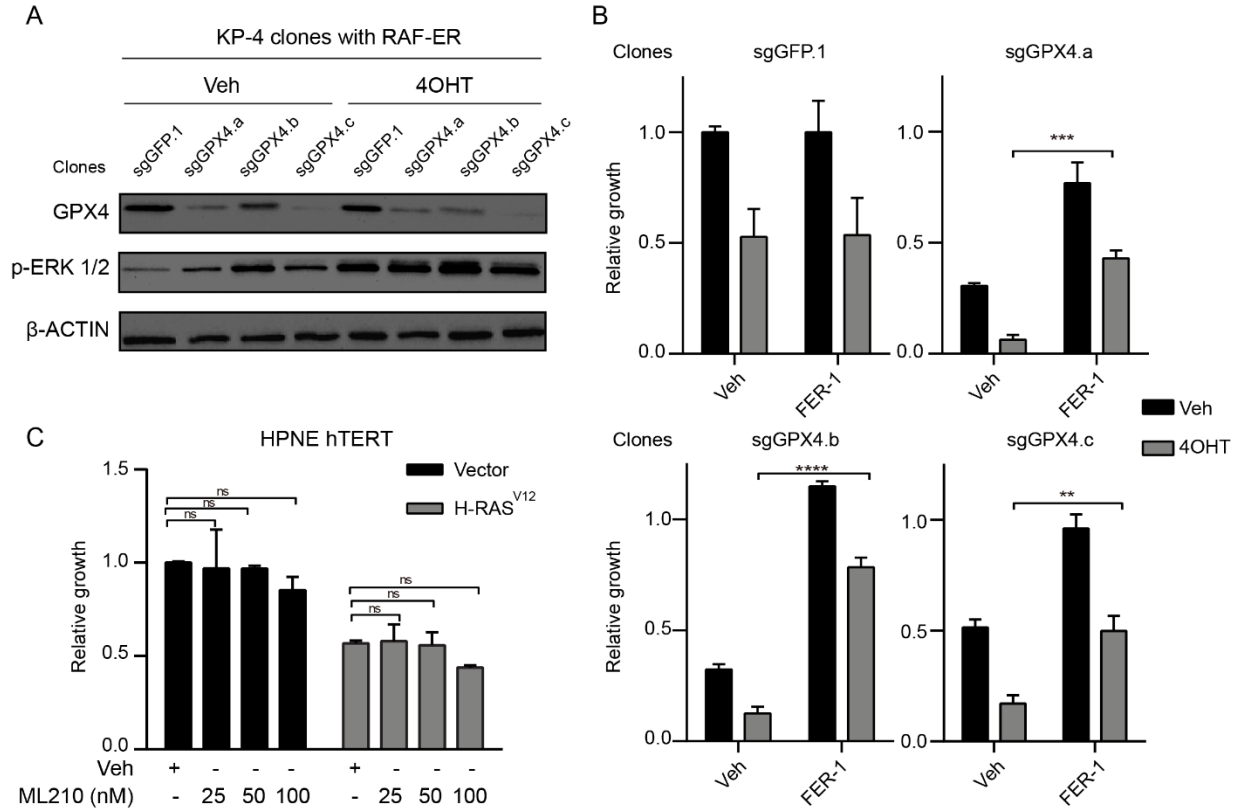


**Figure 4.3. CRISPR-mediated inactivation of GPX4 potentiates the response to RAF-induced senescence by promoting ferroptosis.**

(A) Venn diagram showing overlap between the top 50 hits by GSEA ranking, the top 50 hits based on significance and log2FC and the druggable genome database. Genes that met all three criteria are listed in the grey box. (B) Relative

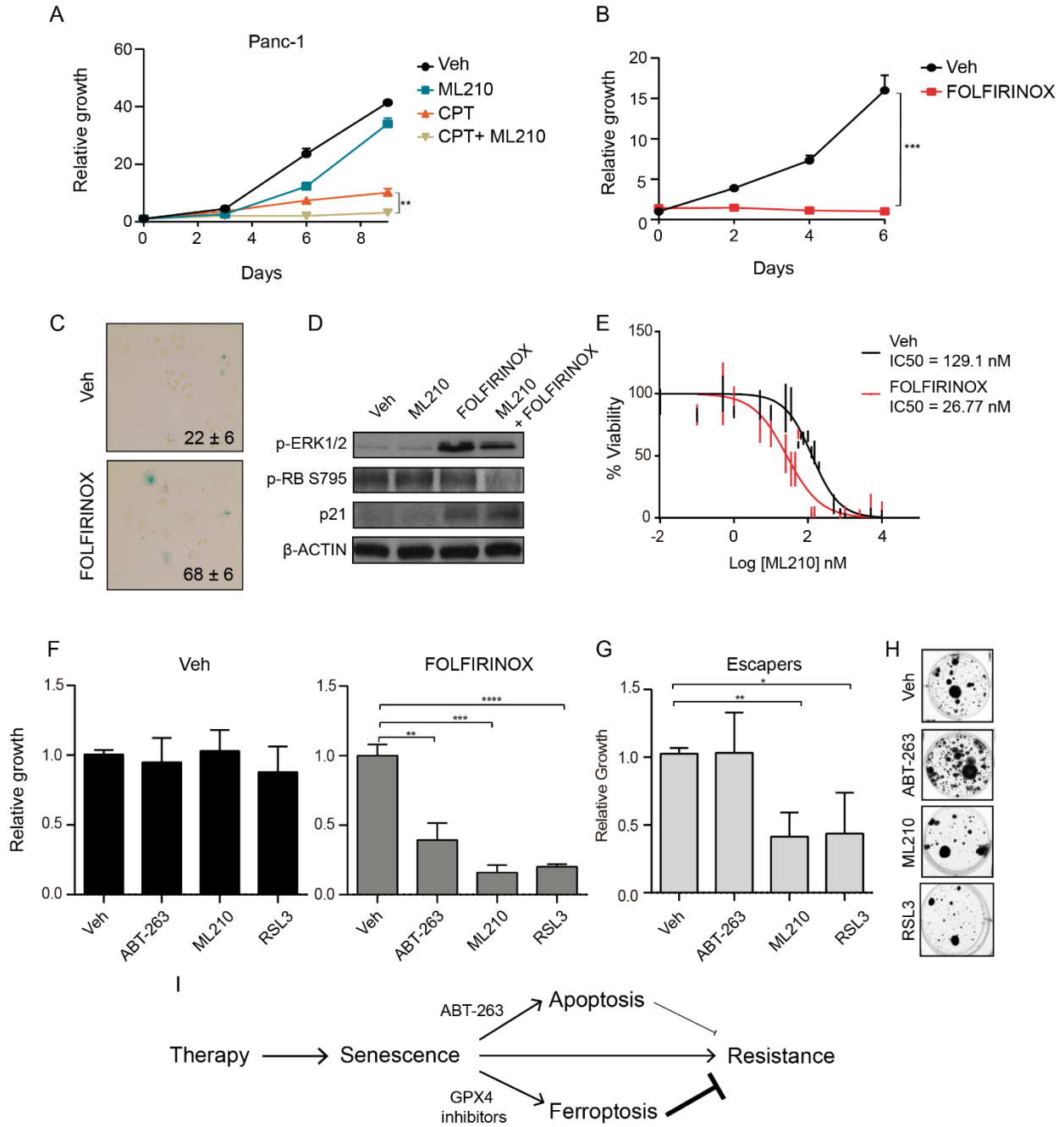
growth by crystal violet staining of Panc-1 cells expressing RAF-ER and one of the three independent sgRNAs against GPX4 (sgGPX4-1, sgGPX4-2, sgGPX4-3) compared to sgGFP, 48h following addition of 4-hydroxytamoxifen (0.1 $\mu$ M) or vehicle (EtOH). Data represent the mean fold-change of OD at 590nm from triplicates  $\pm$  SD, two-tailed Student's t-test. n = 3. (C) Relative mRNA levels of *GPX4* in vehicle-treated cells from B. Each bar represents the mean fold-change ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) compared to sgGFP condition from three replicates  $\pm$  SD. One-way ANOVA with Tukey HSD. n = 2. (D) Immunoblots for indicated proteins in cells as in B. p-MEK, MEK1/2 phosphorylated on serines 217/221; p-ERK1/2, ERK 1 (p44, upper band) and 2 (p42, lower band) phosphorylated on threonine 202 and tyrosine 204, p-RB S795, Retinoblastoma protein phosphorylated on serine 795. n = 2 (E) Percentage of cell death by trypan blue staining on cells as in B. Data represent mean percentage from triplicates  $\pm$  SD, two-tailed Student t-test, n = 2 (F) Relative growth of Panc-1 cells expressing RAF-ER and treated every 48h with 4OHT or vehicle and the following doses of indicated treatments, ML210 50nM, Necrostatin-1 (Nec-1) 10mM, Z-VAD-FMK (Z-VAD) 50mM, Ferrostatin-1 (FER-1) 1 $\mu$ M, N-acetylcysteine (NAC) 1mM, Trolox 100mM, or vehicle (DMSO). Data show mean fold-change of OD at 590nm relative to double vehicle-treated cells at day 6  $\pm$  SD, two-tailed Student's t-test, n = 2. For panels B-C, E-F, (\*\*) P < 0.01, (\*\*\*) P < 0.001, (\*\*\*\*) P < 0.0001. See also Figure 4.6 and Figure 4.7.





**Figure 4.4. Partial deletion of GPX4 in clones promotes death by ferroptosis in senescent pancreatic cancer cells.**

(A) Immunoblots showing protein levels of GPX4 in clones generated by limiting dilution from KP-4 cells expressing either the sgGFP (clone sgGFP.1), the sgGPX4-2 (clone sgGPX4.a) or the sgGPX4-3 (clones sgGPX4.b and sgGPX4.c) after infection of the clones with RAF-ER and a 48h-treatment with 4OHT or vehicle.  $n = 2$  (B) Relative growth of clones from A following 48h of treatment with 4OHT or vehicle (EtOH) and Ferrostatin-1  $1\mu\text{M}$  (FER-1) or vehicle (DMSO). Data represent the mean fold-change of OD at 590 nm relative to double vehicle-treated cells, from triplicates  $\pm$  SD. (\*\*\*)  $P < 0.001$ , (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$ , two-tailed Student's t-test,  $n = 2$ . (C) Relative growth of human pancreatic normal epithelial (HPNE) cells immortalized with hTERT treated for 6 days with indicated doses of ML210 until day 12 post-infection. Data represent mean fold-change of OD at 590nm relative to vehicle-treated cells from triplicates  $\pm$  SD.  $n = 1$



**Figure 4.5. GPX4 inhibition promotes senescence in FOLFIRINOX-induced senescence and prevents resistance.**

(A) Growth curve of Panc-1 cells over 9 days with indicated treatments, Veh (DMSO), ML210 50nM and/or Camptothecin 25 nM. Data represent mean fold-change of OD at 590nm relative to day 0, ± SD, statistics done using two-tailed Student's t-test, n = 3. (B) Growth curve of Panc-1 cells treated with FOLFIRINOX (10µM 5-Fluorouracil, 25nM SN-38, 5µM Oxaliplatin) or vehicles over 6 days. Data represent mean ratio of OD at 590nm over day 0, from triplicates ± SD, statistics done using two-tailed Student's t-test, n = 3. (C) Senescence-associated-β-Gal staining of

cells as in *B* after 4 days of treatment with FOLFIRINOX or vehicle. Data in the bottom right corner represent mean percentage from three 100-cell counts  $\pm$  SD. (\*\*)  $P < 0.01$  compared to vehicle, two-tailed Student's t-test.  $n = 3$  (*D*) Immunoblots of indicated proteins in Panc-1 cells treated for 4 days with FOLFIRINOX or DMSO, and then treated for 48h with ML210 50nM or Vehicle. p-ERK1/2, ERK 1 (p44, upper band) and 2 (p42, lower band) phosphorylated on threonine 202 and tyrosine 204, p-RB S795, Retinoblastoma protein phosphorylated on serine 795.  $n = 2$  (*E*) Dose-response curve of Panc-1 cells pre-treated for 4 days with FOLFIRINOX or vehicle, then treated with various concentrations of ML210 over 3 days. Data represent the mean percentage of viability from 3 replicates  $\pm$  SD. ML210's IC50 values are indicated.  $n = 3$ . (*F*) Relative growth of Panc-1 cells pre-treated for 4 days with FOLFIRINOX or Vehicle, then treated with indicated drugs, ABT-263 2.5 $\mu$ M, ML210 50nM or RSL3 10nM or corresponding vehicle. Data represent mean OD at 590nm relative to vehicle-treated cells from three replicates  $\pm$  SD, two-tailed Student's t-test,  $n = 3$  (*G*) Relative growth of cells that emerged 21 days following treatment (ABT-263, ML210 or RSL3) withdrawal from FOLFIRINOX-treated cells in *F*. Data represent mean of triplicates  $\pm$  SD, two-tailed Student's t-test.  $n = 3$  (*H*) Representative images of clones from *G* that emerged after treatment withdrawal. (*I*) Model depicting the one-two punch strategy based on ferroptosis induction by GPX4 inhibition that could be of interest in pancreatic cancer. For panels *A-B* and *F-G*, (\*)  $P < 0.05$ , (\*\*)  $P < 0.01$ , (\*\*\*)  $P < 0.001$ , (\*\*\*\*)  $P < 0.0001$ . See also Figure 4.8.

### **4.3.9. Supplemental material**

#### **4.3.9.1. List of Supplemental Material**

Supplemental Table 3.1

Supplemental Figure 4.6, related to Figure 4.3

Supplemental Figure 4.7, related to Figure 4.3

Supplemental Figure 4.8, related to Figure 4.5

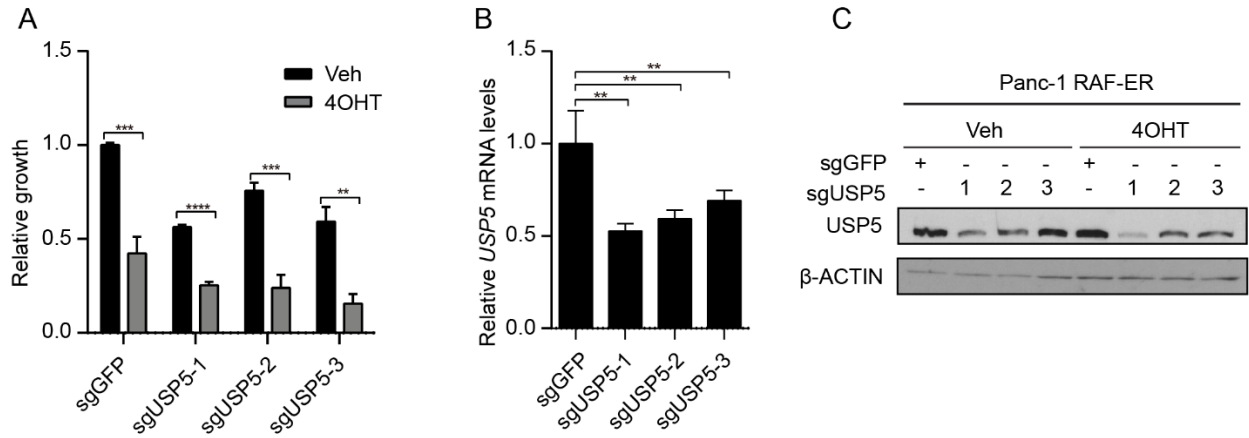
**Table 3.1. Primers sequences for cloning, next-generation sequencing, and qPCR.**

Primer name	Primer sequence
ΔRAF1-hER to pWZL BamHI forward primer	5'-CGCGGATCCACCATGGAGTACTCACAGCCGA-3'
ΔRAF1-hER to pWZL SnaBI reverse primer	5'-CGCTACGTACTCTCAGACTGTGGCAGGGAAAC-3'
sgGPX4-1 cloning primer forward	5'-CACCG CGTGTGCATCGTCACCAACG-3'
sgGPX4-1 cloning primer reverse	5'-AAAC CGTTGGTGACGATGCACACG C-3'
sgGPX4-2 cloning primer forward	5'-CACCG GAATTTGACGTTGTAGCCCG-3'
sgGPX4-2 cloning primer reverse	5'-AAAC CGGGCTACAACGTCAAATTC C-3'
sgGPX4-3 cloning primer forward	5'-CACCG GCGCCCACCGTACTTGTCC-3'
sgGPX4-3 cloning primer reverse	5'-AAAC GGACAAGTACCGGTGGGCGC C-3'
sgEGFP cloning primer forward	5'-CACCG GGGCGAGGAGCTGTTACCG-3'
sgEGFP cloning primer reverse	5'-AAAC CGGTGAACAGCTCCTCGCC C-3'
sgUSP5-1 cloning primer forward	5'-CACCG GAAGAAGCGGCAAGCCGAAG -3'
sgUSP5-1 cloning primer reverse	5'-AAAC CTTCGGCTTGCCGTTCTTC C-3'
sgUSP5-2 cloning primer forward	5'-CACCG GTGCAAGTAGACTCGCTGGC -3'
sgUSP5-2 cloning primer reverse	5'-AAAC GCCAGCGAGTCTACTTGCAC C-3'
sgUSP5-3 cloning primer forward	5'-CACCG CTCACCAATAGCCAGCCGCG -3'
sgUSP5-3 cloning primer reverse	5'-AAAC CGCGGCTGGCTATTGGTGAG C-3'
PCR1 Forward primer ( <i>GeCKOv2-specific</i> with Nextera Illumina overhang)	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCTTGTGGAAAGG ACGAAACACCG-3'
PCR1 Reverse primer ( <i>GeCKOv2-specific</i> with Nextera Illumina overhang)	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCGACTCGGTGC CACTTTTCAA-3'
PCR2 Forward primer (Nextera adapter)	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC-3'
PCR2 Reverse primer (Nextera adapter)	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG-3'
qPCR primer <i>GPX4</i> Hs* forward	5'-ATCCTGGGAAATGCCATCAAGT-3'
qPCR primer <i>GPX4</i> Hs reverse	5'-TGGGGCAGGTCCTTCTCTATCA-3'
qPCR primer <i>USP5</i> Hs forward	5'-ACATGGGCACCTCTACCATGTG-3'
qPCR primer <i>USP5</i> Hs reverse	5'-TCTCGGAGGCACACACTTTCTG-3'
†qPCR primer <i>HMBS</i> Hs forward	5'-GGCAATGCGGCTGCAA-3'
†qPCR primer <i>HMBS</i> Hs reverse	5'-GGGTACCCACGCGAATCAC-3'
†qPCR primer <i>TBP</i> Hs forward	5'-GCTGGCCCATAGTGATCTTTGC-3'
†qPCR primer <i>TBP</i> Hs reverse	5'-CTTCACACGCCAAGAAACAGTGA-3'

\*Hs, *Homo sapiens*.

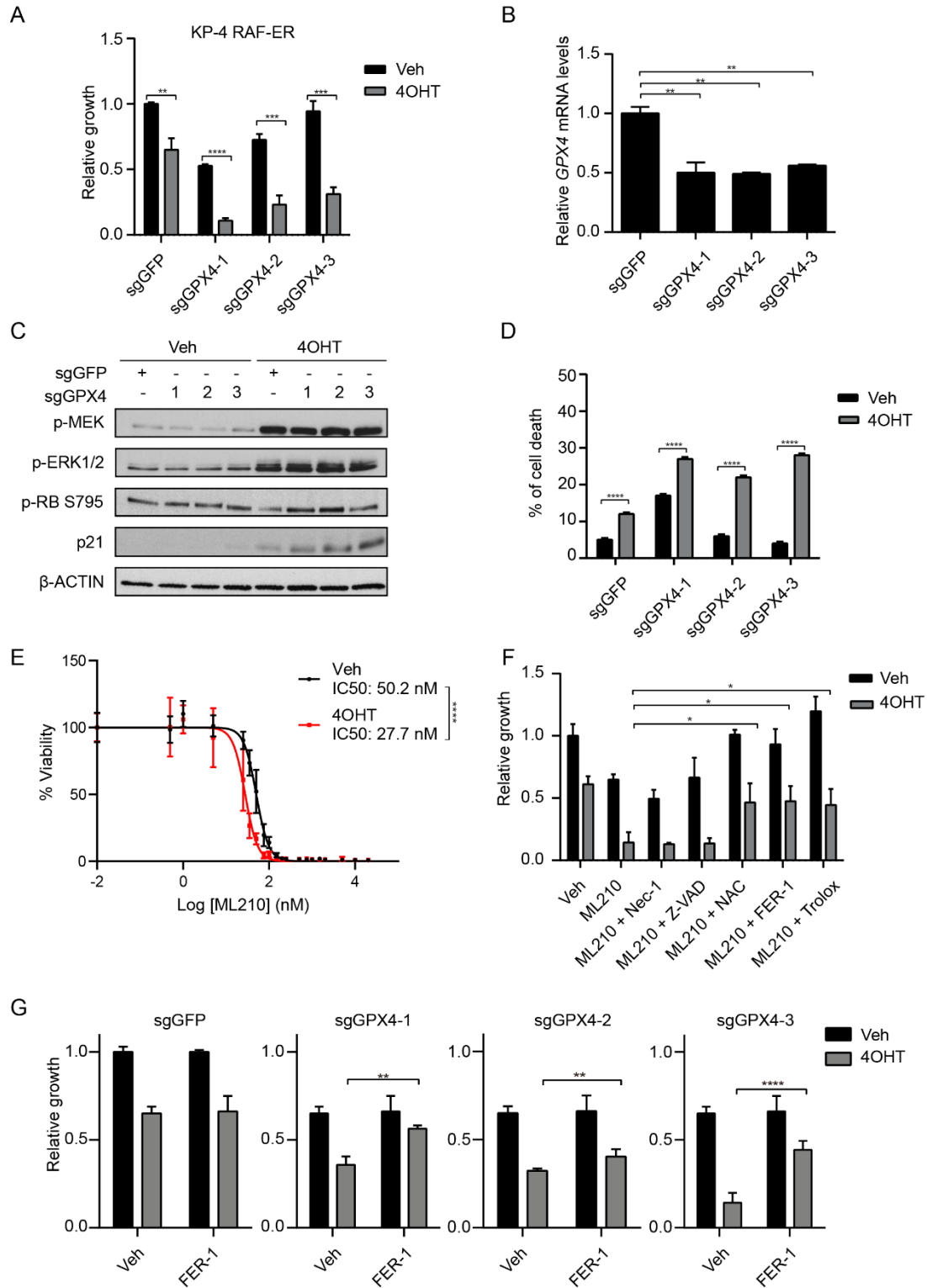
†Housekeeping gene.

### 4.3.9.2. Supplemental figures and legends



**Figure 4.6. (Fig. S1) USP5 validation following CRISPR-Cas9 screening.**

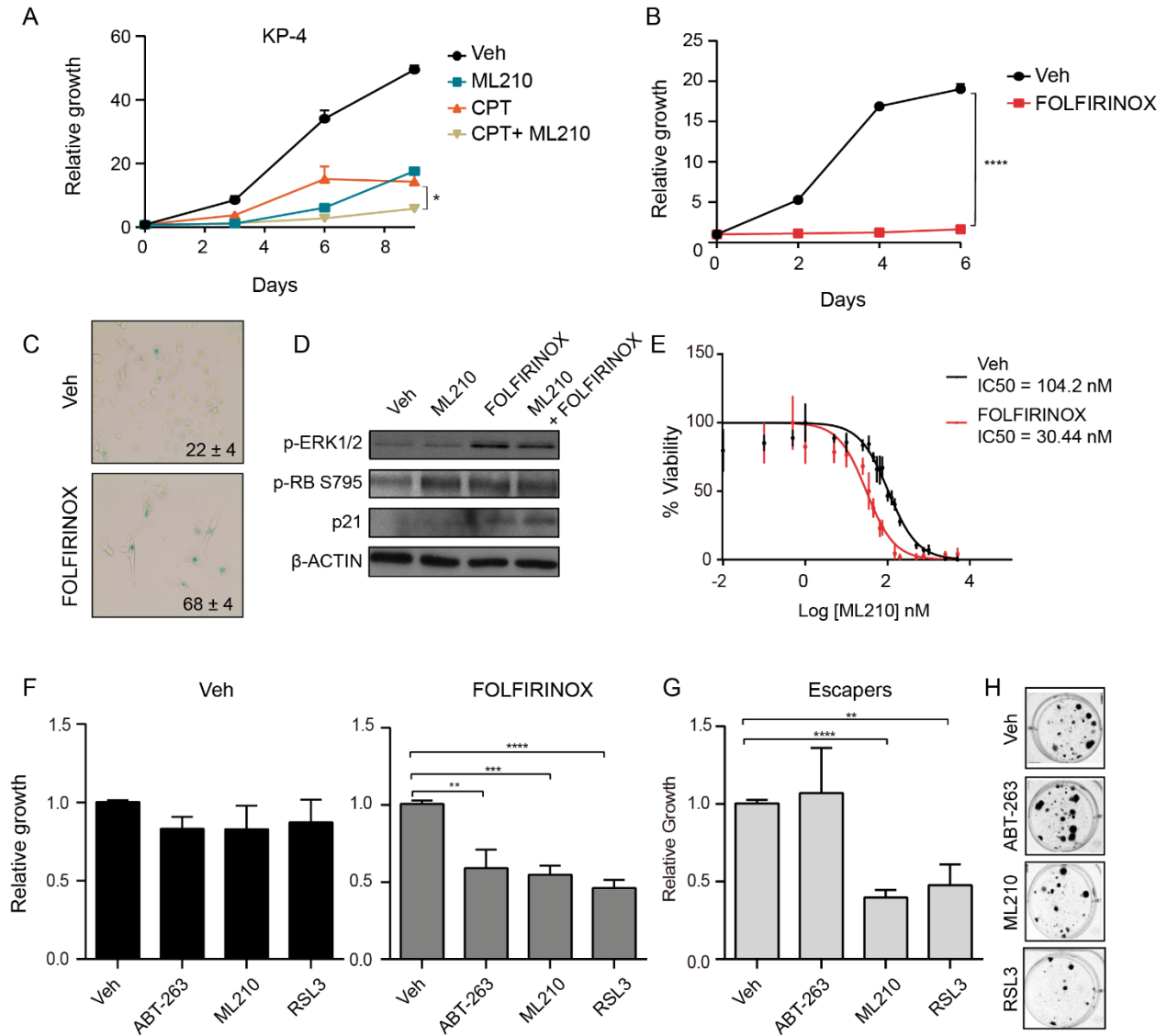
(A) Relative growth by crystal violet staining of Panc-1 cells expressing RAF-ER and one of the three independent sgRNAs against USP5 (sgUSP5-1, sgUSP5-2, sgUSP5-3) compared to sgGFP, 48h following addition of 4-hydroxytamoxifen (0.1 $\mu$ M) or vehicle (EtOH). Data represent the mean fold-change of OD at 590nm from triplicates  $\pm$  SD, two-tailed Student's t-test, n = 3. (B) Relative mRNA levels of *USP5* in vehicle-treated cells from A. Each bar represents the mean fold-change ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) compared to sgGFP condition from three replicates  $\pm$  SD. One-way ANOVA with Tukey HSD, n = 2. (C) Immunoblots for indicated proteins in cells as in A, n = 2



**Figure 4.7. (Fig. S2) GPX4 inactivation is a common vulnerability in an additional senescent cancer cell line, related to Figure 4.3.**

(A) Relative growth of KP-4 cells expressing RAF-ER and one of the three independent sgRNAs against GPX4 (sgGPX4-1, sgGPX4-2, sgGPX4-3) compared to sgGFP, 48h following addition of 4-hydroxytamoxifen (0.1 $\mu$ M) or vehicle (EtOH). Data represent the mean fold-change of OD at 590nm from triplicates  $\pm$  SD, two-tailed Student's t-test, n = 3. (B) Relative mRNA levels of *GPX4* in vehicle-treated cells from A. Each bar represents the mean fold-change ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) compared to sgGFP condition from three replicates  $\pm$  SD. One-way ANOVA with Tukey HSD, n = 2. (C) Immunoblots for the indicated proteins in cells as in A. p-MEK, MEK1/2 phosphorylated on serines 217/221; p-ERK1/2, ERK 1 (p44, upper band) and 2 (p42, lower band) phosphorylated on threonine 202 and tyrosine 204, p-RB S795, Retinoblastoma protein phosphorylated on serine 795, n = 2 (D) Percentage of cell death by trypan blue staining on cells as in A. Data represent mean percentage from triplicates  $\pm$  SD, two-tailed Student t-test, n = 2. (E) Dose-response curve of KP-4 cells treated with various concentrations of ML210 over 6 days. Treatment was repeated at day 3. Data represent the mean percentage of viability from 4 replicates  $\pm$  SD. ML210's IC50 values are indicated. Statistical analysis was performed by comparison of fits in GraphPad Prism (\*\*\*\*) P < 0.0001, n = 2. (F) Relative growth of KP-4 cells expressing RAF-ER and treated every 48h with 4OHT or vehicle and the following doses of indicated treatments, ML210 50nM, Necrostatin-1 (Nec-1) 10mM, Z-VAD-FMK (Z-VAD) 50mM, Ferrostatin-1 (FER-1) 1 $\mu$ M, N-acetylcysteine (NAC) 1mM, Trolox 100mM, or vehicle (DMSO). Data show mean fold-change of OD at 590nm relative to double vehicle-treated cells at day 6  $\pm$  SD, two-tailed Student's t-test, n = 2. (G) Relative growth of KP-4 cells as in A but treated also with 1 $\mu$ M Ferrostatin-1 (FER-1) or vehicle for 4 days. Data represent mean fold-change of OD at 590 nm from triplicates  $\pm$  SD relative to KP-4 cells expressing sgGFP and treated with the double vehicle, two-tailed Student's t-test, n = 2. For panels A-B, D, F-G, (\*) P < 0.05, (\*\*) P < 0.01, (\*\*\*) P < 0.001, (\*\*\*\*) P < 0.0001.





**Figure 4.8. (Fig. S3) GPX4 inhibition promotes senolysis following therapy-induced senescence in KP-4 cells, related to Figure 4.5.**

(A) Growth curve of KP-4 cells over 9 days with indicated treatments, Veh (DMSO), ML210 50nM and/or Camptothecin 25 nM. Data represent mean fold-change of OD at 590nm relative to day 0,  $\pm$  SD, statistics done using two-tailed Student's t-test,  $n = 3$  (B) Growth curve of KP-4 cells treated with FOLFIRINOX (10 $\mu$ M 5-Fluorouracil, 25nM SN-38, 5 $\mu$ M Oxaliplatin) or vehicles over 6 days. Data represent mean ratio of OD at 590nm over day 0, from triplicates  $\pm$  SD, statistics done using two-tailed Student's t-test,  $n = 3$ . (C) Senescence-associated- $\beta$ -Gal staining of cells as in B after 4 days of treatment with FOLFIRINOX or vehicle. Data in the bottom right corner represent mean percentage from three 100-cell counts  $\pm$  SD. (\*\*\*)  $P < 0.001$  compared to vehicle, two-tailed Student's t-test,  $n = 3$  (D) Immunoblots of indicated proteins in KP-4 cells treated for 4 days with FOLFIRINOX or DMSO, and then treated for 48h with ML210 50nM or vehicle. p-ERK1/2, ERK 1 (p44, upper band) and 2 (p42, lower band) phosphorylated on threonine 202 and tyrosine 204, p-RB S795, Retinoblastoma protein phosphorylated on serine 795,  $n = 2$  (E) Dose-response curve of KP-4 cells pre-treated for 4 days with FOLFIRINOX or vehicle then treated with various

concentrations of ML210 over 3 days. Data represent the mean percentage of viability from 3 replicates  $\pm$  SD. ML210's IC<sub>50</sub> values are indicated. n = 3. (F) Relative growth of KP-4 cells pre-treated for 4 days with FOLFIRINOX or vehicle, then treated with indicated drugs, ABT-263 2.5 $\mu$ M, ML210 50nM or RSL3 10nM or corresponding vehicle. Data represent mean OD at 590nm relative to vehicle-treated cells from three replicates  $\pm$  SD, two-tailed Student's t-test, n = 3 (G) Relative growth of cells that emerged 14 days following treatment (ABT-263, ML210 or RSL3) withdrawal from FOLFIRINOX-treated cells in F. Data represent mean of triplicates  $\pm$  SD, two-tailed Student's t-test, n = 3 (H) Representative images of clones from G that emerged after treatment withdrawal. For panels A-B and F-G, (\*\*) $P < 0.01$ , (\*\*\*) $P < 0.001$ , (\*\*\*\*) $P < 0.0001$ .

## 5. Discussion générale

### 5.1. Limites de nos modèles cellulaires et génétiques pour étudier la sénescence *in vitro*

#### *Modèles de PanIN et de sénescence induite par les oncogènes*

Tout d'abord, il convient de revenir sur le choix des différents modèles que nous avons utilisés pendant cette thèse pour étudier le rôle de ERK et de la sénescence dans la progression du cancer pancréatique. Les lignées primaires de stade PanIN-1 (1497, 1498, 1499) qui ont été isolées d'un modèle de souris Pdx1-Cre-LSL-Kras<sup>G12D</sup> ont montré un niveau élevé de p-ERK par Western-Blot et les lésions correspondantes dans les souris l'ont montré également par IHC. Étant des lignées de souris, elles peuvent ne pas représenter une correspondance parfaite avec les lésions PanIN chez l'humain. Toutefois, il n'existe à ma connaissance aucun modèle équivalent chez l'humain dont il est possible de faire la culture *in vitro*. En effet, les tissus de stade PanIN obtenus pour des IHC représentent toujours des tissus adjacents à une tumeur en résection, et il est donc extrêmement difficile d'obtenir suffisamment de cellules PanIN pures (sans cellules tumorales) et d'en faire une culture *in vitro*. Il est possible que chez la souris, le fait que les cellules murines expriment naturellement la télomérase en facilite la culture et limite le stress associé à celle-ci. Or, chez l'humain, ceux qui ont tenté de générer des cultures de cellules PanIN ont généralement vu leurs efforts déçus par une prolifération indésirable de tous les autres types cellulaires présents dans l'organe, notamment les fibroblastes associés aux tumeurs. Dans nos lignées de souris, la prolifération résiduelle, bien que très lente, peut aussi mener à une divergence par rapport au phénotype observable *in vivo* où les cellules canalaire de stade PanIN peuvent rester sans proliférer durant près d'une décennie chez un patient.

Alternativement, nous avons tenté de modéliser la sénescence des lésions PanIN en la comparant avec celle d'autres lignées normales (HMEC, MEF et IMR90 dans l'article 1, HPNE et IMR90 dans l'article 2) dans lesquelles la sénescence est induite par la surexpression de H-RAS<sup>G12V</sup>. De la même façon, l'induction de la voie ERK par le modèle RAF-ER dans l'article 2 a été utilisée pour restaurer un niveau de ERK similaire à celui du stade bénin. Or, la réalité est que

les niveaux de p-ERK qui sont induits par ces méthodes sont souvent supraphysiologiques, et peuvent ne pas récapituler exactement ce qui se produit *in vivo*. Il n'est donc pas surprenant que la sénescence détectée *in vivo* dans les cellules épithéliales ne représente pas la même stabilité que ce qui a pu être observé dans des fibroblastes *in vitro* depuis des dizaines d'années. *In vivo*, le niveau exact d'activation de la voie ERK varie probablement en fonction du nombre de copies endogènes de KRAS mutées, de la ploïdie des cellules, du rapport entre le nombre de copies mutées et de copies WT, et aussi de l'apport exogène en facteurs de croissance. Également, l'utilisation d'un mutant de HRAS plutôt que de KRAS *in vitro* peut mener à une sénescence artéfactuellement forte car il est reconnu que l'expression de la protéine HRAS est plus forte que celle de KRAS, notamment grâce à la présence de codons plus fréquents pour HRAS, tandis que la séquence de KRAS est enrichie de codons rares pour des acides aminés similaires (456). Finalement, il n'est pas connu si les effecteurs en aval de HRAS et de KRAS sont exactement les mêmes, de même qu'en fonction du mutant utilisé (G12V vs G12D, par exemple).

Pour le modèle RAF-ER, nous avons travaillé avec l'isoforme RAF1 (CRAF), une forme naturellement exprimée dans le pancréas et qui contribue à la pathogenèse du cancer pancréatique en aval de KRAS muté (142). Toutefois, la fusion avec le domaine de liaison au ligand du récepteur à l'estrogène représente un contexte artificiel, de même que l'utilisation d'une forme tronquée de RAF1, correspondant au domaine kinase C-terminal seulement, sans le domaine de régulation en N-terminal, et possédant des acides aminés phosphomimétiques. La construction  $\Delta$ RAF1-ER<sup>T</sup> est donc peu susceptible aux rétrocontrôles endogènes. On pourrait anticiper que cela procure l'avantage de prolonger l'induction de la sénescence dans notre modèle, mais ce que nous pensons observer est plutôt le désavantage de promouvoir la toxicité de l'oncogène de façon plus rapide également. En pratique, on observe que les cellules cancéreuses dans lesquelles on induit RAF-ER par le 4-hydrotamoxifène tendent à échapper à cette sénescence dans les ~6-7 premiers jours, où l'on voit les premiers clones émerger dans un pétri de cellules. Ceci était donc une considération importante lors du design du criblage CRISPR-Cas9, où l'on souhaitait identifier seulement ce qui coopérait lors de la phase de sénescence active, d'où l'activation de 3 jours seulement au 4OHT dans l'article 3.

Parmi les autres limites que nous avons observées dans le modèle RAF-ER, nous avons constaté qu'après l'émergence de clones prolifératifs, il n'était plus possible de réinduire une sénescence dépendante de cette même construction. Il n'est pas clair si les clones qui émergent sont ceux qui expriment faiblement la construction et qui sont présents dans la population depuis le début, ou encore s'il s'agit des cellules qui ont exprimé fortement RAF, qui sont entrées en sénescence, et qui l'ont contournée par des mécanismes intrinsèques ou extrinsèques. Nous avons toutefois observé que même si nous tentons, par l'utilisation d'inhibiteurs de ERK, de diminuer les rétrocontrôles qui pourraient agir sur la voie de façon ERK-dépendante, il n'est pas non plus possible de réinduire la sénescence par la même construction en remettant du 4OHT sur les cellules par la suite. Bien que les cellules maintiennent leur sélection pour l'intégration de la construction (ex : puromycine), il se pourrait que le contournement de la sénescence observé dans ce modèle soit artéfactuel si la construction de RAF-ER est réprimée de façon épigénétique.

#### *Mécanismes endogènes de diminution des niveaux de p-ERK dans la progression des PDAC*

Cette constatation nous ramène au fait qu'*in vivo*, un mystère demeure, à savoir comment les cellules perdent leur dépendance à l'oncogène RAS durant la progression cancéreuse. S'agit-il d'un mécanisme épigénétique? Nous n'avons pas investigué cette possibilité car une expérience nous a mené vers une hypothèse un peu différente. Initialement, avant d'utiliser une construction RAF-ER pour activer la voie ERK dans les cellules de stade avancé, nous avons décidé de tester une construction phosphomimétique active de MEK (MEK<sup>DD</sup>). La simple infection de cette construction ne suffisait cependant pas à activer ERK, et même, il était difficile de détecter l'expression de cette forme active de MEK dans les cellules PDAC. Nous avons trouvé que l'inhibition de l'autophagie, en utilisant la chloroquine, nous permettait non seulement de voir l'expression de MEK<sup>DD</sup> par Western-blot, mais aussi d'activer la voie ERK en aval. Ainsi, nous pensons qu'il est possible que lors de la progression du cancer pancréatique, durant laquelle le niveau d'autophagie des cellules augmente de façon importante, une composante essentielle de la voie RAF-MEK-ERK puisse être dégradée par autophagie, ce qui mènerait à une diminution de la signalisation, et donc à un contournement de la sénescence. Nous pourrions imaginer qu'une protéine d'échafaudage permettant de regrouper RAF, MEK et ERK pour promouvoir l'activation de la voie se fait dégrader, ou encore que l'activation locale de cette même voie sur les

autophagosomes est empêchée par un flux trop rapide de l'autophagie. Finalement, il se peut que parmi les mécanismes actifs permettant d'éviter une toxicité de l'oncogène, l'autophagie permette de cibler directement pour la dégradation des composantes de la voie, comme MEK ou ERK lorsqu'ils sont phosphorylés. Il est difficile de dire si cette dernière hypothèse est viable étant donné que dans la Figure 3.2d, les niveaux totaux de MEK et ERK quant à eux semblent peu affectés dans la progression, tandis que dans d'autres contextes, notamment la Figure 3.3a, et Figure 3.10a (NB508) où l'on hyperactive la voie ERK, les niveaux totaux de ERK1/2 semblent diminuer spécifiquement lorsque celui-ci est actif. À de nombreuses reprises, nous avons également observé dans nos Western blots des bandes de plus faible poids moléculaire dans les puits où l'on détecte p-ERK, qui pourraient correspondre à des formes partiellement dégradées. Parmi les autres hypothèses possibles pour la perte de signalisation par ERK dans la progression du cancer pancréatique, il est possible que des phosphatases de ERK ou de MEK soient surexprimées. Ceci irait de pair avec les niveaux totaux inchangés de MEK et ERK. À cet effet, un peu de littérature existe, notamment sur l'élévation des niveaux de MKP-2 (DUSP4) dans le cancer du pancréas (457). Finalement, il n'est pas exclu que la signalisation par RAS devienne biaisée vers une autre voie de signalisation que celle de RAF, lors de la progression, et que cette perte de dépendance à l'oncogène ne soit pas une perte de signalisation, mais plutôt une redirection vers d'autres effecteurs qui sont davantage pro-tumoraux que la voie ERK. Nous n'avons pas investigué ces hypothèses.

#### *Sénescence induite par RAS versus par RAF*

Pour revenir sur la comparaison de la sénescence induite par RAS et par RAF, là aussi il convient de réanalyser les deux cas. D'une part, il nous a paru peu logique de tenter de réinduire une sénescence par RAS dans des cellules PDAC qui possèdent un RAS endogène muté, et dont les cellules se sont libérées. Il est à supposer que les mécanismes qui ont permis une première fois aux cellules de contourner la sénescence induite par RAS sont toujours actifs ou modérément actifs. Toutefois, l'induction d'une sénescence par RAF est assez différente. La première différence majeure est le fait que l'activation de la voie RAS engage aussi la voie PI3K, ce qui n'est pas le cas pour la voie RAF, qui est seulement en amont de la voie ERK/MAPK. Lorsque l'on infecte une construction de RAF dans des cellules normales telles que des fibroblastes, les cellules répondent

majoritairement par de la mort cellulaire, tandis qu'avec RAS, la réponse est davantage de la sénescence. L'activation de la voie PI3K semble donc requise pour permettre la survie cellulaire suite au stress d'hyperactivation de ERK. Dans le modèle RAF, il n'y a pas non plus de phase d'hyperprolifération comme dans l'induction de RAS. Il est possible que dans les lignées cancéreuses utilisées, notamment les Panc-1 qui ont une amplification d'AKT2 (458), il y ait une activation basale suffisante de la voie PI3K pour pouvoir rester viable suite à l'activation de ERK, et entrer majoritairement en sénescence cellulaire plutôt qu'en mort cellulaire.

### *Activation pharmacologique de la voie ERK*

Ensuite, puisqu'*in vivo* les mutations combinées de RAS et RAF dans de mêmes cellules sont très rares voire inexistantes, l'activation de RAF-ER dans une lignée cancéreuse possédant déjà une mutation de RAS est un contexte que l'on pourrait juger un peu artificiel. Nous avons donc cherché pendant plusieurs années de bons agents pharmacologiques qui permettraient d'induire la sénescence par ERK en promouvant son activation endogène. Parmi les candidats testés, nous avons investigué les inhibiteurs de phosphatases de la famille DUSP, comme le BCI. Celui-ci avait précédemment été décrit comme un activateur de ERK pouvant mener à la mort de cellules de leucémie lymphoblastique aigue par la promotion de stress oxydatif dépendant de ERK et des NADPH oxydases (p47<sup>phox</sup>) (145). Toutefois, dans nos mains, l'inhibiteur s'est avéré toxique sur les cellules cancéreuses pancréatiques à des doses inférieures à celles requises pour activer ERK. Puisque cet inhibiteur cible DUSP1, une phosphatase aussi de JNK, il est possible que le BCI induise une apoptose JNK-dépendante dans ce contexte. C'est plus tard dans mon doctorat, vers 2020, que j'ai investigué davantage les modèles de sénescence induite par la thérapie, notamment par la camptothécine, pour me rendre compte que dans ce cas, la camptothécine agissait notamment par l'activation de la voie ERK (459). La camptothécine étant étroitement apparentée à l'irinotécan, utilisé dans la combinaison thérapeutique FOLFIRINOX dans le traitement du cancer du pancréas, il est devenu évident que nous devions tester si le FOLFIRINOX agissait via l'induction de p-ERK endogène et par un mécanisme de sénescence. Les conclusions de cette expérience sont montrées dans l'article 2.

Finalement, l'expérience de phosphoprotéomique présentée dans l'article 2 possède également des biais. La méthode utilisée, par enrichissement de phosphopeptides sur colonne de

TiO<sub>2</sub> a le désavantage de reconnaître plus efficacement les sérines/thréonines phosphorylées préférentiellement au tyrosines phosphorylées. De même, les enzymes utilisées pour digérer les peptides avant la spectrométrie de masse ciblent également de façon préférentielle des sous-ensembles de peptides selon leur site consensus. Nous ne pouvons donc pas exclure que nos découvertes et nos orientations de projets aient été influencées par ces résultats, et que l'utilisation de méthodes complémentaires aurait pu nous orienter vers d'autres phénomènes que le stress nucléolaire. Il reste que les conclusions qui en découlent, soit la découverte d'un phénotype nucléolaire associé à la sénescence, a été validé dans plusieurs modèles.

En conclusion de cette section sur les modèles, nous avons quand même tenté de trouver un compromis entre la qualité des modèles, l'accessibilité et la facilité d'utilisation de ceux-ci considérant les ressources de notre laboratoire. Les constructions utilisées le sont également par une vaste communauté de chercheurs ce qui rend possible de comparer nos travaux aux leurs. Le seul aspect que nous aurions pu améliorer je pense, en lien avec nos modèles, aurait été de retourner dans les modèles 1497, 1498 et 1499 pour valider les découvertes des articles 2 et 3, soit la présence de SANF et de stress nucléolaire au stade PanIN, et l'activité sénolytique des inhibiteurs de GPX4 dans le stade PanIN qui ont une forte signalisation ERK. Cependant, puisque les cellules PanIN sont très peu prolifératives, ces modèles isolés à Boston en collaboration avec le Dr. Bardeesy étaient pratiquement épuisés à la fin de l'article 1. Nous avons donc jugé plus sage de ne pas baser les travaux des articles subséquents sur ces lignées.

## **5.2. Lien entre mitochondries, cellules souches et métabolisme des PDAC**

### *Bénéfices de la respiration mitochondriale pour la progression tumorale*

Parmi les questions qui restent en suspens suite à nos publications, il y a notamment comment les cellules PanIN qui progressent vers le stade PDAC acquièrent leur caractère souche, leur dépendance à la respiration mitochondriale et leurs caractéristiques d'EMT. D'une part, au point de vue métabolique, il semble peu efficace *in vivo* de se tourner vers un métabolisme dépendant de l'oxygène dans le microenvironnement hypoxique d'une tumeur pancréatique. Cependant, un métabolisme oxydatif, tel qu'observé dans l'article 1, semble concorder avec la sensibilité que les



cellules PDAC ont pour l'inhibition de leurs défenses redox, dont GPX4, tel que vu dans l'article 3 et suggéré par Peng *et al.* (436). En effet, dans différents contextes, il a été montré que les cellules souches et les cellules cancéreuses souches ont un métabolisme mitochondrial augmenté, mais aussi une synthèse de glutathion mitochondrial augmentée pour maintenir un environnement réducteur (460).

Une explication à cette utilisation de la mitochondrie réside peut-être dans d'autres travaux que nous avons effectués au laboratoire, portant sur le métabolisme du NAD. L'utilisation de la chaîne de transport d'électrons, et plus précisément du complexe I mitochondrial, ne sert pas seulement à la production finale d'énergie sous forme d'ATP, mais aussi au recyclage du NADH en  $\text{NAD}^+$ . Le NAD est requis pour de nombreux processus cellulaires, autant dans les cascades cataboliques, que pour l'activité des sirtuines, PARPs et autres enzymes dépendantes du NAD. Comme dans l'effet Warburg, où les cellules prolifératives utilisent la glycolyse pour former du pyruvate qui est converti en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase, recyclant du même coup le NADH en  $\text{NAD}^+$ , la même stratégie est possible avec l'utilisation du complexe I. Plusieurs articles montrent que pour promouvoir un phénotype souche, de hauts niveaux de  $\text{NAD}^+$  sont requis, et que cela va de pair avec un métabolisme mitochondrial augmenté (461). De façon similaire, notre laboratoire a montré que de rétablir de hauts niveaux de  $\text{NAD}^+$  permettait l'échappement de la sénescence et la transformation cellulaire (410). Conséquemment, il est logique que les cellules PDAC utilisent la mitochondrie pour régénérer le  $\text{NAD}^+$ , un processus protumoral. Ceci engendre toutefois une vulnérabilité intrinsèque à la metformine qui est décrite dans la littérature comme un inhibiteur du complexe I, et donc qui inhibe la régénération du  $\text{NAD}^+$ .

Il est aussi possible que les résultats que nous avons obtenus dans les AH375 représentent ce qui se passe dans un sous-type de lignées PDAC. De ce fait, je l'associerais au sous-type lipogénique selon Daemen (61), qui sont également décrites comme des cellules ayant davantage un métabolisme mitochondrial, similairement à la lignée humaine Panc-1. Dans ce sous-type de PDAC, les cellules utilisent le glucose comme source de carbone pour le cycle de l'acide citrique, et génèrent des molécules riches en électrons pour la chaîne de transport d'électrons. Ces cellules font aussi la synthèse active de leurs lipides, tandis que d'autres sous-types comme les cellules glycolytiques tendent davantage à faire la collecte de ces lipides dans le microenvironnement. En

somme, l'obtention d'un phénotype mitochondrial et lipogénique est en accord avec les vulnérabilités trouvées dans l'article 3. Dans cet article, nous montrons que bien que l'inactivation de GPX4 cible de façon préférentielle les cellules cancéreuses sénescents, il semble tout de même difficile voire impossible d'isoler des clones ayant une ablation complète de GPX4, suggérant que les cellules cancéreuses pancréatiques non sénescents requièrent également de bonnes défenses redox pour éviter la peroxydation des lipides et la mort par ferroptose.

Quant à l'acquisition d'une signature d'EMT et de cellules souches, elle est en accord avec le phénotype plus agressif et invasif des cellules observé *in vivo*, c'est-à-dire lorsque les cellules de stade PanIN-3 et PDAC tendent à envahir la lumière des canaux pancréatiques et à se disséminer dans l'organisme. Si l'on regarde la progression cancéreuse sous l'angle de la perte des niveaux de p-ERK, il est attendu que les cellules perdent aussi un signal de différenciation, car cette fonction a souvent été associée à l'activité de ERK. Des travaux antérieurs de notre laboratoire ont d'ailleurs montré que les cellules qui contournent la sénescence acquièrent des signatures de cellules souches (337). Toutefois, nous n'avons jamais réussi à faire la preuve concrète que diminuer activement la signalisation par ERK permettait de forcer la tumorigénèse dans des cellules pancréatiques ayant l'oncogène RAS muté, bien que cette démonstration fonctionne dans des fibroblastes (151). Une des limites que nous avons rencontrée lors de nos tentatives est la faible déplétion des niveaux endogènes de ERK1 ou 2 lors de l'utilisation de shARN ou de sgARN. En effet, il est aussi connu qu'une inactivation forte ou complète de l'un de ces gènes pourrait constituer un grand désavantage, empêchant l'obtention d'une population de cellules en découlant.

Finalement, dans notre séquençage d'ARN sur micropuce, nous avons comparé les 1499 (PanIN) avec les AH375, qui sont des cellules ayant évolué *in vitro* pour devenir transformées. Bien qu'elles soient isolées d'un modèle ayant seulement la mutation KRAS<sup>G12D</sup>, il n'est pas exclu que dans leur progression, les cellules aient acquis d'autres altérations géniques, et donc que l'acquisition de leurs caractéristiques souches ne soit pas associée seulement à une diminution de la voie ERK. Or, puisque dans notre cadre expérimental, cette progression a eu lieu *in vitro*, nous pouvons affirmer qu'il y a eu peu, voire une absence de contribution des autres types cellulaires normalement présents dans une tumeur comme des facteurs influençant l'évolution des cellules cancéreuses. Si malgré cette différence entre nos travaux et d'autres qui ont été publiés, nous

arrivons à la même conclusion, c'est probablement que des facteurs intrinsèques aux cellules ou sinon dépendant des nutriments présents dans les milieux de culture peuvent suffire à favoriser l'émergence des caractéristiques susmentionnées.

#### *Suite de la recherche sur le rôle des mitochondries dans les PDAC*

À titre de perspective sur cette partie du travail en lien avec l'article 1, il y a lieu d'intégrer à la discussion l'un des articles auxquels j'ai pu contribuer durant mon doctorat, et qui visait à développer et à tester d'autres analogues de la metformine dans des cellules cancéreuses pancréatiques, en collaboration avec le laboratoire de Dre. Andreea-R. Schmitzer au département de chimie de l'Université de Montréal (318). Dans cet article, nous présentons la capacité d'un analogue nommé « 1b » à altérer les fonctions mitochondriales des cellules PDAC, autant au niveau de l'hyperstructure des réseaux de mitochondries, que de l'altération générale de la respiration cellulaire et du potentiel membranaire mitochondrial. Ces effets peuvent être obtenus à des concentrations avoisinant les 10-15  $\mu\text{M}$  tandis que l'efficacité de la metformine ne peut être atteinte en deçà de 1-5 mM, représentant une grande amélioration.

De même, parmi les articles non-publiés du laboratoire à ce jour, j'ai également contribué à un autre article qui traite des sources de résistance à l'utilisation de la metformine dans les cellules cancéreuses pancréatiques. Ces travaux actuellement en révision dans le journal *Cancers* montrent l'importance du recyclage du NADH en  $\text{NAD}^+$  dans l'efficacité de la metformine. Finalement, parmi les résultats que j'ai obtenus pendant mon doctorat et qui ne seront pas inclus dans ces publications, il y a les résultats d'un criblage CRISPR-Cas9 effectué en parallèle de l'article 3, dans lequel nous tentons d'identifier des moyens de potentialiser l'effet du FK866, un inhibiteur de NAMPT, l'enzyme limitante de la synthèse du NAD, pour générer de la mort cellulaire dans la lignée cancéreuse Panc-1. Les résultats préliminaires identifiés dans ce criblage (bien que non validés expérimentalement à ce jour), pointaient vers une altération du complexe I mitochondrial comme cible synthétique létale dans le cancer pancréatique.

Ces travaux qui suivent l'article 1 sont donc le début d'une série d'efforts visant à cibler le métabolisme mitochondrial et les autres caractéristiques trouvées dans l'article 1 qui sont liées à l'agressivité des cellules PDAC, afin de contribuer à la génération de nouvelles solutions thérapeutiques dans le cancer du pancréas.

### **5.3. Comment l'activation de ERK permet la sénescence des cellules cancéreuses pancréatiques : hypothèses sur le nucléole**

*La proposition de réactiver la signalisation par ERK dans les PDAC*

Dans un second temps, je me suis concentrée pendant ma thèse sur des moyens de s'inspirer des mécanismes de suppression tumorale qui sont actifs au stade PanIN pour imaginer des solutions thérapeutiques au stade PDAC. Puisque notre laboratoire s'intéresse à la signalisation par ERK depuis plusieurs années, les résultats selon lesquels le niveau de p-ERK diminue avec la progression du cancer pancréatique ont mené à une nouvelle idée, soit de réactiver la signalisation par ERK dans le stade PDAC. À la lumière de toute la littérature décrivant la voie ERK comme une voie oncogénique, cette idée semble assez controversée. Toutefois, les scientifiques travaillant à l'inhibition de cette voie comme solution thérapeutique ont connu plusieurs échecs. D'une part, il est vrai que l'utilisation d'inhibiteurs mène à de la résistance médiée par une réactivation de la voie, mais parfois aussi, l'inhibition partielle de la signalisation bloque une forte signalisation suppressive (462). Cette dernière approche ramène donc les niveaux de p-ERK dans la zone idéale pour la prolifération, selon le principe de boucle d'or (Goldilocks). Une idée actuellement en émergence serait plutôt d'utiliser des inhibiteurs de la voie MAPK en alternance avec des périodes sans inhibiteur, où la réactivation forte de la voie induit un effet bénéfique de type « ERK-rebound » promouvant la mort cellulaire.

Par ailleurs, les différences sont grandes entre les cellules de stade PanIN et PDAC, et il est étonnant que l'activation de la voie ERK permette de freiner les cellules cancéreuses en absence de p53 et de p16. Et bien que cette question ne soit toujours pas résolue, voici quelques idées à ce propos. Nous savons que l'activation de ERK dans les fibroblastes permet l'induction de sénescence notamment par la promotion de la dégradation protéique de cibles hyperphosphorylées en aval de ERK (151). Cette caractéristique n'a pas pu être reproduite dans les cellules cancéreuses pancréatiques avec le modèle RAF-ER, et il est incertain si les E3 ligases spécifiques au SAPD, pour autant qu'elles existent, sont toujours exprimées et actives dans le stade PDAC et dans ce type cellulaire. Toutefois, la combinaison FOLFIRINOX qui induit p-ERK, a quant à elle permis de réduire le niveau protéique de facteurs associés à la ribogénèse et même de STAT3 une autre cible

du SAPD identifiée dans les fibroblastes. Ceci suggère que la sénescence et le SAPD sont toujours possibles dans les PDAC, mais que le signal inducteur puisse requérir davantage que juste l'activation de ERK. En absence de p53 et de p16, la présence de SAPD pourrait freiner le cycle cellulaire directement par l'absence des effecteurs requis pour progresser dans le cycle cellulaire, une hypothèse discutée dans les travaux de Deschênes-Simard *et al.* (151,463). À titre d'exemple, la dégradation de facteurs requis à la transition G1/S pourrait bloquer le cycle cellulaire, de même que l'absence de facteurs requis pour la réplication de l'ADN, pour la biogénèse des ribosomes ou toute autre fonction de croissance essentielle à la poursuite du cycle.

Par ailleurs, il est possible que l'activation de la voie ERK par RAF ou par le FOLFIRINOX induise un stress oxydatif, même en absence de p53 et p16. Bien que ceci n'ait pas été testé formellement, cela pourrait expliquer une sensibilité augmentée à l'inhibiteur de GPX4. Le stress oxydatif étant capable de générer des dommages à l'ADN et un stress protéotoxique, cela pourrait induire la sénescence dans les PDAC. Cependant, ce n'est pas clair comment ce mécanisme permet l'arrêt du cycle cellulaire en absence de p53, sans être toxique pour la cellule et induire la mort cellulaire. S'agit-il d'un stress trop modéré, ou encore les défenses rédox et la synthèse protéique suffisent-elles à compenser les effets délétères, produisant seulement un ralentissement du cycle cellulaire? Nous ne possédons pas la réponse. Finalement, l'activation de ERK implique aussi potentiellement des changements de l'expression génique, via ses effecteurs nucléaires. Nous n'avons pas non plus investigué cet aspect dans mon projet de thèse. Sachant que ERK est une kinase, nous avons plutôt tenté de comprendre le mécanisme par l'utilisation d'une approche phosphoprotéomique. Toutefois, une limite de notre approche est de l'avoir effectuée à un temps avancé, soit 48h post-induction de la voie, au moment où les cellules commencent à exhiber le meilleur phénotype d'arrêt. Cependant, les pièces du casse-tête sont manquantes pour la période allant de 0 à 48h sur les causes de la compromission des cellules vers la sénescence, en absence de p53 et p16. Dans une future étude, il serait possible d'utiliser une approche phosphoprotéomique en « time-course » pour raffiner le modèle d'induction de sénescence dans ce contexte. De même, il serait intéressant d'appliquer l'approche HT-KAM (High-Throughput Kinase Activity Mapping) du laboratoire Coppé ou son dérivé HT-PAM, pour l'activité phosphatase dans nos conditions (464). En bref, cette approche utilise une librairie de peptides contenant des sites de phosphorylation à laquelle nos extraits cellulaires sont ajoutés. Selon l'activité des kinases (sur la

librairie non-phosphorylée) ou l'activité des phosphatases (sur la librairie phosphorylée) issues de nos extraits, il est possible de déterminer celles qui sont actives dans notre contexte. Cette approche permettrait potentiellement de répondre à la grande question concernant les causes de nos changements phosphoprotéomiques nucléolaires dans la sénescence des cellules PDAC.

### *ERK et le stress nucléolaire*

À cet effet, une hypothèse est que ERK pourrait induire la sénescence comme nous le voyons par l'induction de stress nucléolaire. Or, le lien direct n'a pas été fait dans notre article et il s'agit plutôt d'une corrélation. Nous observons que des protéines nucléolaires, telles que Treacle (TCOF1), RSL1D1, NPM, DDX21, KI67, NOC2L, NOLC1, MYBBP1A, etc., sont moins phosphorylées suivant l'activation de ERK qu'en son absence. Ceci pointe vers l'activation d'une phosphatase nucléolaire, mais nous n'avons pas identifié celle-ci. Les cibles trouvées dans la phosphoprotéomique sont généralement phosphorylées/déphosphorylées sur des résidus sérine et thréonine, et pour plusieurs avec un motif de type « dirigé par une proline ». Cependant, les phosphatases nucléolaires les plus communes comme DUSP3, Cdc14b, PP1, etc., n'étaient soit pas des phosphatases de sérine/thréonine (DUSP3), ou encore ne semblaient pas présentes au nucléole dans nos cellules (PP1) (465-467). La phosphatase Cdc14 aurait toutefois été une hypothèse intéressante vu son rôle dans la compaction de l'ADNr chez la levure (468-470). On peut aussi imaginer que les changements phosphoprotéomiques que nous observons sont causés par la baisse d'activité d'une kinase dirigée par les prolines comme ERK ou les CDK. Toutefois, les phosphoprotéines connues ne sont pas des cibles typiques de ERK, et les CDK ne sont pas reconnues pour phosphoryler des cibles spécifiquement nucléolaires. L'hypothèse de la baisse d'activité d'une kinase, seule, ne peut pas entièrement expliquer la déphosphorylation des protéines car celles-ci sont considérées comme phosphorylées de façon constitutive dans des cellules qui cyclent (471). Par ailleurs, les phosphoprotéines nucléolaires identifiées avaient plusieurs caractéristiques en commun, notamment de faire partie du compartiment périchromosomal en mitose, d'avoir des régions désordonnées, puis d'être phosphorylées ou déphosphorylées à plusieurs résidus. Cette dernière caractéristique a rendu complexe la validation de cibles précises.

On peut toutefois imaginer que ces changements importants du phosphoprotéome nucléolaire soient plus globalement associés à des changements biophysiques ou globaux dans les

cellules concernées. Imaginons que des zones nucléolaires sont généralement riches en charges négatives, conséquence de multiples résidus phosphorylés en surface des protéines, et que suivant l'activation de ERK, ces zones chargées négativement disparaissent. On pourrait s'attendre à observer des changements d'interactions protéine-protéine, protéine-acide nucléique, etc. À titre d'exemple, est-ce possible que toutes ces charges négatives permettent de conserver une distance entre différents acteurs moléculaires par des répulsions électrostatiques, ou forment une tension de surface importante entre différents compartiments subnucléolaires sans membrane? Trop peu de choses sont connues actuellement sur le rôle de ces phosphoprotéines nucléolaires pour en tirer des conclusions. Nous reviendrons à ces hypothèses biophysiques un peu plus loin.

Il est par ailleurs connu que l'activation de la voie des MAPK ERK permet l'activité extraribosomique de RPL3, qui stimule la transcription de p21 par l'entremise du facteur de transcription SP1. Ceci peut se produire en absence de p53 et de p16 et pourrait mener à une inhibition du cycle cellulaire. Cependant, nous avons déjà observé par immunofluorescence que dans les cellules PDAC où l'on active RAF, p21 est généralement localisé davantage au cytoplasme, ce qui ne pointe pas vers un rôle suppresseur de tumeurs par inhibition des CDK, une fonction qui est généralement accomplie par p21 au noyau. Par ailleurs, nous n'avons pas investigué l'expression ou l'implication d'autres inhibiteurs du cycle cellulaire comme p15, p27 ou p57, ni le rôle de facteurs de transcription similaires à p53 tels que p63 ou p73, dont certains rôles pourraient compenser l'absence de p53.

L'activation seule de ERK ne semblait pas non plus générer plus de dommages à l'ADN dans les cellules PDAC qui en possèdent déjà, ni plus de corps de PML. Toutefois une diminution de phosphorylation de RB était bien visible par Western blot dans le modèle RAF-ER, de même qu'une diminution de phosphorylation de l'histone H3, et une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase, tous pointant vers un phénotype lié à la sénescence. Également, malgré le fait qu'une diminution de transcription des ARN ribosomiques ne fut pas observée dans ce modèle, les cellules avaient tout de même un phénotype nucléolaire très visible soit la formation d'un seul gros nucléole, de forme arrondie, plutôt que de multiples nucléoles aux formes irrégulières comme dans les cellules contrôles. Ce phénotype a été observé par différents chercheurs dans de multiples contextes, mais il n'a pas encore été expliqué précisément. De façon générale, le regroupement des

nucléoles et leur forme arrondie semblent associés à un stress cellulaire. Par exemple, dans des cellules humaines, l'ablation du long ARN non-codant SAMMSON par oligonucléotide antisens mène au déplacement de l'exoribonucléase XRN2 hors du nucléole, générant des défauts de maturation des snoARN et ARNr, et l'adoption d'une morphologie arrondie et centrale du nucléole (269). De même, un stress lié à une température haute ou basse chez la plante *Arabidopsis thaliana* mène aussi à un stress nucléolaire et au même changement morphologique, démontrant un mécanisme potentiellement bien conservé entre les espèces (472).

Des discussions au sein de notre laboratoire ont tenté de contribuer à expliquer ce phénomène. La jonction des nucléoles et la forme arrondie du nucléole résultant rappellent la formation d'une seule gouttelette par la coalescence de plusieurs gouttelettes. Chacun des nucléoles est décrit comme un compartiment séparé par une séparation de phase liquide-liquide (LLPS), et la fusion de ces nucléoles peut être associée à la diminution de la tension de surface, ou encore à la rupture d'ancrages qui maintiennent ces corps séparés. La théorie classique qui décrit la LLPS réfère surtout à des différences de concentration ou d'encombrement moléculaires entre différentes phases (e.g. entre un nucléole et le reste du nucléoplasme). À l'intérieur même d'un nucléole, les différents sous-compartiments sont aussi séparés entre eux. À titre d'exemple, le centre fibrillaire (FC) est séparé de la composante fibrillaire dense (DFC) où agit la fibrillarine. Cette dernière maintient la séparation, l'organisation topologique de ces compartiments, de sorte que la transcription des ARNr naissants et leur maturation s'effectue toujours du centre vers la périphérie d'un couple FC/DFC. La protéine nucléophosmine a également des domaines désordonnés et son rôle a été montré dans la séparation de la composante granulaire des couples FC/DFC. Cependant, ce qui maintient chaque nucléole séparé du prochain est moins bien compris. Est-ce que les protéines de la périphérie du nucléole ont un rôle à jouer? Est-ce que des protéines qui sont normalement ailleurs qu'à la périphérie s'y relocalisent pour briser la tension de surface des nucléoles? Est-ce que la chromatine périnucléolaire maintient normalement cette séparation et des processus de condensation/décondensation modifient cette activité? Est-ce qu'un cytosquelette nucléaire maintient habituellement la séparation des nucléoles et celui-ci est modifié lors de l'activation de ERK? Ou encore, est-ce que la modification des ancres de la chromatine à la lamina nucléaire dans la sénescence permet le relâchement d'une tension sur les nucléoles qui les maintenaient séparés, favorisant maintenant leur coalescence? Nous n'avons actuellement pas



l'explication ou les bons outils au laboratoire pour tester globalement l'implication de phénomènes biophysiques dans l'induction de sénescence, bien que cela serait très intéressant. Cependant, une approche pour s'y initier serait de corrélérer l'activité de ERK à ce phénotype de coalescence des nucléoles, notamment en validant à travers différents modèles de sénescence lesquels ont les deux caractéristiques : ERK actif et un seul nucléole arrondi.

#### *Des foci nucléolaires contenant la machinerie de transcription par l'ARN polymérase I*

Ensuite, nous avons rapporté dans les cellules sénescences la présence de SANF, soit de foci nucléolaires associés à la sénescence. Ces foci contenaient notamment la sous-unité principale de l'ARN polymérase I, RPA194, le facteur d'initiation nommé TIF-IA/hRRN3, et une sous-unité impliquée dans la terminaison, soit RPA12. Plusieurs corps sous-nucléolaires à l'apparence différente ont été décrits dans la littérature, comme les corps prénucléolaires (PNB) et les foci dérivés du nucléole (NDF), tous deux présents en fin de mitose et servant à la reformation du nucléole en début G1 (473). Les corps somatiques précurseurs du nucléole, identifiés au laboratoire du Dr. Moss, ont quant à eux en commun avec nous la présence de RPA194 et RRN3 au sein de ces corps formés suivant la déplétion d'UBF (474,475). Toutefois, peu d'information additionnelle est rapportée sur leur contenu si ce n'est qu'ils ne contiennent pas l'ADNr (474,475). Ces corps aussi larges que des nucléoles sont aussi invisibles en microscopie en champ clair suggérant qu'au contraire des nucléoles, ceux-ci ne représentent pas une séparation de phase (474,475). Les colliers nucléolaires, eux, peuvent indiquer des défauts de maturation des ARNr, alors que la structure tripartite du nucléole est altérée, mais ils ne ressemblent pas aux SANF (476). Les agrésomes nucléolaires et les corps amyloïdes sont quant à eux formés d'amas de protéines et/ou d'ARN qui sont immobiles, pratiquement précipités sous forme de changement de phase solide-liquide au sein même du nucléole, mais n'ont pas la forme arrondie et régulière des SANF (477). Finalement, les CNoB ou « CRM1 nucleolar bodies » contiennent la protéine CRM1 et son substrat CPEB1 et disparaissent suite à l'inhibition de CRM1 par la leptomycine B (478). Cependant, aucun de ces corps précédemment mentionnés ne présente vraiment les mêmes caractéristiques que les SANF que nous avons identifié.

Des foci similaires aux SANF ont toutefois été décrits dans la littérature en condition de stress, comme les INB, c'est-à-dire les corps intranucléolaires (479), ou encore les « nucleolar

caps », qui sont quant à eux davantage à la périphérie du nucléole (289). Les INB contiennent des protéines différentes de celles que nous avons identifiées, notamment PA28 $\gamma$ , PCNA, MCM3/7, Ku70, DNA-PKcs, SF2ASF, U2AF65, U1/U2 snRNP, PPM1G, etc., (479). Ils contiennent aussi un enrichissement en protéines modifiées par SUMO1/2/3, sont observés davantage en phase S du cycle cellulaire et peuvent résulter d'un traitement avec des inhibiteurs de topoisomérase, de l'hydroxyurée ou suite à une irradiation, soit différents stress cellulaires qui pourraient tout à fait être en mesure d'induire de la sénescence (479). Toutefois, les auteurs ont testé la colocalisation de ces foci avec RPA194 et n'ont pas conclu à une colocalisation significative (479). Par ailleurs, la taille de ces foci ( $\sim 0,5-1\mu\text{m}$ ), leur nombre par cellule (souvent 1, parfois quelques-uns) et leur localisation sont très semblables à ce que nous avons identifié. Cependant, la fréquence avec laquelle nous les observons dans les cellules normales ( $\sim 0\%$ ) ou cancéreuses (Panc-1,  $\sim 7\%$ ) sans induction de sénescence est bien inférieure à leurs observations (6,3% dans les cellules 293, 16,9% dans les cellules CHO et variable entre 8-32% dans des lignées cancéreuses). S'il s'agissait des mêmes foci que nous observons, nous pourrions tenter d'expliquer certaines des différences par une présence d'INB de façon régulière dans les cellules, mais que la localisation de RPA194 et ses facteurs associés dans ces foci représenterait un événement dépendant du stress cellulaire ou oncogénique. Tout comme dans notre étude avec RAF-ER, la seule présence des SANF ou INB ne mène pas à une diminution de la synthèse des ARNr tel que vu par l'incorporation d'éthynyl-uridine.

L'autre corps nucléolaire qui a retenu notre attention, soit les « nucleolar caps », contient le même enrichissement en protéines du FC que dans nos SANF, malgré une localisation légèrement différente, à la périphérie nucléolaire. Dans les « nucleolar caps », l'ADN endommagé par des bris double-brins peut se retrouver en contact avec les protéines de réparation de l'ADN qui sont normalement nucléaires. Il s'agit généralement des protéines impliquées dans la recombinaison homologue (BRCA1, 53BP1,  $\gamma$ H2AX), mais pas celles impliquées dans la jonction non-homologue des extrémités (NHEJ; Ku70, Ku80, XRCC4) (394). Ces « nucleolar caps » sont vraiment formés à la périphérie du GC et corrélerent avec une inhibition de la synthèse des ARNr, tel qu'obtenu par un traitement à l'actinomycine D (289).

Finalement, un autre article plus récent et portant sur le stress répliatif au niveau nucléolaire a mis en évidence des foci très similaires aux SANF en termes de localisation et de taille (480). Ceux-ci sont caractérisés par la présence de Treacle (TCOF1) et TOPBP1 qui agissent comme plateforme de recrutement d'ATR, pour engendrer une réponse au stress répliatif. La formation de ces foci est indépendante des R-loops ou des dommages à l'ADN, mais semble dépendre davantage des fourches de répliation arrêtées. La présence de ces foci suivant un traitement à l'hydroxyurée ou à l'aphidicoline n'indique pas d'inhibition significative de transcription par l'ARN polymérase I, toutefois la déplétion des composantes de ces foci (TCOF1, TOPBP1 ou ATR) suffit à produire une inhibition de transcription des ADNr dans le même contexte (480). Les auteurs ont donc conclu que la fonction primaire de cet axe TCOF1-TOPBP1-ATR était de protéger contre les conséquences graves du stress répliatif comme la formation de dommages à l'ADN double-brin. Sachant que TCOF1 agit comme plateforme de recrutement de l'ARN polymérase I (274), on pourrait supposer que cette fonction est requise pour maximiser la transcription des ARNr autour des zones touchées par les fourches de répliation bloquées, de façon à limiter l'altération de la ribogénèse durant la résolution. Si l'on analyse nos SANF selon cette hypothèse, ceux-ci pourraient représenter un mécanisme protecteur, voire pro-survie permettant de limiter les dommages. Tout comme le phénotype de diminution de la translecture observé dans la sénescence, on pourrait imaginer que les SANF sont des lieux de transcription « haute-fidélité » des ARNr, où les fonctions de « proofreading » de l'ARN polymérase I sont augmentées. À cet effet, il est intéressant de noter que la sous-unité RPA12 de l'ARN polymérase I que nous retrouvons dans les foci est impliquée spécifiquement dans cette étape de « proofreading », et que son absence est associée à une perte de fidélité de la transcription Pol I (481). Toutefois, puisqu'il s'agit d'une sous-unité naturellement présente dans les complexes ARN pol I (482), il est difficile de déterminer si celle-ci joue des rôles différents au sein des SANF, ou si son niveau d'activité est modulé dans la sénescence.

Les SANF pourraient donc s'inscrire dans un modèle de progression entre un nucléole inaltéré et des « nucleolar caps » représentant de l'ADNr endommagé. Nous pourrions même imaginer que l'inhibition de cette réponse protectrice par l'utilisation d'un shARN contre TCOF1 en contexte sénescence permettrait potentiellement une activité sénolytique si les dommages engendrés sont suffisants. Toutefois, expérimentalement, nous n'avons jamais réussi à voir la

présence de TCOF1 dans nos SANF, du moins pas de façon significative. Ainsi, il est possible que le mécanisme décrit dans cet article prenne place dans nos cellules sénescents mais de façon incomplète, dû à l'absence de TCOF1. Il serait aussi intéressant de vérifier la présence de TOPBP1 dans nos foci.

La présence de stress réplicatif est possible dans certaines sénescences, notamment celles qui possèdent une phase d'hyperprolifération comme la sénescence par RAS. Or, ce n'est pas le cas dans la sénescence par RAF. Par ailleurs, des fourches arrêtées ou bloquées pourraient être engendrées par des collisions entre la machinerie de transcription qui est généralement bien active, des dommages à l'ADN, ou encore avec la machinerie de réplication sans doute plus lente dans les cellules qui ne cyclent plus et dont l'expression des facteurs MCM et PCNA est diminuée (base de données Senequest).

Dans cette étude comme dans plusieurs autres, il a été montré que TCOF1 sert au recrutement de protéines possédant des domaines BRCT comme celui de BRCA1, soit un domaine de liaison aux phosphoprotéines (483). Parmi les protéines possédant un tel domaine se trouvent MDC1, NBS1, PES1, RFC1, TOPBP1, 53BP1 et PARP1 entre autres, qui ont des fonctions diverses dans la réponse aux dommages à l'ADN (MDC1, NBS1, 53BP1, PARP1, TOPBP1), dans l'assemblage de la grande sous-unité ribosomique (PES1), ou encore la réplication (RFC1). Ainsi, on pourrait supposer que le changement de statut de phosphorylation de TCOF1 dans nos modèles pourrait impacter sa liaison avec de nombreuses protéines parmi les précédentes, et potentiellement impacter sa localisation. Parmi les protéines susmentionnées possédant un domaine BRCT, MDC1 fait aussi partie des protéines trouvées hypophosphorylées dans notre phosphoprotéomique, pouvant une fois de plus altérer ses interactions protéine-protéine, voire protéine-ADN. En somme, grâce à des articles comme celui décrivant les foci liés au stress réplicatif et à TCOF1, nous sommes mieux en mesure de déterminer l'impact potentiel des SANF que nous avons identifiés, soit que des fonctions de réponse au stress cellulaire sont envisageables et logiques dans un processus comme la sénescence cellulaire.

Par ailleurs, une autre hypothèse que nous avons sur la formation des SANF tient compte du fait que ces foci sont observés en petit nombre, généralement entre 1 et 5 foci par nucléole, et qu'ils sont plus fréquemment décentrés par rapport au milieu du nucléole. On pourrait voir la

formation de ces foci comme la concentration de facteurs déjà présents sur la chromatine ouverte des ADNr. Par conséquent, au lieu d'observer les colliers de perles classiques observés dans les cellules normales, où une multitude de petits points de RPA194 sont visibles à travers le nucléole; si ces mêmes protéines se concentrent en des zones plus restreintes, on pourrait observer des foci plus gros et plus brillants, similaires à nos SANF. Imaginons que les gènes d'ADNr représentent des protrusions, des boucles d'ADN qui s'élancent vers l'intérieur du nucléole, si moins de répétitions d'ADNr sont ouvertes pour la transcription, la boucle s'étend moins loin au centre du nucléole, ce qui contraint les complexes Pol I à se regrouper sur les petites boucles vers la périphérie. Pour expliquer le phénomène est-ce possible que l'on observe une hétérochromatinisation partielle de l'ADNr, mais trop mineure dans le modèle RAF-ER pour qu'une diminution marquée de transcription soit observée? Selon ce modèle, les SANF seraient des précurseurs aux « nucleolar caps » dans lesquels l'ADNr est complètement réprimé en périphérie du nucléole, tandis que les protéines du GC se retrouvent au centre du nucléole. Ce modèle intermédiaire est en accord avec des résultats que nous avons obtenus avec des agents pharmacologiques inhibant la ribogénèse, comme l'oxaliplatin. En effet, à des doses plus faibles, des foci ressemblant aux SANF sont observables, tandis qu'à des doses élevées ou lorsque combiné à d'autres stressseurs, les foci se localisent plutôt en périphérie du nucléole et ressemblent à des « nucleolar caps ». Dans la sénescence, on ne sait pas si des protéines s'accumulent au centre du nucléole, mais un corps visible en DIC en microscopie est présent au centre du nucléole lorsque des cellules sont très sénescences, et pourrait représenter un dépôt de plusieurs protéines s'y étant accumulées. Une façon de tester ce modèle serait de voir en microscopie en cellule vivante (live-cell imaging) comment la formation des SANF puis des « nucleolar caps » a lieu dans des cellules RAF-ER dans lesquelles on ajoute un inhibiteur de la ribogénèse. Y a-t-il une transition entre les SANF et les « nucleolar caps » permettant de prouver l'hypothèse d'une continuité entre les deux, ou s'agit-il de deux processus complètement distincts?

Une autre question qui est sans réponse, cette fois à propos de la coalescence des nucléoles, est s'il y a une modification du nombre de NOR actifs, c'est-à-dire est-ce que le même nombre de chromosomes portant les ADNr contribuent à la transcription des ARNr dans la sénescence versus en contexte non-sénescence? Une hypothèse existant sur le nombre de nucléoles présents dans une cellule est que pour chaque nucléole observé, une copie d'un chromosome portant les ADNr (13,

14, 15, 21 ou 22) est impliquée. Or, dans un seul gros nucléole, est-ce que les SANF représentent des zones de transcription sur des NOR différents? Pour le savoir, il faudrait réussir à identifier des marqueurs chromosomiques uniques dans les ADNr qui sont malheureusement des régions hautement répétées. Une découverte similaire a été obtenue chez *Arabidopsis thaliana*, mais à ma connaissance, de telles régions uniques n'ont pas été identifiées chez l'humain (484).

Le fait que les nucléoles coalescent pour former un seul gros nucléole pourrait influencer la processivité de la ribogénèse, car par l'adoption de la forme d'une seule goulotte, les nucléoles diminuent leur rapport surface/volume, par l'augmentation de volume nucléolaire mais la perte de surface en périphérie. Dans la sénescence des fibroblastes, Dr. Lessard a montré que des protéines ribosomiques s'accumulent dans les nucléoles alors que les ARNr sont moins transcrits, ce qui change l'encombrement moléculaire dans ce compartiment. Le flux de maturation du centre du nucléole vers l'extérieur est alors altéré. Une solution partielle à cet effet pour la cellule serait de diriger la transcription par l'ARN polymérase I davantage en proximité de la surface du nucléole, et d'utiliser le centre du nucléole comme un réservoir de protéines ribosomiques, qui vont diffuser vers l'extérieur selon les produits de la transcription Pol I. Ce modèle serait en accord avec la formation de SANF qui sont généralement décentrés par rapport au milieu du nucléole. Cette hypothèse pourrait être testée par immunofluorescence avec des anticorps contre plusieurs protéines ribosomiques, ce qui n'a pas encore été fait.

Ensuite, dans notre article 2, nous avons montré que les SANF ne peuvent être dissouts par l'ajout d'1,6-hexanediol, nous laissant supposer que ces SANF représentent des agrégats solides au sein d'une phase liquide. Or, ce n'est pas selon moi la seule explication possible. L'hexanediol a la capacité de défaire les interactions de Van der Waals, les interactions hydrophobes probablement, et d'autres types de liens relativement peu polaires. Si les SANF étaient maintenus par des interactions électrostatiques cependant, il est peu probable que l'hexanediol puisse séparer leur contenu. Ainsi, si des charges positives présentes dans des protéines permettent leur liaison à l'ADNr ou l'ARNr qui portent des phosphates chargés négativement, l'hexanediol ne serait sans doute pas en mesure de briser ces interactions. Pour tester les limites de cette méthode, il serait donc intéressant de voir quels autres foci nucléolaires il est possible ou non de défaire par un traitement à l'hexanediol, notamment les « nucleolar caps ». Entre autres, il faudrait déterminer s'il

Il y a une barrière à la dissociation de corps nucléolaires avec l'hexanediol de par leur emplacement. Puis, concernant la séparation de phase solide-liquide, celle-ci explique bien les corps comme les dépôts amyloïdes qui ont une forme irrégulière. Cependant, la forme très arrondie et régulière de nos SANF rappelle davantage la forme d'une gouttelette que celle d'un amas solide qui n'est pas régi par une tension de surface liquide. Tel que précédemment mentionné, il conviendrait donc d'analyser plus en profondeur la biophysique de ces SANF.

Une autre idée sur la nature des SANF serait que la concentration de facteurs associés à la Pol I pourrait permettre de maintenir une efficacité de transcription même en condition de stress où de nombreuses protéines viennent perturber l'organisation du nucléole. Cela pourrait empêcher que les facteurs clés qui ne sont pas liés à un moment donné partent à la dérive dans un nucléole au volume augmenté. Dans les bactéries notamment, certains complexes d'ARN polymérase sont séparés par LLPS pour générer une sorte d'organisation locale chez cet organisme sans noyau (485).

Finalement, à l'heure actuelle, rien ne nous permet de conclure sur la composition exacte des SANF, et il n'est pas certain que des facteurs étrangers aux complexes d'ARN polymérase I s'y localisent dans la sénescence. Une approche que nous avons envisagée pour déterminer si RPA194 avait des partenaires d'interaction différents était de faire un essai de biotinylation par proximité en faisant une construction de RPA194 avec une biotine ligase ou une technologie apparentée (APEX2, etc.). Il faudrait toutefois s'assurer que la surexpression de cette forme modifiée de RPA194 ne modifie pas son recrutement aux SANF et leur structure. Alternativement, la même approche pourrait être appliquée à la protéine hRRN3/TIF-IA (CDS ~1,9 kb, 74 kDa), qui en raison de sa taille bien inférieure à celle de RPA194 (CDS >5 kb, 194 kDa), pourrait aussi faciliter les clonages qui sont requis. Cela constitue une suite intéressante de ce projet pour le laboratoire.

### *Les SANF et la sénescence*

Quant au lien entre les SANF et la sénescence, il semble que nous ayons bien établi que dans les meilleurs modèles de sénescence induite par RAS, la proportion de cellules possédant des SANF est augmentée, et que les cellules qui ont d'autres marqueurs de sénescence, comme un haut niveau d'activité  $\beta$ -Galactosidase (Spider-Gal) sont celles qui ont les SANF. De même, l'utilisation d'un

sénolytique cible préférentiellement les cellules SANF-positives puisqu'il n'en reste pratiquement pas suite au traitement à l'ABT-263 alors que des cellules SANF-négatives restent. Il serait intéressant de tester si l'utilisation des inhibiteurs de GPX4, que nous décrivons comme sénolytiques dans les cellules cancéreuses pancréatiques sénescents, permet également de cibler préférentiellement ces cellules SANF-positives. Nous avons également cherché des SANF dans d'autres modèles de sénescence que ceux montrés dans l'article 2. Nous n'avons pas observé de SANF dans la sénescence induite par PML dans les HPNE hTERT, dans la sénescence produite par des shARN contre RSL1D1 et TCOF1 dans les Panc-1 et KP-4, et nous n'en avons pas observé dans la sénescence répliquative des IMR90. Les trois premiers modèles ont en commun de ne pas activer la voie ERK, et ont probablement un stress répliquatif assez limité. La sénescence par PML fonctionne par répression des E2F et donc des gènes pro-prolifératifs. Il n'est pas clair que cette sénescence possède une altération de la ribogénèse dans les HPNE, mais dans les IMR90, Dr. Lessard a montré une diminution de la synthèse des ARNr (190). L'ablation de TCOF1 ou de RSL1D1 dans les cellules cancéreuses pancréatiques produit une sénescence transitoire, avec une altération de la ribogénèse. Mais l'absence d'activation de ERK dans ces trois modèles semble une raison suffisante pour expliquer que l'on n'observe pas de SANF. Finalement, l'absence de SANF dans la sénescence répliquative des IMR90 est un mystère, car cette sénescence possède une activation de ERK, des défauts de ribogénèse, une coalescence des nucléoles et de nombreuses autres caractéristiques ressemblant à la sénescence induite par les oncogènes. Nous n'avons pas d'explication actuellement pour l'absence de SANF dans ce modèle. Peut-être que l'absence d'un stress aigu est la clé...

Quant à la relation de dépendance entre ERK et la formation de foci, celle-ci est un peu difficile à établir. Nous savons d'une part que dans un modèle de sénescence par RAS ou RAF-ER, si l'on inhibe l'activation de ERK par l'utilisation d'un inhibiteur (SCH772984), les cellules n'entrent pas en sénescence et n'ont par conséquent pas de SANF. Si l'on inhibe ERK après la formation des foci, ceux-ci ne tendent pas à se défaire, nous informant donc sur l'absence de rôle actif pour ERK dans le maintien de ces SANF. En accord avec l'expérience d'hexanediol, ces foci semblent toutefois très stables et difficiles à perturber, expliquant peut-être nos résultats avec l'inhibiteur de ERK. Finalement, des foci similaires sont obtenus avec différents agents chimiothérapeutiques qui n'induisent pas tous la voie ERK, et donc il est difficile de conclure si



ERK est requis pour leur formation. Il est possible qu'il y contribue, mais que d'autres signaux redondants en aval de ERK puissent jouer le même rôle dans leur formation, expliquant le modèle proposé dans l'article 2 pour le FOLFIRINOX.

Le dernier modèle dans lequel nous souhaiterions tester la présence de SANF est les tissus de stade PanIN *in vivo*. Cette expérience comporte toutefois plusieurs défis. Nous avons accès à des tissus de stade PanIN qui sont fixés au paraformaldéhyde et mis en blocs de paraffine. Toutefois, la détection d'un foci intranucléolaire demande une haute résolution qui est difficile à obtenir par IHC, et nos protocoles d'immunofluorescence sur tissus génèrent en général trop de bruit de fond pour permettre une bonne visualisation du résultat pour RPA194, tout en le colocalisant avec un marqueur de nucléole pour attester de sa localisation. Nous continuons donc d'optimiser nos méthodes, la prochaine étape étant via des tests utilisant des anticorps primaires pré-couplés à des fluorophores, pour pouvoir valider la pertinence *in vivo* de notre découverte et la lier directement à la sénescence des lésions bénignes du pancréas.

#### **5.4. FOLFIRINOX, ERK et sénescence**

Une autre découverte importante de l'article 2 est que la thérapie FOLFIRINOX récapitule plusieurs caractéristiques de la sénescence induite par les oncogènes, telle que vue dans les fibroblastes où elle est plus complète et stable. Non seulement, on observe un arrêt de prolifération, une activité  $\beta$ -Galactosidase augmentée, des SARD, des SANF et du SAPD, mais ce phénotype est aussi accentué par un peu de mort cellulaire. L'implication de ERK dans la sénescence induite par le FOLFIRINOX est toutefois encore mal comprise. Nous avons observé que l'inhibition de ERK ne permet pas significativement de diminuer l'effet du FOLFIRINOX. En ce sens, l'activation de ERK ne semble pas requise pour l'arrêt de croissance, voire l'inhibition de ERK accentue légèrement la mort cellulaire obtenue suivant le traitement au FOLFIRINOX. À cet effet, il est possible que l'activation de ERK stimule des signaux pro-survie ou anti-apoptotiques qui sont associés à la sénescence, ou encore, que l'inhibition de ERK génère un stress additionnel que les cellules tolèrent difficilement. Néanmoins, l'activation de ERK suivant le traitement au FOLFIRINOX est une caractéristique très reproductible. Nous l'avons d'ailleurs anticipée lors du choix de cette combinaison thérapeutique. Initialement, nous avons débuté nos travaux sur la sénescence induite par la thérapie par l'utilisation de la camptothécine. Son effet a été rapporté

comme dépendant d'un réseau complexe qui fait appel à ERK, à la synthèse protéique et au stress oxydant (312). De même, dans un autre contexte, la toxicité pour certains organes associée à l'irinotécan a été montrée comme dépendant de ERK, d'une inhibition de l'autophagie et du stress oxydant (313). Or, dans nos expériences après 6 jours de traitement, la drogue qui, en monothérapie, semble davantage induire p-ERK par Western blot est le 5-fluorouracile, suivi par l'oxaliplatine, et non le SN-38. Ce n'est toutefois que par la combinaison des trois drogues que la meilleure inhibition de la ribogénèse combinée à l'activation de ERK est observée. Bien que la combinaison d'oxaliplatine et de SN-38 mène à davantage d'apoptose, elle semble mener également à un échappement plus rapide que le FOLFIRINOX.

En somme, la relation de complémentarité entre les trois agents semble complexe, mais une hypothèse sur leur synergie pourrait être le fait que l'activation de ERK et l'inhibition de la ribogénèse (par plusieurs mécanismes) créent une décoordination des ARN polymérase, par l'addition de signaux stimulateurs et inhibiteurs sur différents facteurs. Le découplage des Pol I, II et III pourrait affecter la stœchiométrie des composantes des préribosomes menant une fois de plus à des rôles extraribosomiques de certaines protéines ribosomiques non-assemblées. Cette hypothèse sur le découplage et l'effet additif de la signalisation ERK avec l'inhibition de la ribogénèse serait aussi en accord avec les résultats du criblage CRISPR que nous avons réalisé dans l'article 3. En effet, selon les résultats obtenus (non validés expérimentalement), il semble possible de cibler de nombreuses étapes de la ribogénèse dont la transcription par l'ARN polymérase I via plusieurs facteurs associés, ou encore de cibler directement des sous-unités accessoires d'autres polymérase d'ARN (e.g. : POLR3K, etc.) pour potentialiser l'effet de RAF dans les cellules PDAC. Ceci met en lumière l'importance de la régulation fine des processus de transcription nucléaire et nucléolaire. Or, bien qu'un processus aussi important que la ribogénèse semble d'intérêt dans des cellules incapables d'activer des mécanismes de suppression tumorale qui sont dépendants de p53 ou p16, notre compréhension du mécanisme se mettant en place en leur absence est jusqu'ici très limitée. Comme pour le FOLFIRINOX, un projet de collaboration avec l'équipe du Dr. Hemann au MIT pourrait être intéressante pour nous permettre d'investiguer les relations d'interdépendance entre chacune des drogues de cette combinaison, voire entre ERK et les diverses composantes de la ribogénèse (315).

Bien que les cellules PDAC semblent des cibles spécifiques grâce à leur bas niveau de ERK et leur biogénèse des ribosomes active, il restera tout de même à déterminer si la différence de toxicité sur les cellules normales est suffisante pour poursuivre la recherche sur de nouveaux inhibiteurs de la ribogénèse. Il est possible qu'une toxicité diminuée dans les cellules normales puisse être obtenue par le ciblage d'étapes autres que la transcription des ARNr, en s'inspirant des résultats du criblage CRISPR. En attendant la validation de ces nouvelles combinaisons et le design de nouveaux inhibiteurs de la biogénèse des ribosomes à des étapes plus avancées de leur maturation, l'investigation de GPX4 comme cible sénolytique potentielle dans la sénescence induite par la chimiothérapie est en cours dans notre laboratoire comme dans d'autres. Le prochain défi de cette recherche sera donc l'identification d'inhibiteurs de GPX4 qui sont biodisponibles ou encore de nouveaux nanovéhicules permettant une action prolongée des inhibiteurs actuels, de façon à promouvoir une sénolyse efficace *in vivo* chez les patients.

## 6. Conclusion

En somme, à travers les travaux présentés dans cette thèse, nous avons montré que les rôles de ERK et de la sénescence cellulaire dans la progression du cancer pancréatique sont multiples. Alors que la signalisation ERK est très active au stade PanIN où les cellules sont non-prolifératives, conséquence de la sénescence cellulaire, l'atténuation du signal ERK est quant à elle plutôt associée à la progression. Lors de cette progression, les cellules cancéreuses du pancréas acquièrent, en plus des mutations fréquentes dans les suppresseurs de tumeurs p53 et p16, des caractéristiques de cellules souches, un phénotype d'EMT et un métabolisme oxydant mitochondrial, qui peuvent être associés à une perte de dépendance à l'oncogène RAS. Or, cela crée de nouvelles vulnérabilités, notamment pour la metformine et d'autres analogues de biguanides qui peuvent cibler directement la mitochondrie; mais aussi une nouvelle vulnérabilité pour la restauration du fort signal RAF-MEK-ERK, associé à la réinduction de sénescence cellulaire, par de nouveaux mécanismes ERK-dépendants et liés au stress nucléolaire. À cet effet, nous avons fait la découverte d'un nouveau marqueur de sénescence cellulaire, soit les foci nucléolaires associés à la sénescence (SANF) et contenant la machinerie de transcription par la Pol I. Cette nouvelle caractéristique, qui s'ajoute aux défauts de ribogénèse associés à la sénescence et à tout l'arsenal de marqueurs identifiés par notre laboratoire et par d'autres leaders de ce champ de recherche, pourra être utilisée pour identifier de plus en plus spécifiquement ce phénotype cellulaire aux implications multiples.

L'ensemble de ces mécanismes, bien qu'étudiés ici avec des modèles génétiques, sont également reproduits par la combinaison thérapeutique la plus efficace actuellement contre le cancer du pancréas, soit le FOLFIRINOX. Nous avons montré que cette combithérapie permet l'induction de sénescence cellulaire comme arme thérapeutique qui crée elle-même de nouvelles vulnérabilités pouvant être exploitées pour une approche sénolytique. Grâce aux résultats de notre criblage CRISPR-Cas9, nous pouvons donc proposer à l'issue de ces travaux la stratégie « one-two punch » combinant FOLFIRINOX et inhibiteurs de GPX4 pour provoquer la ferroptose des cellules cancéreuses pancréatiques et la régression tumorale.

À titre de perspective, au niveau fondamental, le prochain défi sera de mieux comprendre les mécanismes indépendants des voies p53/RB permettant l'induction de sénescence grâce au stress nucléolaire et si ceux-ci sont fondés sur des processus fondamentaux et conservés comme la

réponse à l'altération de la ribogénèse. Cela sera central au développement de thérapies efficaces dans le cancer pancréatique. Puis, au niveau translationnel, davantage d'efforts devront être mis en place par la communauté scientifique pour découvrir de nouvelles méthodes diagnostiques pour détecter les PanIN à un stade où ceux-ci pourraient être éliminés par sénolyse, ou encore pour découvrir de nouveaux véhicules de livraison ciblés des combinaisons thérapeutiques identifiées. Cela permettra notamment d'augmenter l'efficacité de ces traitements et de les rendre disponibles à davantage de patients en limitant les effets secondaires associés. Ainsi, en continuant nos efforts collectifs sur ces différents fronts, nous pourrons espérer diminuer les décès liés au cancer pancréatique et offrir un espoir plus grand aux familles qui en sont touchées.

## 7. Bibliographie

1. (2019) Statistique Canada. Tableau 13-10-0394-01 Les principales causes de décès, population totale, selon le groupe d'âge.
2. (2019) Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer. Statistiques canadiennes sur le cancer 2019. Toronto (Ontario).
3. Roder, P. V., Wu, B., Liu, Y., and Han, W. (2016) Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med* **48**, e219
4. Fesinmeyer, M. D., Austin, M. A., Li, C. I., De Roos, A. J., and Bowen, D. J. (2005) Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 1766-1773
5. Pandol, S. J. (2010). in *The Exocrine Pancreas*, San Rafael (CA). pp
6. Naveed, S., Qari, H., Banday, T., Altaf, A., and Para, M. (2014) Mucinous Cystic Neoplasms of Pancreas. *Gastroenterology Res* **7**, 44-50
7. Pinho, A. V., Rooman, I., Reichert, M., De Medts, N., Bouwens, L., Rustgi, A. K., and Real, F. X. (2011) Adult pancreatic acinar cells dedifferentiate to an embryonic progenitor phenotype with concomitant activation of a senescence programme that is present in chronic pancreatitis. *Gut* **60**, 958-966
8. Hruban, R. H., Takaori, K., Klimstra, D. S., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Biankin, S. A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., Goggins, M., Kato, Y., Kloppel, G., Longnecker, D. S., Luttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G. J., Shimizu, M., and Yonezawa, S. (2004) An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* **28**, 977-987
9. Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., and Depinho, R. A. (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* **20**, 1218-1249
10. Bardeesy, N., and DePinho, R. A. (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* **2**, 897-909
11. Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Kern, S. E., Klimstra, D. S., Kloppel, G., Longnecker, D. S., Luttges, J., and Offerhaus, G. J. (2001) Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* **25**, 579-586
12. Kuboki, Y., Shimizu, K., Hatori, T., Yamamoto, M., Shibata, N., Shiratori, K., and Furukawa, T. (2015) Molecular biomarkers for progression of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Pancreas* **44**, 227-235

13. Fuchs, C. S., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Giovannucci, E. L., Hunter, D. J., Rimm, E. B., Willett, W. C., and Speizer, F. E. (1996) A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch Intern Med* **156**, 2255-2260
14. Berrington de Gonzalez, A., Sweetland, S., and Spencer, E. (2003) A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer* **89**, 519-523
15. Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Morselli-Labate, A. M., Maisonneuve, P., and Pezzilli, R. (2010) Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **24**, 349-358
16. Everhart, J., and Wright, D. (1995) Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* **273**, 1605-1609
17. Schenk, M., Schwartz, A. G., O'Neal, E., Kinnard, M., Greenson, J. K., Fryzek, J. P., Ying, G. S., and Garabrant, D. H. (2001) Familial risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* **93**, 640-644
18. Roberts, N. J., Norris, A. L., Petersen, G. M., Bondy, M. L., Brand, R., Gallinger, S., Kurtz, R. C., Olson, S. H., Rustgi, A. K., Schwartz, A. G., Stoffel, E., Syngal, S., Zogopoulos, G., Ali, S. Z., Axilbund, J., Chaffee, K. G., Chen, Y. C., Cote, M. L., Childs, E. J., Douville, C., Goes, F. S., Herman, J. M., Iacobuzio-Donahue, C., Kramer, M., Makohon-Moore, A., McCombie, R. W., McMahon, K. W., Niknafs, N., Parla, J., Pirooznia, M., Potash, J. B., Rhim, A. D., Smith, A. L., Wang, Y., Wolfgang, C. L., Wood, L. D., Zandi, P. P., Goggins, M., Karchin, R., Eshleman, J. R., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Hruban, R. H., and Klein, A. P. (2016) Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* **6**, 166-175
19. Gomez-Rubio, P., Zock, J. P., Rava, M., Marquez, M., Sharp, L., Hidalgo, M., Carrato, A., Ilzarbe, L., Michalski, C., Molero, X., Farre, A., Perea, J., Greenhalf, W., O'Rorke, M., Tardon, A., Gress, T., Barbera, V., Crnogorac-Jurcevic, T., Dominguez-Munoz, E., Munoz-Bellvis, L., Alvarez-Urturi, C., Balcells, J., Barneo, L., Costello, E., Guillen-Ponce, C., Kleeff, J., Kong, B., Lawlor, R., Lohr, M., Mora, J., Murray, L., O'Driscoll, D., Pelaez, P., Poves, I., Scarpa, A., Real, F. X., Malats, N., and PanGen, E. U. S. I. (2017) Reduced risk of pancreatic cancer associated with asthma and nasal allergies. *Gut* **66**, 314-322
20. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address, a. a. d. h. e., and Cancer Genome Atlas Research, N. (2017) Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **32**, 185-203 e113
21. Witkiewicz, A. K., McMillan, E. A., Balaji, U., Baek, G., Lin, W. C., Mansour, J., Mollae, M., Wagner, K. U., Koduru, P., Yopp, A., Choti, M. A., Yeo, C. J., McCue, P., White, M. A., and Knudsen, E. S. (2015) Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* **6**, 6744

22. Schutte, M., Hruban, R. H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S. K., Moskaluk, C. A., Hahn, S. A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., Baylin, S. B., Kern, S. E., and Herman, J. G. (1997) Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* **57**, 3126-3130
23. David, C. J., Huang, Y. H., Chen, M., Su, J., Zou, Y., Bardeesy, N., Jacobuzio-Donahue, C. A., and Massague, J. (2016) TGF-beta Tumor Suppression through a Lethal EMT. *Cell* **164**, 1015-1030
24. Xia, X., Wu, W., Huang, C., Cen, G., Jiang, T., Cao, J., Huang, K., and Qiu, Z. (2015) SMAD4 and its role in pancreatic cancer. *Tumour Biol* **36**, 111-119
25. Smit, V. T., Boot, A. J., Smits, A. M., Fleuren, G. J., Cornelisse, C. J., and Bos, J. L. (1988) KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* **16**, 7773-7782
26. Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., and Perucho, M. (1988) Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53**, 549-554
27. Moskaluk, C. A., Hruban, R. H., and Kern, S. E. (1997) p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **57**, 2140-2143
28. Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S. M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R. H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Goggins, M. (2012) Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* **142**, 730-733 e739
29. Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L. A., Crawford, H. C., Putt, M. E., Jacks, T., Wright, C. V., Hruban, R. H., Lowy, A. M., and Tuveson, D. A. (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437-450
30. Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., Rustgi, A. K., Chang, S., and Tuveson, D. A. (2005) Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**, 469-483
31. Aguirre, A. J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D. A., Horner, J., Redston, M. S., and DePinho, R. A. (2003) Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* **17**, 3112-3126
32. Kojima, K., Vickers, S. M., Adsay, N. V., Jhala, N. C., Kim, H. G., Schoeb, T. R., Grizzle, W. E., and Klug, C. A. (2007) Inactivation of Smad4 accelerates Kras(G12D)-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer Res* **67**, 8121-8130



33. Deschenes-Simard, X., Parisotto, M., Rowell, M. C., Le Calve, B., Igelmann, S., Moineau-Vallee, K., Saint-Germain, E., Kalegari, P., Bourdeau, V., Kottakis, F., Bardeesy, N., and Ferbeyre, G. (2019) Circumventing senescence is associated with stem cell properties and metformin sensitivity. *Aging Cell* **18**, e12889
34. Su, G. H., Hruban, R. H., Bansal, R. K., Bova, G. S., Tang, D. J., Shekher, M. C., Westerman, A. M., Entius, M. M., Goggins, M., Yeo, C. J., and Kern, S. E. (1999) Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol* **154**, 1835-1840
35. Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A. M., Gingras, M. C., Miller, D. K., Christ, A. N., Bruxner, T. J., Quinn, M. C., Nourse, C., Murtaugh, L. C., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourbakhsh, E., Wani, S., Fink, L., Holmes, O., Chin, V., Anderson, M. J., Kazakoff, S., Leonard, C., Newell, F., Waddell, N., Wood, S., Xu, Q., Wilson, P. J., Cloonan, N., Kassahn, K. S., Taylor, D., Quek, K., Robertson, A., Pantano, L., Mincarelli, L., Sanchez, L. N., Evers, L., Wu, J., Pinese, M., Cowley, M. J., Jones, M. D., Colvin, E. K., Nagrial, A. M., Humphrey, E. S., Chantrill, L. A., Mawson, A., Humphris, J., Chou, A., Pajic, M., Scarlett, C. J., Pinho, A. V., Giry-Laterriere, M., Rooman, I., Samra, J. S., Kench, J. G., Lovell, J. A., Merrett, N. D., Toon, C. W., Epari, K., Nguyen, N. Q., Barbour, A., Zeps, N., Moran-Jones, K., Jamieson, N. B., Graham, J. S., Duthie, F., Oien, K., Hair, J., Grutzmann, R., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Wolfgang, C. L., Morgan, R. A., Lawlor, R. T., Corbo, V., Bassi, C., Rusev, B., Capelli, P., Salvia, R., Tortora, G., Mukhopadhyay, D., Petersen, G. M., Australian Pancreatic Cancer Genome, I., Munzy, D. M., Fisher, W. E., Karim, S. A., Eshleman, J. R., Hruban, R. H., Pilarsky, C., Morton, J. P., Sansom, O. J., Scarpa, A., Musgrove, E. A., Bailey, U. M., Hofmann, O., Sutherland, R. L., Wheeler, D. A., Gill, A. J., Gibbs, R. A., Pearson, J. V., Waddell, N., Biankin, A. V., and Grimmond, S. M. (2016) Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531**, 47-52
36. Kapoor, A., Yao, W., Ying, H., Hua, S., Liewen, A., Wang, Q., Zhong, Y., Wu, C. J., Sadanandam, A., Hu, B., Chang, Q., Chu, G. C., Al-Khalil, R., Jiang, S., Xia, H., Fletcher-Sananikone, E., Lim, C., Horwitz, G. I., Viale, A., Pettazzoni, P., Sanchez, N., Wang, H., Protopopov, A., Zhang, J., Heffernan, T., Johnson, R. L., Chin, L., Wang, Y. A., Draetta, G., and DePinho, R. A. (2014) Yap1 activation enables bypass of oncogenic Kras addiction in pancreatic cancer. *Cell* **158**, 185-197
37. Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., Hong, S. M., Fu, B., Lin, M. T., Calhoun, E. S., Kamiyama, M., Walter, K., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Hartigan, J., Smith, D. R., Hidalgo, M., Leach, S. D., Klein, A. P., Jaffee, E. M., Goggins, M., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C., Eshleman, J. R., Kern, S. E., Hruban, R. H., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E., and Kinzler, K. W. (2008) Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**, 1801-1806

38. Espiau-Romera, P., Courtois, S., Parejo-Alonso, B., and Sancho, P. (2020) Molecular and Metabolic Subtypes Correspondence for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Classification. *J Clin Med* **9**
39. Lomberk, G., Blum, Y., Nicolle, R., Nair, A., Gaonkar, K. S., Marisa, L., Mathison, A., Sun, Z., Yan, H., Elarouci, N., Armenoult, L., Ayadi, M., Ordog, T., Lee, J. H., Oliver, G., Klee, E., Moutardier, V., Gayet, O., Bian, B., Duconseil, P., Gilabert, M., Bigonnet, M., Garcia, S., Turrini, O., Delpero, J. R., Giovannini, M., Grandval, P., Gasmi, M., Secq, V., De Reynies, A., Dusetti, N., Iovanna, J., and Urrutia, R. (2018) Distinct epigenetic landscapes underlie the pathobiology of pancreatic cancer subtypes. *Nat Commun* **9**, 1978
40. Waddell, N., Pajic, M., Patch, A. M., Chang, D. K., Kassahn, K. S., Bailey, P., Johns, A. L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., Quinn, M. C., Robertson, A. J., Fadlullah, M. Z., Bruxner, T. J., Christ, A. N., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Wani, S., Wilson, P. J., Markham, E., Cloonan, N., Anderson, M. J., Fink, J. L., Holmes, O., Kazakoff, S. H., Leonard, C., Newell, F., Poudel, B., Song, S., Taylor, D., Waddell, N., Wood, S., Xu, Q., Wu, J., Pinese, M., Cowley, M. J., Lee, H. C., Jones, M. D., Nagrial, A. M., Humphris, J., Chantrill, L. A., Chin, V., Steinmann, A. M., Mawson, A., Humphrey, E. S., Colvin, E. K., Chou, A., Scarlett, C. J., Pinho, A. V., Giry-Laterriere, M., Rooman, I., Samra, J. S., Kench, J. G., Pettitt, J. A., Merrett, N. D., Toon, C., Epari, K., Nguyen, N. Q., Barbour, A., Zeps, N., Jamieson, N. B., Graham, J. S., Niclou, S. P., Bjerkgvig, R., Grutzmann, R., Aust, D., Hruban, R. H., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Wolfgang, C. L., Morgan, R. A., Lawlor, R. T., Corbo, V., Bassi, C., Falconi, M., Zamboni, G., Tortora, G., Tempero, M. A., Australian Pancreatic Cancer Genome, I., Gill, A. J., Eshleman, J. R., Pilarsky, C., Scarpa, A., Musgrove, E. A., Pearson, J. V., Biankin, A. V., and Grimmond, S. M. (2015) Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **518**, 495-501
41. Collisson, E. A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W. J., Truitt, M., Gu, S., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G. E., Jakkula, L., Feiler, H. S., Ko, A. H., Olshen, A. B., Danenberg, K. L., Tempero, M. A., Spellman, P. T., Hanahan, D., and Gray, J. W. (2011) Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* **17**, 500-503
42. Chan-Seng-Yue, M., Kim, J. C., Wilson, G. W., Ng, K., Figueroa, E. F., O'Kane, G. M., Connor, A. A., Denroche, R. E., Grant, R. C., McLeod, J., Wilson, J. M., Jang, G. H., Zhang, A., Dodd, A., Liang, S. B., Borgida, A., Chadwick, D., Kalimuthu, S., Lungu, I., Bartlett, J. M. S., Krzyzanowski, P. M., Sandhu, V., Tiriach, H., Froeling, F. E. M., Karasinska, J. M., Topham, J. T., Renouf, D. J., Schaeffer, D. F., Jones, S. J. M., Marra, M. A., Laskin, J., Chetty, R., Stein, L. D., Zogopoulos, G., Haibe-Kains, B., Campbell, P. J., Tuveson, D. A., Knox, J. J., Fischer, S. E., Gallinger, S., and Notta, F. (2020) Transcription phenotypes of pancreatic cancer are driven by genomic events during tumor evolution. *Nat Genet* **52**, 231-240
43. Dijk, F., Veenstra, V. L., Soer, E. C., Dings, M. P. G., Zhao, L., Halfwerk, J. B., Hooijer, G. K., Damhofer, H., Marzano, M., Steins, A., Waasdorp, C., Busch, O. R., Besselink, M.

- G., Tol, J. A., Welling, L., van Rijssen, L. B., Klompmaker, S., Wilmink, H. W., van Laarhoven, H. W., Medema, J. P., Vermeulen, L., van Hooff, S. R., Koster, J., Verheij, J., van de Vijver, M. J., Wang, X., and Bijlsma, M. F. (2020) Unsupervised class discovery in pancreatic ductal adenocarcinoma reveals cell-intrinsic mesenchymal features and high concordance between existing classification systems. *Sci Rep* **10**, 337
44. Nicolle, R., Blum, Y., Duconseil, P., Vanbrugge, C., Brandone, N., Poizat, F., Roques, J., Bigonnet, M., Gayet, O., Rubis, M., Elarouci, N., Armenoult, L., Ayadi, M., de Reynies, A., Giovannini, M., Grandval, P., Garcia, S., Canivet, C., Cros, J., Bournet, B., Buscail, L., Consortium, B., Moutardier, V., Gilibert, M., Iovanna, J., and Dusetti, N. (2020) Establishment of a pancreatic adenocarcinoma molecular gradient (PAMG) that predicts the clinical outcome of pancreatic cancer. *EBioMedicine* **57**, 102858
  45. Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J. M., Dell'antonio, G., Mautner, J., Tonon, G., Haigis, M., Shirihai, O. S., Doglioni, C., Bardeesy, N., and Kimmelman, A. C. (2011) Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* **25**, 717-729
  46. Perera, R. M., Stoykova, S., Nicolay, B. N., Ross, K. N., Fitamant, J., Boukhali, M., Lengrand, J., Deshpande, V., Selig, M. K., Ferrone, C. R., Settleman, J., Stephanopoulos, G., Dyson, N. J., Zoncu, R., Ramaswamy, S., Haas, W., and Bardeesy, N. (2015) Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature* **524**, 361-365
  47. Commisso, C., Davidson, S. M., Soydaner-Azeloglu, R. G., Parker, S. J., Kamphorst, J. J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J. A., Thompson, C. B., Rabinowitz, J. D., Metallo, C. M., Vander Heiden, M. G., and Bar-Sagi, D. (2013) Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* **497**, 633-637
  48. Lengyel, E., Makowski, L., DiGiovanni, J., and Kolonin, M. G. (2018) Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. *Trends Cancer* **4**, 374-384
  49. Kamphorst, J. J., Cross, J. R., Fan, J., de Stanchina, E., Mathew, R., White, E. P., Thompson, C. B., and Rabinowitz, J. D. (2013) Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 8882-8887
  50. Cai, Z., Liang, Y., Xing, C., Wang, H., Hu, P., Li, J., Huang, H., Wang, W., and Jiang, C. (2019) Cancer-associated adipocytes exhibit distinct phenotypes and facilitate tumor progression in pancreatic cancer. *Oncol Rep* **42**, 2537-2549
  51. Kubo, M., Gotoh, K., Eguchi, H., Kobayashi, S., Iwagami, Y., Tomimaru, Y., Akita, H., Asaoka, T., Noda, T., Takeda, Y., Tanemura, M., Mori, M., and Doki, Y. (2020) Impact of CD36 on Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* **27**, 610-619

52. Zaidi, N., Lupien, L., Kuemmerle, N. B., Kinlaw, W. B., Swinnen, J. V., and Smans, K. (2013) Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Prog Lipid Res* **52**, 585-589
53. Kamphorst, J. J., Nofal, M., Commisso, C., Hackett, S. R., Lu, W., Grabocka, E., Vander Heiden, M. G., Miller, G., Drebin, J. A., Bar-Sagi, D., Thompson, C. B., and Rabinowitz, J. D. (2015) Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer Res* **75**, 544-553
54. Son, J., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., Perera, R. M., Ferrone, C. R., Mullarky, E., Shyh-Chang, N., Kang, Y., Fleming, J. B., Bardeesy, N., Asara, J. M., Haigis, M. C., DePinho, R. A., Cantley, L. C., and Kimmelman, A. C. (2013) Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* **496**, 101-105
55. Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J. W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J. L., Yan, H., Wang, W., Chen, S., Viale, A., Zheng, H., Paik, J. H., Lim, C., Guimaraes, A. R., Martin, E. S., Chang, J., Hezel, A. F., Perry, S. R., Hu, J., Gan, B., Xiao, Y., Asara, J. M., Weissleder, R., Wang, Y. A., Chin, L., Cantley, L. C., and DePinho, R. A. (2012) Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* **149**, 656-670
56. Santana-Codina, N., Roeth, A. A., Zhang, Y., Yang, A., Mashadova, O., Asara, J. M., Wang, X., Bronson, R. T., Lyssiotis, C. A., Ying, H., and Kimmelman, A. C. (2018) Oncogenic KRAS supports pancreatic cancer through regulation of nucleotide synthesis. *Nat Commun* **9**, 4945
57. Sousa, C. M., Biancur, D. E., Wang, X., Halbrook, C. J., Sherman, M. H., Zhang, L., Kremer, D., Hwang, R. F., Witkiewicz, A. K., Ying, H., Asara, J. M., Evans, R. M., Cantley, L. C., Lyssiotis, C. A., and Kimmelman, A. C. (2016) Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature* **536**, 479-483
58. Sancho, P., Burgos-Ramos, E., Tavera, A., Kheir, T. B., Jagust, P., Schoenhals, M., Barneda, D., Sellers, K., Campos-Olivas, R., Grana, O., Viera, C. R., Yuneva, M., Sainz, B., and Heeschen, C. (2015) MYC/PGC-1 alpha Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metabolism* **22**, 590-605
59. Guillaumond, F., Bidaut, G., Ouaisi, M., Servais, S., Gouirand, V., Olivares, O., Lac, S., Borge, L., Roques, J., Gayet, O., Pinault, M., Guimaraes, C., Nigri, J., Loncle, C., Lavaut, M. N., Garcia, S., Tailleux, A., Staels, B., Calvo, E., Tomasini, R., Iovanna, J. L., and Vasseur, S. (2015) Cholesterol uptake disruption, in association with chemotherapy, is a promising combined metabolic therapy for pancreatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 2473-2478
60. Gabitova-Cornell, L., Surumbayeva, A., Peri, S., Franco-Barraza, J., Restifo, D., Weitz, N., Ogier, C., Goldman, A. R., Hartman, T. R., Francescone, R., Tan, Y., Nicolas, E., Shah, N.,

- Handorf, E. A., Cai, K. Q., O'Reilly, A. M., Sloma, I., Chiaverelli, R., Moffitt, R. A., Khazak, V., Fang, C. Y., Golemis, E. A., Cukierman, E., and Astsaturov, I. (2020) Cholesterol Pathway Inhibition Induces TGF-beta Signaling to Promote Basal Differentiation in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **38**, 567-583 e511
61. Daemen, A., Peterson, D., Sahu, N., McCord, R., Du, X., Liu, B., Kowanetz, K., Hong, R., Moffat, J., Gao, M., Boudreau, A., Mroue, R., Corson, L., O'Brien, T., Qing, J., Sampath, D., Merchant, M., Yauch, R., Manning, G., Settleman, J., Hatzivassiliou, G., and Evangelista, M. (2015) Metabolite profiling stratifies pancreatic ductal adenocarcinomas into subtypes with distinct sensitivities to metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E4410-4417
  62. Mehla, K., and Singh, P. K. (2020) Metabolic Subtyping for Novel Personalized Therapies Against Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* **26**, 6-8
  63. Yu, M., Zhou, Q., Zhou, Y., Fu, Z., Tan, L., Ye, X., Zeng, B., Gao, W., Zhou, J., Liu, Y., Li, Z., Lin, Y., Lin, Q., and Chen, R. (2015) Metabolic phenotypes in pancreatic cancer. *PLoS One* **10**, e0115153
  64. Huang, L., Desai, R., Conrad, D. N., Leite, N. C., Akshinthala, D., Lim, C. M., Gonzalez, R., Muthuswamy, L. B., Gartner, Z., and Muthuswamy, S. K. (2021) Commitment and oncogene-induced plasticity of human stem cell-derived pancreatic acinar and ductal organoids. *Cell Stem Cell* **28**, 1090-1104 e1096
  65. Viale, A., Pettazoni, P., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Sanchez, N., Marchesini, M., Carugo, A., Green, T., Seth, S., Giuliani, V., Kost-Alimova, M., Muller, F., Colla, S., Nezi, L., Genovese, G., Deem, A. K., Kapoor, A., Yao, W., Brunetto, E., Kang, Y., Yuan, M., Asara, J. M., Wang, Y. A., Heffernan, T. P., Kimmelman, A. C., Wang, H., Fleming, J. B., Cantley, L. C., DePinho, R. A., and Draetta, G. F. (2014) Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* **514**, 628-632
  66. Hou, P., Kapoor, A., Zhang, Q., Li, J., Wu, C. J., Li, J., Lan, Z., Tang, M., Ma, X., Ackroyd, J. J., Kalluri, R., Zhang, J., Jiang, S., Spring, D. J., Wang, Y. A., and DePinho, R. A. (2020) Tumor Microenvironment Remodeling Enables Bypass of Oncogenic KRAS Dependency in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* **10**, 1058-1077
  67. Singh, A., Greninger, P., Rhodes, D., Koopman, L., Violette, S., Bardeesy, N., and Settleman, J. (2009) A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* **15**, 489-500
  68. Cobb, M. H., Boulton, T. G., and Robbins, D. J. (1991) Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul* **2**, 965-978
  69. Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**, 431-442

70. Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993) Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* **363**, 85-88
71. Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P., and Marshall, C. J. (1992) Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* **71**, 335-342
72. Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J., and Sturgill, T. W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* **10**, 885-892
73. Haystead, T. A., Dent, P., Wu, J., Haystead, C. M., and Sturgill, T. W. (1992) Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett* **306**, 17-22
74. Roskoski, R., Jr. (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* **66**, 105-143
75. Lavoie, H., Gagnon, J., and Therrien, M. (2020) ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 607-632
76. Wu, Q., Wu, W., Fu, B., Shi, L., Wang, X., and Kuca, K. (2019) JNK signaling in cancer cell survival. *Med Res Rev* **39**, 2082-2104
77. Davies, C. C., Harvey, E., McMahon, R. F., Finegan, K. G., Connor, F., Davis, R. J., Tuveson, D. A., and Tournier, C. (2014) Impaired JNK signaling cooperates with KrasG12D expression to accelerate pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* **74**, 3344-3356
78. Martinez-Limon, A., Joaquin, M., Caballero, M., Posas, F., and de Nadal, E. (2020) The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* **21**
79. Hu, H., Han, T., Zhuo, M., Wu, L. L., Yuan, C., Wu, L., Lei, W., Jiao, F., and Wang, L. W. (2017) Elevated COX-2 Expression Promotes Angiogenesis Through EGFR/p38-MAPK/Sp1-Dependent Signalling in Pancreatic Cancer. *Sci Rep* **7**, 470
80. Taniuchi, K., Furihata, M., Hanazaki, K., Iwasaki, S., Tanaka, K., Shimizu, T., Saito, M., and Saibara, T. (2015) Peroxiredoxin 1 promotes pancreatic cancer cell invasion by modulating p38 MAPK activity. *Pancreas* **44**, 331-340
81. Francescone, R., Barbosa Vendramini-Costa, D., Franco-Barraza, J., Wagner, J., Muir, A., Lau, A. N., Gabitova, L., Pazina, T., Gupta, S., Luong, T., Rollins, D., Malik, R., Thapa, R. J., Restifo, D., Zhou, Y., Cai, K. Q., Hensley, H. H., Tan, Y., Kruger, W. D., Devarajan, K., Balachandran, S., Klein-Szanto, A. J., Wang, H., El-Deiry, W. S., Vander Heiden, M. G., Peri, S., Campbell, K. S., Astsaturov, I., and Cukierman, E. (2021) Netrin G1 Promotes

- Pancreatic Tumorigenesis through Cancer-Associated Fibroblast-Driven Nutritional Support and Immunosuppression. *Cancer Discov* **11**, 446-479
82. Coulombe, P., and Meloche, S. (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1376-1387
  83. Groehler, A. L., and Lannigan, D. A. (2010) A chromatin-bound kinase, ERK8, protects genomic integrity by inhibiting HDM2-mediated degradation of the DNA clamp PCNA. *J Cell Biol* **190**, 575-586
  84. Vaseva, A. V., Blake, D. R., Gilbert, T. S. K., Ng, S., Hostetter, G., Azam, S. H., Ozkan-Dagliyan, I., Gautam, P., Bryant, K. L., Pearce, K. H., Herring, L. E., Han, H., Graves, L. M., Witkiewicz, A. K., Knudsen, E. S., Pecot, C. V., Rashid, N., Houghton, P. J., Wennerberg, K., Cox, A. D., and Der, C. J. (2018) KRAS Suppression-Induced Degradation of MYC Is Antagonized by a MEK5-ERK5 Compensatory Mechanism. *Cancer Cell* **34**, 807-822 e807
  85. Gupta, S., Ramjaun, A. R., Haiko, P., Wang, Y., Warne, P. H., Nicke, B., Nye, E., Stamp, G., Alitalo, K., and Downward, J. (2007) Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell* **129**, 957-968
  86. Castellano, E., and Downward, J. (2011) RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* **2**, 261-274
  87. Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Pandolfi, P. P. (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**, 179-193
  88. Carriere, A., Romeo, Y., Acosta-Jaquez, H. A., Moreau, J., Bonneil, E., Thibault, P., Fingar, D. C., and Roux, P. P. (2011) ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem* **286**, 567-577
  89. Yan, C., and Theodorescu, D. (2018) RAL GTPases: Biology and Potential as Therapeutic Targets in Cancer. *Pharmacol Rev* **70**, 1-11
  90. Beel, S., Kolloch, L., Apken, L. H., Jurgens, L., Bolle, A., Sudhof, N., Ghosh, S., Wardelmann, E., Meisterernst, M., Steinestel, K., and Oeckinghaus, A. (2020) kappaB-Ras and Ral GTPases regulate acinar to ductal metaplasia during pancreatic adenocarcinoma development and pancreatitis. *Nat Commun* **11**, 3409
  91. Neel, N. F., Rossman, K. L., Martin, T. D., Hayes, T. K., Yeh, J. J., and Der, C. J. (2012) The RalB small GTPase mediates formation of invadopodia through a GTPase-activating protein-independent function of the RalBP1/RLIP76 effector. *Mol Cell Biol* **32**, 1374-1386
  92. Yoon, S., and Seger, R. (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44

93. O'Donnell, A., Odrowaz, Z., and Sharrocks, A. D. (2012) Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don't we know? *Biochem Soc Trans* **40**, 58-66
94. Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C., and Blenis, J. (2002) Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* **4**, 556-564
95. Doehn, U., Hauge, C., Frank, S. R., Jensen, C. J., Duda, K., Nielsen, J. V., Cohen, M. S., Johansen, J. V., Winther, B. R., Lund, L. R., Winther, O., Taunton, J., Hansen, S. H., and Frodin, M. (2009) RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. *Mol Cell* **35**, 511-522
96. Roux, P. P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M. K., Cohen, M. S., Taunton, J., Sonenberg, N., and Blenis, J. (2007) RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* **282**, 14056-14064
97. Smith, J. A., Poteet-Smith, C. E., Xu, Y., Errington, T. M., Hecht, S. M., and Lannigan, D. A. (2005) Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Res* **65**, 1027-1034
98. Berns, K., Hijmans, E. M., Mullenders, J., Brummelkamp, T. R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R. M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P. S., Beijersbergen, R. L., and Bernards, R. (2004) A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* **428**, 431-437
99. Lopez-Vicente, L., Armengol, G., Pons, B., Coch, L., Argelaguet, E., Lleonart, M., Hernandez-Losa, J., de Torres, I., and Ramon y Cajal, S. (2009) Regulation of replicative and stress-induced senescence by RSK4, which is down-regulated in human tumors. *Clin Cancer Res* **15**, 4546-4553
100. Bignone, P. A., Lee, K. Y., Liu, Y., Emilion, G., Finch, J., Soosay, A. E., Charnock, F. M., Beck, S., Dunham, I., Mungall, A. J., and Ganesan, T. S. (2007) RPS6KA2, a putative tumour suppressor gene at 6q27 in sporadic epithelial ovarian cancer. *Oncogene* **26**, 683-700
101. Ghoda, L., Lin, X., and Greene, W. C. (1997) The 90-kDa ribosomal S6 kinase (pp90rsk) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha and stimulates its degradation in vitro. *J Biol Chem* **272**, 21281-21288
102. Ananieva, O., Darragh, J., Johansen, C., Carr, J. M., McIlrath, J., Park, J. M., Wingate, A., Monk, C. E., Toth, R., Santos, S. G., Iversen, L., and Arthur, J. S. (2008) The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* **9**, 1028-1036



103. Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003) Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J* **22**, 1313-1324
104. Zhang, Y., Liu, G., and Dong, Z. (2001) MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells. *J Biol Chem* **276**, 42534-42542
105. Wiggin, G. R., Soloaga, A., Foster, J. M., Murray-Tait, V., Cohen, P., and Arthur, J. S. (2002) MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol* **22**, 2871-2881
106. Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R., Rampersaud, N., Dyson, M. H., Hazzalin, C. A., Mahadevan, L. C., and Arthur, J. S. (2003) MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J* **22**, 2788-2797
107. Knauf, U., Tschopp, C., and Gram, H. (2001) Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Mol Cell Biol* **21**, 5500-5511
108. DaSilva, J., Xu, L., Kim, H. J., Miller, W. T., and Bar-Sagi, D. (2006) Regulation of sprouty stability by Mnk1-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* **26**, 1898-1907
109. Wendel, H. G., Silva, R. L., Malina, A., Mills, J. R., Zhu, H., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., Teruya-Feldstein, J., Pelletier, J., and Lowe, S. W. (2007) Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev* **21**, 3232-3237
110. Knight, J. R. P., Alexandrou, C., Skalka, G. L., Vlahov, N., Pennel, K., Officer, L., Teodosio, A., Kanellos, G., Gay, D. M., May-Wilson, S., Smith, E. M., Najumudeen, A. K., Gilroy, K., Ridgway, R. A., Flanagan, D. J., Smith, R. C. L., McDonald, L., MacKay, C., Cheasty, A., McArthur, K., Stanway, E., Leach, J. D., Jackstadt, R., Waldron, J. A., Campbell, A. D., Vlachogiannis, G., Valeri, N., Haigis, K. M., Sonenberg, N., Proud, C. G., Jones, N. P., Swarbrick, M. E., McKinnon, H. J., Faller, W. J., Le Quesne, J., Edwards, J., Willis, A. E., Bushell, M., and Sansom, O. J. (2021) MNK Inhibition Sensitizes KRAS-Mutant Colorectal Cancer to mTORC1 Inhibition by Reducing eIF4E Phosphorylation and c-MYC Expression. *Cancer Discov* **11**, 1228-1247
111. Stefanovsky, V. Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L. I., and Moss, T. (2001) An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* **8**, 1063-1073
112. Zhao, J., Yuan, X., Frodin, M., and Grummt, I. (2003) ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol Cell* **11**, 405-413

113. Felton-Edkins, Z. A., Fairley, J. A., Graham, E. L., Johnston, I. M., White, R. J., and Scott, P. H. (2003) The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIB. *EMBO J* **22**, 2422-2432
114. Sriskanthadevan-Pirahas, S., Deshpande, R., Lee, B., and Grewal, S. S. (2018) Ras/ERK-signalling promotes tRNA synthesis and growth via the RNA polymerase III repressor Maf1 in *Drosophila*. *PLoS Genet* **14**, e1007202
115. Oelgeschlager, T. (2002) Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *J Cell Physiol* **190**, 160-169
116. Therrien, M., Michaud, N. R., Rubin, G. M., and Morrison, D. K. (1996) KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes Dev* **10**, 2684-2695
117. Tohgo, A., Choy, E. W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K. L., Laporte, S., Oakley, R. H., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M. (2003) The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* **278**, 6258-6267
118. Schaeffer, H. J., Catling, A. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A., and Weber, M. J. (1998) MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* **281**, 1668-1671
119. Roy, M., Li, Z., and Sacks, D. B. (2004) IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. *J Biol Chem* **279**, 17329-17337
120. Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z. X., and Cantley, L. G. (2004) Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Mol Cell* **16**, 257-267
121. Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., Mishall, P., Sahu, S., and Singh, R. (2013) Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nat Commun* **4**, 2799
122. Santos, E., and Crespo, P. (2018) The RAS-ERK pathway: A route for couples. *Sci Signal* **11**
123. Khokhlatchev, A. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., and Cobb, M. H. (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**, 605-615
124. Casar, B., Pinto, A., and Crespo, P. (2008) Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Mol Cell* **31**, 708-721
125. Herrero, A., Pinto, A., Colon-Bolea, P., Casar, B., Jones, M., Agudo-Ibanez, L., Vidal, R., Tenbaum, S. P., Nuciforo, P., Valdizan, E. M., Horvath, Z., Orfi, L., Pineda-Lucena, A., Bony, E., Keri, G., Rivas, G., Pazos, A., Gozalbes, R., Palmer, H. G., Hurlstone, A., and

- Crespo, P. (2015) Small Molecule Inhibition of ERK Dimerization Prevents Tumorigenesis by RAS-ERK Pathway Oncogenes. *Cancer Cell* **28**, 170-182
126. Formstecher, E., Ramos, J. W., Fauquet, M., Calderwood, D. A., Hsieh, J. C., Canton, B., Nguyen, X. T., Barnier, J. V., Camonis, J., Ginsberg, M. H., and Chneiweiss, H. (2001) PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell* **1**, 239-250
127. Gaumont-Leclerc, M. F., Mukhopadhyay, U. K., Goumard, S., and Ferbeyre, G. (2004) PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *J Biol Chem* **279**, 46802-46809
128. Plotnikov, A., Chuderland, D., Karamansha, Y., Livnah, O., and Seger, R. (2019) Nuclear ERK Translocation is Mediated by Protein Kinase CK2 and Accelerated by Autophosphorylation. *Cell Physiol Biochem* **53**, 366-387
129. Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E. (2000) Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol* **148**, 849-856
130. Kidger, A. M., and Keyse, S. M. (2016) The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Semin Cell Dev Biol* **50**, 125-132
131. Stowe, I. B., Mercado, E. L., Stowe, T. R., Bell, E. L., Oses-Prieto, J. A., Hernandez, H., Burlingame, A. L., and McCormick, F. (2012) A shared molecular mechanism underlies the human rasopathies Legius syndrome and Neurofibromatosis-1. *Genes Dev* **26**, 1421-1426
132. Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K. D., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M., and Kolch, W. (1999) Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* **401**, 173-177
133. Guy, G. R., Jackson, R. A., Yusoff, P., and Chow, S. Y. (2009) Sprouty proteins: modified modulators, matchmakers or missing links? *J Endocrinol* **203**, 191-202
134. Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333-338
135. Cisowski, J., Sayin, V. I., Liu, M., Karlsson, C., and Bergo, M. O. (2016) Oncogene-induced senescence underlies the mutual exclusive nature of oncogenic KRAS and BRAF. *Oncogene* **35**, 1328-1333
136. Marshall, C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-185

137. Murphy, L. O., and Blenis, J. (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* **31**, 268-275
138. De, S., Campbell, C., Venkitaraman, A. R., and Esposito, A. (2020) Pulsatile MAPK Signaling Modulates p53 Activity to Control Cell Fate Decisions at the G2 Checkpoint for DNA Damage. *Cell Rep* **30**, 2083-2093 e2085
139. Markevich, N. I., Hoek, J. B., and Kholodenko, B. N. (2004) Signaling switches and bistability arising from multisite phosphorylation in protein kinase cascades. *J Cell Biol* **164**, 353-359
140. Hayes, T. K., Neel, N. F., Hu, C., Gautam, P., Chenard, M., Long, B., Aziz, M., Kassner, M., Bryant, K. L., Pierobon, M., Marayati, R., Kher, S., George, S. D., Xu, M., Wang-Gillam, A., Samatar, A. A., Maitra, A., Wennerberg, K., Petricoin, E. F., 3rd, Yin, H. H., Nelkin, B., Cox, A. D., Yeh, J. J., and Der, C. J. (2016) Long-Term ERK Inhibition in KRAS-Mutant Pancreatic Cancer Is Associated with MYC Degradation and Senescence-like Growth Suppression. *Cancer Cell* **29**, 75-89
141. Morris, E. J., Jha, S., Restaino, C. R., Dayananth, P., Zhu, H., Cooper, A., Carr, D., Deng, Y., Jin, W., Black, S., Long, B., Liu, J., Dinunzio, E., Windsor, W., Zhang, R., Zhao, S., Angagaw, M. H., Pinheiro, E. M., Desai, J., Xiao, L., Shipps, G., Hruza, A., Wang, J., Kelly, J., Paliwal, S., Gao, X., Babu, B. S., Zhu, L., Daublain, P., Zhang, L., Lutterbach, B. A., Pelletier, M. R., Philippar, U., Siliphaivanh, P., Witter, D., Kirschmeier, P., Bishop, W. R., Hicklin, D., Gilliland, D. G., Jayaraman, L., Zawel, L., Fawell, S., and Samatar, A. A. (2013) Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov* **3**, 742-750
142. Ozkan-Dagliyan, I., Diehl, J. N., George, S. D., Schaefer, A., Papke, B., Klotz-Noack, K., Waters, A. M., Goodwin, C. M., Gautam, P., Pierobon, M., Peng, S., Gilbert, T. S. K., Lin, K. H., Dagliyan, O., Wennerberg, K., Petricoin, E. F., 3rd, Tran, N. L., Bhagwat, S. V., Tiu, R. V., Peng, S. B., Herring, L. E., Graves, L. M., Sers, C., Wood, K. C., Cox, A. D., and Der, C. J. (2020) Low-Dose Vertical Inhibition of the RAF-MEK-ERK Cascade Causes Apoptotic Death of KRAS Mutant Cancers. *Cell Rep* **31**, 107764
143. Van Cutsem, E., Hidalgo, M., Canon, J. L., Macarulla, T., Bazin, I., Poddubskaya, E., Manojlovic, N., Radenkovic, D., Verslype, C., Raymond, E., Cubillo, A., Schueler, A., Zhao, C., and Hammel, P. (2018) Phase I/II trial of pimasertib plus gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer. *Int J Cancer* **143**, 2053-2064
144. Infante, J. R., Somer, B. G., Park, J. O., Li, C. P., Scheulen, M. E., Kasubhai, S. M., Oh, D. Y., Liu, Y., Redhu, S., Stepleski, K., and Le, N. (2014) A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of trametinib, an oral MEK inhibitor, in combination with gemcitabine for patients with untreated metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer* **50**, 2072-2081

145. Shojaee, S., Caesar, R., Buchner, M., Park, E., Swaminathan, S., Hurtz, C., Geng, H., Chan, L. N., Klemm, L., Hofmann, W. K., Qiu, Y. H., Zhang, N., Coombes, K. R., Paietta, E., Molkentin, J., Koeffler, H. P., Willman, C. L., Hunger, S. P., Melnick, A., Kornblau, S. M., and Muschen, M. (2015) Erk Negative Feedback Control Enables Pre-B Cell Transformation and Represents a Therapeutic Target in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **28**, 114-128
146. Elgendy, M., Sheridan, C., Brumatti, G., and Martin, S. J. (2011) Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell* **42**, 23-35
147. Limnander, A., Depeille, P., Freedman, T. S., Liou, J., Leitges, M., Kurosaki, T., Roose, J. P., and Weiss, A. (2011) STIM1, PKC-delta and RasGRP set a threshold for proapoptotic Erk signaling during B cell development. *Nat Immunol* **12**, 425-433
148. Kong, X., Kuilman, T., Shahrabi, A., Boshuizen, J., Kemper, K., Song, J. Y., Niessen, H. W. M., Rozeman, E. A., Geukes Foppen, M. H., Blank, C. U., and Peeper, D. S. (2017) Cancer drug addiction is relayed by an ERK2-dependent phenotype switch. *Nature* **550**, 270-274
149. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593-602
150. Shin, J., Yang, J., Lee, J. C., and Baek, K. H. (2013) Depletion of ERK2 but not ERK1 abrogates oncogenic Ras-induced senescence. *Cell Signal* **25**, 2540-2547
151. Deschenes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M. F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., Igelmann, S., Mallette, F. A., Saba-El-Leil, M. K., Meloche, S., Saad, F., Mes-Masson, A. M., and Ferbeyre, G. (2013) Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes & Development* **27**, 900-915
152. Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720-724
153. Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C. A. (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660-665
154. Sarkisian, C. J., Keister, B. A., Stairs, D. B., Boxer, R. B., Moody, S. E., and Chodosh, L. A. (2007) Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol* **9**, 493-505

155. Klomp, J. E., Klomp, J. A., and Der, C. J. (2021) The ERK mitogen-activated protein kinase signaling network: the final frontier in RAS signal transduction. *Biochem Soc Trans* **49**, 253-267
156. Amin, A. D., Rajan, S. S., Groysman, M. J., Pongtornpipat, P., and Schatz, J. H. (2015) Oncogene Overdose: Too Much of a Bad Thing for Oncogene-Addicted Cancer Cells. *Biomark Cancer* **7**, 25-32
157. Stern, D. F. (2018) Keeping Tumors Out of the MAPK Fitness Zone. *Cancer Discov* **8**, 20-23
158. Wellbrock, C. (2014) MAPK pathway inhibition in melanoma: resistance three ways. *Biochem Soc Trans* **42**, 727-732
159. Hong, A., Moriceau, G., Sun, L., Lomeli, S., Piva, M., Damoiseaux, R., Holmen, S. L., Sharpless, N. E., Hugo, W., and Lo, R. S. (2018) Exploiting Drug Addiction Mechanisms to Select against MAPKi-Resistant Melanoma. *Cancer Discov* **8**, 74-93
160. Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621
161. Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003) DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* **13**, 1549-1556
162. Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460
163. Harley, C. B. (1990) Aging of cultured human skin fibroblasts. *Methods Mol Biol* **5**, 25-32
164. He, S., and Sharpless, N. E. (2017) Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000-1011
165. Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonina, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., Kirkland, J. L., and van Deursen, J. M. (2011) Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232-236
166. McHugh, D., and Gil, J. (2018) Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol* **217**, 65-77
167. Kang, T. W., Yevesa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., Iken, M., Vucur, M., Weiss, S., Heikenwalder, M., Khan, S., Gil, J., Bruder, D., Manns, M., Schirmacher, P., Tacke, F., Ott, M., Luedde, T., Longerich, T., Kubicka, S., and Zender, L. (2011) Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547-551
168. Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S. W. (2008) Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657-667

169. Karin, O., and Alon, U. (2021) Senescent cell accumulation mechanisms inferred from parabiosis. *Geroscience* **43**, 329-341
170. Yousefzadeh, M. J., Zhao, J., Bukata, C., Wade, E. A., McGowan, S. J., Angelini, L. A., Bank, M. P., Gurkar, A. U., McGuckian, C. A., Calubag, M. F., Kato, J. I., Burd, C. E., Robbins, P. D., and Niedernhofer, L. J. (2020) Tissue specificity of senescent cell accumulation during physiologic and accelerated aging of mice. *Aging Cell* **19**, e13094
171. Tchkonina, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J., and Kirkland, J. L. (2013) Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest* **123**, 966-972
172. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R. M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dolle, M. E., Hoeijmakers, J. H., de Bruin, A., Hara, E., and Campisi, J. (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* **31**, 722-733
173. Munoz-Espin, D., Canamero, M., Maraver, A., Gomez-Lopez, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., and Serrano, M. (2013) Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**, 1104-1118
174. Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., and Keyes, W. M. (2013) Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**, 1119-1130
175. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2010) The essence of senescence. *Genes Dev* **24**, 2463-2479
176. Terzi, M. Y., Izmirlı, M., and Gogebakan, B. (2016) The cell fate: senescence or quiescence. *Mol Biol Rep* **43**, 1213-1220
177. Martinez-Zamudio, R. I., Roux, P. F., de Freitas, J., Robinson, L., Dore, G., Sun, B., Belenki, D., Milanovic, M., Herbig, U., Schmitt, C. A., Gil, J., and Bischof, O. (2020) AP-1 imprints a reversible transcriptional programme of senescent cells. *Nat Cell Biol* **22**, 842-855
178. Hernandez-Segura, A., de Jong, T. V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., and Demaria, M. (2017) Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol* **27**, 2652-2660 e2654
179. Pack, L. R., Daigh, L. H., and Meyer, T. (2019) Putting the brakes on the cell cycle: mechanisms of cellular growth arrest. *Curr Opin Cell Biol* **60**, 106-113

180. Lim, S., and Kaldis, P. (2013) Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **140**, 3079-3093
181. Lin, A. W., and Lowe, S. W. (2001) Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5025-5030
182. Ko, A., Han, S. Y., and Song, J. (2016) Dynamics of ARF regulation that control senescence and cancer. *BMB Rep* **49**, 598-606
183. Itahana, K., Bhat, K. P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., and Zhang, Y. (2003) Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* **12**, 1151-1164
184. Liu, J. Y., Souroullas, G. P., Diekman, B. O., Krishnamurthy, J., Hall, B. M., Sorrentino, J. A., Parker, J. S., Sessions, G. A., Gudkov, A. V., and Sharpless, N. E. (2019) Cells exhibiting strong p16 (INK4a) promoter activation in vivo display features of senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 2603-2611
185. Burd, C. E., Sorrentino, J. A., Clark, K. S., Darr, D. B., Krishnamurthy, J., Deal, A. M., Bardeesy, N., Castrillon, D. H., Beach, D. H., and Sharpless, N. E. (2013) Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a)-luciferase model. *Cell* **152**, 340-351
186. Omori, S., Wang, T. W., Johmura, Y., Kanai, T., Nakano, Y., Kido, T., Susaki, E. A., Nakajima, T., Shichino, S., Ueha, S., Ozawa, M., Yokote, K., Kumamoto, S., Nishiyama, A., Sakamoto, T., Yamaguchi, K., Hatakeyama, S., Shimizu, E., Katayama, K., Yamada, Y., Yamazaki, S., Iwasaki, K., Miyoshi, C., Funato, H., Yanagisawa, M., Ueno, H., Imoto, S., Furukawa, Y., Yoshida, N., Matsushima, K., Ueda, H. R., Miyajima, A., and Nakanishi, M. (2020) Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to Characterize and Target p16(high) Cells In Vivo. *Cell Metab* **32**, 814-828 e816
187. Bardeesy, N., Aguirre, A. J., Chu, G. C., Cheng, K. H., Lopez, L. V., Hezel, A. F., Feng, B., Brennan, C., Weissleder, R., Mahmood, U., Hanahan, D., Redston, M. S., Chin, L., and Depinho, R. A. (2006) Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5947-5952
188. Stein, G. H., Drullinger, L. F., Soulard, A., and Dulic, V. (1999) Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* **19**, 2109-2117
189. Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704
190. Lessard, F., Igelmann, S., Trahan, C., Huot, G., Saint-Germain, E., Mignacca, L., Del Toro, N., Lopes-Paciencia, S., Le Calve, B., Montero, M., Deschenes-Simard, X., Bury, M.,



- Moiseeva, O., Rowell, M. C., Zorca, C. E., Zenklusen, D., Brakier-Gingras, L., Bourdeau, V., Oeffinger, M., and Ferbeyre, G. (2018) Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway. *Nat Cell Biol* **20**, 789-799
191. Del Toro, N., Fernandez-Ruiz, A., Mignacca, L., Kalegari, P., Rowell, M. C., Igelmann, S., Saint-Germain, E., Benfdil, M., Lopes-Paciencia, S., Brakier-Gingras, L., Bourdeau, V., Ferbeyre, G., and Lessard, F. (2019) Ribosomal protein RPL22/eL22 regulates the cell cycle by acting as an inhibitor of the CDK4-cyclin D complex. *Cell Cycle* **18**, 759-770
192. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299
193. Carter, S., and Vousden, K. H. (2009) Modifications of p53: competing for the lysines. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 18-24
194. Bursac, S., Brdovcak, M. C., Donati, G., and Volarevic, S. (2014) Activation of the tumor suppressor p53 upon impairment of ribosome biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 817-830
195. Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Bar-Sagi, D. (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* **1**, 20-26
196. Bracken, A. P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Monch, K., Minucci, S., Porse, B. T., Marine, J. C., Hansen, K. H., and Helin, K. (2007) The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev* **21**, 525-530
197. Kotake, Y., Cao, R., Viatour, P., Sage, J., Zhang, Y., and Xiong, Y. (2007) pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes Dev* **21**, 49-54
198. Kotake, Y., Zeng, Y., and Xiong, Y. (2009) DDB1-CUL4 and MLL1 mediate oncogene-induced p16INK4a activation. *Cancer Res* **69**, 1809-1814
199. Lin, A. W., Barradas, M., Stone, J. C., van Aelst, L., Serrano, M., and Lowe, S. W. (1998) Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* **12**, 3008-3019
200. Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T. J., Stinson, J. A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A. D., Peters, G., and Hara, E. (2001) Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067-1070
201. Patel, P. L., Suram, A., Mirani, N., Bischof, O., and Herbig, U. (2016) Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E5024-5033

202. Greenberg, R. A., Allsopp, R. C., Chin, L., Morin, G. B., and DePinho, R. A. (1998) Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* **16**, 1723-1730
203. Fumagalli, M., Rossiello, F., Mondello, C., and d'Adda di Fagagna, F. (2014) Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation. *PLoS One* **9**, e110969
204. Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M. F., and Ferbeyre, G. (2007) The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* **21**, 43-48
205. Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**, 1674-1677
206. Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T. D. (2000) Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* **14**, 278-288
207. Jackson, S. P., and Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-1078
208. d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., and Jackson, S. P. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-198
209. Polo, S. E., and Jackson, S. P. (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* **25**, 409-433
210. Rodier, F., Munoz, D. P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppe, J. P., Campeau, E., Beausejour, C. M., Kim, S. H., Davalos, A. R., and Campisi, J. (2011) DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* **124**, 68-81
211. Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., Saretzki, G., Rudolph, K. L., Kirkwood, T. B., and von Zglinicki, T. (2010) Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* **6**, 347
212. Ogrunc, M., Di Micco, R., Lontos, M., Bombardelli, L., Mione, M., Fumagalli, M., Gorgoulis, V. G., and d'Adda di Fagagna, F. (2014) Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. *Cell Death Differ* **21**, 998-1012
213. Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P. G., Bensimon, A., Maestro, R., Pelicci, P. G., and d'Adda di

- Fagagna, F. (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638-642
214. James, E. L., Michalek, R. D., Pitiyage, G. N., de Castro, A. M., Vignola, K. S., Jones, J., Mohny, R. P., Karoly, E. D., Prime, S. S., and Parkinson, E. K. (2015) Senescent human fibroblasts show increased glycolysis and redox homeostasis with extracellular metabolomes that overlap with those of irreparable DNA damage, aging, and disease. *J Proteome Res* **14**, 1854-1871
215. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-9367
216. Chapman, J., Fielder, E., and Passos, J. F. (2019) Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Lett* **593**, 1566-1579
217. Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschenes-Simard, X., and Ferbeyre, G. (2009) Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol* **29**, 4495-4507
218. Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H. W., Davis, S. S., Ramanathan, A., Gerencser, A. A., Verdin, E., and Campisi, J. (2016) Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab* **23**, 303-314
219. West, A. P., Khoury-Hanold, W., Staron, M., Tal, M. C., Pineda, C. M., Lang, S. M., Bestwick, M., Duguay, B. A., Raimundo, N., MacDuff, D. A., Kaech, S. M., Smiley, J. R., Means, R. E., Iwasaki, A., and Shadel, G. S. (2015) Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* **520**, 553-557
220. Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D. M., Rai, T. S., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., Berger, S. L., and Adams, P. D. (2013) Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol* **202**, 129-143
221. Dou, Z., Ghosh, K., Vizioli, M. G., Zhu, J., Sen, P., Wangensteen, K. J., Simithy, J., Lan, Y., Lin, Y., Zhou, Z., Capell, B. C., Xu, C., Xu, M., Kieckhafer, J. E., Jiang, T., Shoshkes-Carmel, M., Tanim, K., Barber, G. N., Seykora, J. T., Millar, S. E., Kaestner, K. H., Garcia, B. A., Adams, P. D., and Berger, S. L. (2017) Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* **550**, 402-406
222. Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2010) Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* **16**, 238-246

223. Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M. C., Ruiz, A. F., Kalegari, P., and Ferbeyre, G. (2019) The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine* **117**, 15-22
224. Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T. W., Lasitschka, F., Andrulis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., Inman, G. J., Longrich, T., Sansom, O. J., Benitah, S. A., Zender, L., and Gil, J. (2013) A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* **15**, 978-990
225. Teo, Y. V., Rattanavirotkul, N., Olova, N., Salzano, A., Quintanilla, A., Tarrats, N., Kiourtis, C., Muller, M., Green, A. R., Adams, P. D., Acosta, J. C., Bird, T. G., Kirschner, K., Neretti, N., and Chandra, T. (2019) Notch Signaling Mediates Secondary Senescence. *Cell Rep* **27**, 997-1007 e1005
226. Lehmann, B. D., Paine, M. S., Brooks, A. M., McCubrey, J. A., Renegar, R. H., Wang, R., and Terrian, D. M. (2008) Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res* **68**, 7864-7871
227. Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A., and Altevogt, P. (2006) Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* **107**, 102-108
228. Takasugi, M. (2018) Emerging roles of extracellular vesicles in cellular senescence and aging. *Aging Cell* **17**
229. Misawa, T., Tanaka, Y., Okada, R., and Takahashi, A. (2020) Biology of extracellular vesicles secreted from senescent cells as senescence-associated secretory phenotype factors. *Geriatr Gerontol Int* **20**, 539-546
230. Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S. W. (2000) PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* **14**, 2015-2027
231. Vernier, M., Bourdeau, V., Gaumont-Leclerc, M. F., Moiseeva, O., Begin, V., Saad, F., Mes-Masson, A. M., and Ferbeyre, G. (2011) Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev* **25**, 41-50
232. Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-716
233. Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H. A., Chen, W., Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Serebriiskii, I. G., Canutescu, A. A., Dunbrack, R. L., Pehrson, J. R., Berger, J. M., Kaufman, P. D., and Adams, P. D. (2005) Formation of MacroH2A-

- containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* **8**, 19-30
234. Parry, A. J., and Narita, M. (2016) Old cells, new tricks: chromatin structure in senescence. *Mamm Genome* **27**, 320-331
235. Sadaie, M., Salama, R., Carroll, T., Tomimatsu, K., Chandra, T., Young, A. R., Narita, M., Perez-Mancera, P. A., Bennett, D. C., Chong, H., Kimura, H., and Narita, M. (2013) Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. *Genes Dev* **27**, 1800-1808
236. Chandra, T., Ewels, P. A., Schoenfelder, S., Furlan-Magaril, M., Wingett, S. W., Kirschner, K., Thuret, J. Y., Andrews, S., Fraser, P., and Reik, W. (2015) Global reorganization of the nuclear landscape in senescent cells. *Cell Rep* **10**, 471-483
237. Cruickshanks, H. A., McBryan, T., Nelson, D. M., Vanderkraats, N. D., Shah, P. P., van Tuyn, J., Singh Rai, T., Brock, C., Donahue, G., Dunican, D. S., Drotar, M. E., Meehan, R. R., Edwards, J. R., Berger, S. L., and Adams, P. D. (2013) Senescent cells harbour features of the cancer epigenome. *Nat Cell Biol* **15**, 1495-1506
238. Ting, D. T., Lipson, D., Paul, S., Brannigan, B. W., Akhavanfard, S., Coffman, E. J., Contino, G., Deshpande, V., Iafrate, A. J., Letovsky, S., Rivera, M. N., Bardeesy, N., Maheswaran, S., and Haber, D. A. (2011) Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science* **331**, 593-596
239. Payea, M. J., Anerillas, C., Tharakan, R., and Gorospe, M. (2021) Translational Control during Cellular Senescence. *Mol Cell Biol* **41**
240. Laberge, R. M., Sun, Y., Orjalo, A. V., Patil, C. K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S. C., Davalos, A. R., Wilson-Edell, K. A., Liu, S., Limbad, C., Demaria, M., Li, P., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Javors, M., Desprez, P. Y., Benz, C. C., Kapahi, P., Nelson, P. S., and Campisi, J. (2015) mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol* **17**, 1049-1061
241. Narita, M., Young, A. R., Arakawa, S., Samarajiwa, S. A., Nakashima, T., Yoshida, S., Hong, S., Berry, L. S., Reichelt, S., Ferreira, M., Tavaré, S., Inoki, K., Shimizu, S., and Narita, M. (2011) Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science* **332**, 966-970
242. Wu, S., Xu, S., Li, R., Li, K., Zhong, X., Li, Y., Zhou, Z., Liu, Y., Feng, R., Zheng, J., Songyang, Z., and Liu, F. (2019) mTORC1-Rps15 Axis Contributes to the Mechanisms Underlying Global Translation Reduction During Senescence of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Front Cell Dev Biol* **7**, 337

243. Walters, H. E., Deneka-Hannemann, S., and Cox, L. S. (2016) Reversal of phenotypes of cellular senescence by pan-mTOR inhibition. *Aging (Albany NY)* **8**, 231-244
244. Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S., and Sabatini, D. M. (2012) A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**, 109-113
245. Del Toro, N., Lessard, F., Bouchard, J., Mobasher, N., Guillon, J., Igelmann, S., Tardif, S., Buffard, T., Bourdeau, V., Brakier-Gingras, L., and Ferbeyre, G. (2021) Cellular senescence limits translational readthrough. *Biol Open* **10**
246. Deschenes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M. F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., Igelmann, S., Mallette, F. A., Saba-El-Leil, M. K., Meloche, S., Saad, F., Mes-Masson, A. M., and Ferbeyre, G. (2013) Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev* **27**, 900-915
247. Young, A. R., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J. F., Tavares, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F. M., and Narita, M. (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**, 798-803
248. Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J. A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B. C., Drake, A. M., Shah, P. P., Catanzaro, J. M., Ricketts, M. D., Lamark, T., Adam, S. A., Marmorstein, R., Zong, W. X., Johansen, T., Goldman, R. D., Adams, P. D., and Berger, S. L. (2015) Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* **527**, 105-109
249. Acevedo, M., Vernier, M., Mignacca, L., Lessard, F., Huot, G., Moiseeva, O., Bourdeau, V., and Ferbeyre, G. (2016) A CDK4/6-Dependent Epigenetic Mechanism Protects Cancer Cells from PML-induced Senescence. *Cancer Res* **76**, 3252-3264
250. Kwon, Y., Kim, J. W., Jeoung, J. A., Kim, M. S., and Kang, C. (2017) Autophagy Is Pro-Senescence When Seen in Close-Up, but Anti-Senescence in Long-Shot. *Mol Cells* **40**, 607-612
251. Khatter, H., Myasnikov, A. G., Natchiar, S. K., and Klaholz, B. P. (2015) Structure of the human 80S ribosome. *Nature* **520**, 640-645
252. Doherty, M. K., Hammond, D. E., Clague, M. J., Gaskell, S. J., and Beynon, R. J. (2009) Turnover of the human proteome: determination of protein intracellular stability by dynamic SILAC. *J Proteome Res* **8**, 104-112
253. Cerqueira, A. V., and Lemos, B. (2019) Ribosomal DNA and the Nucleolus as Keystones of Nuclear Architecture, Organization, and Function. *Trends Genet* **35**, 710-723
254. Bersaglieri, C., Kresoja-Rakic, J., Gupta, S., Bar, D., Kuzyakiv, R., Panatta, M., and Santoro, R. (2022) Genome-wide maps of nucleolus interactions reveal distinct layers of repressive chromatin domains. *Nat Commun* **13**, 1483

255. Hanakahi, L. A., Sun, H., and Maizels, N. (1999) High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA. *J Biol Chem* **274**, 15908-15912
256. Hershman, S. G., Chen, Q., Lee, J. Y., Kozak, M. L., Yue, P., Wang, L. S., and Johnson, F. B. (2008) Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **36**, 144-156
257. Datta, A., Pollock, K. J., Kormuth, K. A., and Brosh, R. M., Jr. (2021) G-Quadruplex Assembly by Ribosomal DNA: Emerging Roles in Disease Pathogenesis and Cancer Biology. *Cytogenet Genome Res* **161**, 285-296
258. Lafontaine, D. L. J., Riback, J. A., Bascetin, R., and Brangwynne, C. P. (2021) The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 165-182
259. Schwank, K., Schmid, C., Fremter, T., Milkereit, P., Griesenbeck, J., and Tschochner, H. (2022) RNA polymerase I (Pol I) lobe-binding subunit Rpa12.2 promotes RNA cleavage and proofreading. *J Biol Chem* **298**, 101862
260. Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T. S., Mitrea, D. M., Zhu, L., Richardson, T. M., Kriwacki, R. W., Pappu, R. V., and Brangwynne, C. P. (2016) Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell* **165**, 1686-1697
261. Yao, R. W., Xu, G., Wang, Y., Shan, L., Luan, P. F., Wang, Y., Wu, M., Yang, L. Z., Xing, Y. H., Yang, L., and Chen, L. L. (2019) Nascent Pre-rRNA Sorting via Phase Separation Drives the Assembly of Dense Fibrillar Components in the Human Nucleolus. *Mol Cell* **76**, 767-783 e711
262. Savic, N., Bar, D., Leone, S., Frommel, S. C., Weber, F. A., Vollenweider, E., Ferrari, E., Ziegler, U., Kaech, A., Shakhova, O., Cinelli, P., and Santoro, R. (2014) lncRNA maturation to initiate heterochromatin formation in the nucleolus is required for exit from pluripotency in ESCs. *Cell Stem Cell* **15**, 720-734
263. Zhou, Y., Santoro, R., and Grummt, I. (2002) The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J* **21**, 4632-4640
264. Strohner, R., Nemeth, A., Nightingale, K. P., Grummt, I., Becker, P. B., and Langst, G. (2004) Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin. *Mol Cell Biol* **24**, 1791-1798
265. Zhou, Y., and Grummt, I. (2005) The PHD finger/bromodomain of NoRC interacts with acetylated histone H4K16 and is sufficient for rDNA silencing. *Curr Biol* **15**, 1434-1438
266. Bierhoff, H., Dammert, M. A., Brocks, D., Dambacher, S., Schotta, G., and Grummt, I. (2014) Quiescence-induced lncRNAs trigger H4K20 trimethylation and transcriptional silencing. *Mol Cell* **54**, 675-682

267. Li, D., Zhang, J., Wang, M., Li, X., Gong, H., Tang, H., Chen, L., Wan, L., and Liu, Q. (2018) Activity dependent LoNA regulates translation by coordinating rRNA transcription and methylation. *Nat Commun* **9**, 1726
268. Xing, Y. H., Yao, R. W., Zhang, Y., Guo, C. J., Jiang, S., Xu, G., Dong, R., Yang, L., and Chen, L. L. (2017) SLERT Regulates DDX21 Rings Associated with Pol I Transcription. *Cell* **169**, 664-678 e616
269. Vendramin, R., Verheyden, Y., Ishikawa, H., Goedert, L., Nicolas, E., Saraf, K., Armaos, A., Delli Ponti, R., Izumikawa, K., Mestdagh, P., Lafontaine, D. L. J., Tartaglia, G. G., Takahashi, N., Marine, J. C., and Leucci, E. (2018) SAMMSON fosters cancer cell fitness by concertedly enhancing mitochondrial and cytosolic translation. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 1035-1046
270. Kaliatsi, E. G., Giarimoglou, N., Stathopoulos, C., and Stamatopoulou, V. (2020) Non-Coding RNA-Driven Regulation of rRNA Biogenesis. *Int J Mol Sci* **21**
271. Murayama, A., Ohmori, K., Fujimura, A., Minami, H., Yasuzawa-Tanaka, K., Kuroda, T., Oie, S., Daitoku, H., Okuwaki, M., Nagata, K., Fukamizu, A., Kimura, K., Shimizu, T., and Yanagisawa, J. (2008) Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* **133**, 627-639
272. O'Sullivan, A. C., Sullivan, G. J., and McStay, B. (2002) UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol* **22**, 657-668
273. Stefanovsky, V. Y., Langlois, F., Bazett-Jones, D., Pelletier, G., and Moss, T. (2006) ERK modulates DNA bending and enhances some structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry* **45**, 3626-3634
274. Lin, C. I., and Yeh, N. H. (2009) Treacle recruits RNA polymerase I complex to the nucleolus that is independent of UBF. *Biochem Biophys Res Commun* **386**, 396-401
275. Yuan, X., Feng, W., Imhof, A., Grummt, I., and Zhou, Y. (2007) Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol Cell* **27**, 585-595
276. Xie, W., Ling, T., Zhou, Y., Feng, W., Zhu, Q., Stunnenberg, H. G., Grummt, I., and Tao, W. (2012) The chromatin remodeling complex NuRD establishes the poised state of rRNA genes characterized by bivalent histone modifications and altered nucleosome positions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8161-8166
277. Muller, M. T., Pfund, W. P., Mehta, V. B., and Trask, D. K. (1985) Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. *EMBO J* **4**, 1237-1243



278. Christensen, M. O., Barthelmes, H. U., Boege, F., and Mielke, C. (2002) The N-terminal domain anchors human topoisomerase I at fibrillar centers of nucleoli and nucleolar organizer regions of mitotic chromosomes. *J Biol Chem* **277**, 35932-35938
279. Burger, K., Muhl, B., Harasim, T., Rohrmoser, M., Malamoussi, A., Orban, M., Kellner, M., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Holzels, M., and Eick, D. (2010) Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J Biol Chem* **285**, 12416-12425
280. Christensen, M. O., Krokowski, R. M., Barthelmes, H. U., Hock, R., Boege, F., and Mielke, C. (2004) Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I. *J Biol Chem* **279**, 21873-21882
281. D'Alfonso, A., Di Felice, F., Carlini, V., Wright, C. M., Hertz, M. I., Bjornsti, M. A., and Camilloni, G. (2016) Molecular Mechanism of DNA Topoisomerase I-Dependent rDNA Silencing: Sir2p Recruitment at Ribosomal Genes. *J Mol Biol* **428**, 4905-4916
282. Di Felice, F., and Camilloni, G. (2021) Why Should DNA Topoisomerase I Have a Scaffold Activity? *Biology (Basel)* **10**
283. James, M. J., and Zomerdiijk, J. C. (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR signaling pathways regulate RNA polymerase I transcription in response to IGF-1 and nutrients. *J Biol Chem* **279**, 8911-8918
284. Nguyen le, X. T., and Mitchell, B. S. (2013) Akt activation enhances ribosomal RNA synthesis through casein kinase II and TIF-IA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 20681-20686
285. Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., Pearson, R. B., and Hannan, R. D. (2003) mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol* **23**, 8862-8877
286. Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I. (2004) mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* **18**, 423-434
287. Hoppe, S., Bierhoff, H., Cado, I., Weber, A., Tiebe, M., Grummt, I., and Voit, R. (2009) AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17781-17786
288. Mayer, C., Bierhoff, H., and Grummt, I. (2005) The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev* **19**, 933-941

289. Shav-Tal, Y., Blechman, J., Darzacq, X., Montagna, C., Dye, B. T., Patton, J. G., Singer, R. H., and Zipori, D. (2005) Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol Biol Cell* **16**, 2395-2413
290. Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T. M., Ojala, P. M., Meek, D., and Laiho, M. (2004) Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* **5**, 465-475
291. Donati, G., Peddigari, S., Mercer, C. A., and Thomas, G. (2013) 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2-p53 checkpoint. *Cell Rep* **4**, 87-98
292. Sloan, K. E., Bohnsack, M. T., and Watkins, N. J. (2013) The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep* **5**, 237-247
293. Lessard, F., Brakier-Gingras, L., and Ferbeyre, G. (2019) Ribosomal Proteins Control Tumor Suppressor Pathways in Response to Nucleolar Stress. *Bioessays* **41**, e1800183
294. Dai, M. S., Sears, R., and Lu, H. (2007) Feedback regulation of c-Myc by ribosomal protein L11. *Cell Cycle* **6**, 2735-2741
295. Pecoraro, A., Carotenuto, P., Russo, G., and Russo, A. (2019) Ribosomal protein uL3 targets E2F1 and Cyclin D1 in cancer cell response to nucleolar stress. *Sci Rep* **9**, 15431
296. Russo, A., Esposito, D., Catillo, M., Pietropaolo, C., Crescenzi, E., and Russo, G. (2013) Human rpL3 induces G(1)/S arrest or apoptosis by modulating p21 (waf1/cip1) levels in a p53-independent manner. *Cell Cycle* **12**, 76-87
297. Yang, L., Song, T., Chen, L., Soliman, H., and Chen, J. (2015) Nucleolar repression facilitates initiation and maintenance of senescence. *Cell Cycle* **14**, 3613-3623
298. Ayrault, O., Andrique, L., Fauvin, D., Eymin, B., Gazzeri, S., and Seite, P. (2006) Human tumor suppressor p14ARF negatively regulates rRNA transcription and inhibits UBF1 transcription factor phosphorylation. *Oncogene* **25**, 7577-7586
299. Dimri, G. P., Itahana, K., Acosta, M., and Campisi, J. (2000) Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* **20**, 273-285
300. Zhu, Y., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A. K., Ikeno, Y., Hubbard, G. B., Lenburg, M., O'Hara, S. P., LaRusso, N. F., Miller, J. D., Roos, C. M., Verzosa, G. C., LeBrasseur, N. K., Wren, J. D., Farr, J. N., Khosla, S., Stout, M. B., McGowan, S. J., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Gurkar, A. U., Zhao, J., Colangelo, D., Dorransoro, A., Ling, Y. Y., Barghouthy, A. S., Navarro, D. C., Sano, T., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J., and Kirkland, J. L. (2015) The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* **14**, 644-658

301. Kirkland, J. L., and Tchkonina, T. (2017) Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine* **21**, 21-28
302. Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R. M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A., and Zhou, D. (2016) Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* **22**, 78-83
303. Qi, S. M., Dong, J., Xu, Z. Y., Cheng, X. D., Zhang, W. D., and Qin, J. J. (2021) PROTAC: An Effective Targeted Protein Degradation Strategy for Cancer Therapy. *Front Pharmacol* **12**, 692574
304. He, Y., Zhang, X., Chang, J., Kim, H. N., Zhang, P., Wang, Y., Khan, S., Liu, X., Zhang, X., Lv, D., Song, L., Li, W., Thummuri, D., Yuan, Y., Wiegand, J. S., Ortiz, Y. T., Budamagunta, V., Elisseeff, J. H., Campisi, J., Almeida, M., Zheng, G., and Zhou, D. (2020) Using proteolysis-targeting chimera technology to reduce navitoclax platelet toxicity and improve its senolytic activity. *Nat Commun* **11**, 1996
305. Zhang, L., Pitcher, L. E., Prahalad, V., Niedernhofer, L. J., and Robbins, P. D. (2021) Recent advances in the discovery of senolytics. *Mech Ageing Dev* **200**, 111587
306. Birch, J., and Gil, J. (2020) Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev* **34**, 1565-1576
307. Grosse, L., Wagner, N., Emelyanov, A., Molina, C., Lacas-Gervais, S., Wagner, K. D., and Bulavin, D. V. (2020) Defined p16(High) Senescent Cell Types Are Indispensable for Mouse Healthspan. *Cell Metab* **32**, 87-99 e86
308. Neoptolemos, J. P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., and Palmer, D. H. (2018) Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **15**, 333-348
309. Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003) 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* **3**, 330-338
310. Longley, D. B., Boyer, J., Allen, W. L., Latif, T., Ferguson, P. R., Maxwell, P. J., McDermott, U., Lynch, M., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2002) The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and antifolates. *Cancer Res* **62**, 2644-2649
311. Kciuk, M., Marciniak, B., and Kontek, R. (2020) Irinotecan-Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview. *Int J Mol Sci* **21**
312. Takauji, Y., En, A., Miki, K., Ayusawa, D., and Fujii, M. (2016) Combinatorial effects of continuous protein synthesis, ERK-signaling, and reactive oxygen species on induction of cellular senescence. *Exp Cell Res* **345**, 239-246

313. Mahli, A., Saugspier, M., Koch, A., Sommer, J., Dietrich, P., Lee, S., Thasler, R., Schulze-Luehrmann, J., Luehrmann, A., Thasler, W. E., Muller, M., Bosserhoff, A., and Hellerbrand, C. (2018) ERK activation and autophagy impairment are central mediators of irinotecan-induced steatohepatitis. *Gut* **67**, 746-756
314. Was, H., Czarnecka, J., Kominek, A., Barszcz, K., Bernas, T., Piwocka, K., and Kaminska, B. (2018) Some chemotherapeutics-treated colon cancer cells display a specific phenotype being a combination of stem-like and senescent cell features. *Cancer Biol Ther* **19**, 63-75
315. Bruno, P. M., Liu, Y., Park, G. Y., Murai, J., Koch, C. E., Eisen, T. J., Pritchard, J. R., Pommier, Y., Lippard, S. J., and Hemann, M. T. (2017) A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat Med* **23**, 461-471
316. Sutton, E. C., and DeRose, V. J. (2021) Early nucleolar responses differentiate mechanisms of cell death induced by oxaliplatin and cisplatin. *J Biol Chem* **296**, 100633
317. Ozdian, T., Holub, D., Maceckova, Z., Varanasi, L., Rylova, G., Rehulka, J., Vaclavkova, J., Slavik, H., Moudry, P., Znojek, P., Stankova, J., de Sanctis, J. B., Hajduch, M., and Dzubak, P. (2017) Proteomic profiling reveals DNA damage, nucleolar and ribosomal stress are the main responses to oxaliplatin treatment in cancer cells. *J Proteomics* **162**, 73-85
318. Hebert, A., Parisotto, M., Rowell, M. C., Dore, A., Fernandez Ruiz, A., Lefrancois, G., Kalegari, P., Ferbeyre, G., and Schmitzer, A. R. (2021) Phenylethynylbenzyl-modified biguanides inhibit pancreatic cancer tumor growth. *Sci Rep* **11**, 9854
319. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., and Narita, M. (2014) Cellular senescence and its effector programs. *Genes & Development* **28**, 99-114
320. Collado, M., and Serrano, M. (2010) SENESCENCE Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer* **10**, 51-57
321. Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., and Weinberg, R. A. (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics* **40**, 499-507
322. Caldwell, M. E., DeNicola, G. M., Martins, C. P., Jacobetz, M. A., Maitra, A., Hruban, R. H., and Tuveson, D. A. (2012) Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene* **31**, 1599-1608
323. Liszka, L., Pajak, J., Mrowiec, S., Zielinska-Pajak, E., Golka, D., and Lampe, P. (2011) Precursor lesions of early onset pancreatic cancer. *Virchows Archiv* **458**, 439-451

324. Rielland, M., Cantor, D. J., Graveline, R., Hajdu, C., Mara, L., Diaz, B. D., Miller, G., and David, G. (2014) Senescence-associated SIN3B promotes inflammation and pancreatic cancer progression. *Journal of Clinical Investigation* **124**, 2125-2135
325. Itahana, K., Zou, Y., Itahana, Y., Martinez, J. L., Beausejour, C., Jacobs, J. J. L., van Lohuizen, M., Band, V., Campisi, J., and Dimri, G. P. (2003) Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 389-401
326. Coppe, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2008) Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *Plos Biology* **6**, 2853-2868
327. Hernandez-Segura, A., de Jong, T. V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., and Demaria, M. (2017) Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology* **27**, 2652-+
328. Wilentz, R. E., Iacobuzio-Donahue, C. A., Argani, P., McCarthy, D. M., Parsons, J. L., Yeo, C. J., Kern, S. E., and Hruban, R. H. (2000) Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: Evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Research* **60**, 2002-2006
329. Polyak, K., and Weinberg, R. A. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer* **9**, 265-273
330. Yang, J. A., van Oosten, A. L., Theunissen, T. W., Guo, G., Silva, J. C. R., and Smith, A. (2010) Stat3 Activation Is Limiting for Reprogramming to Ground State Pluripotency. *Cell Stem Cell* **7**, 319-328
331. Dang, C. V. (2012) MYC on the Path to Cancer. *Cell* **149**, 22-35
332. Wong, D. J., Liu, H., Ridky, T. W., Cassarino, D., Segal, E., and Chang, H. Y. (2008) Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell* **2**, 333-344
333. Sun, L., Mathews, L. A., Cabarcas, S. M., Zhang, X. H., Yang, A. C., Zhang, Y., Young, M. R., Klarmann, K. D., Keller, J. R., and Farrar, W. L. (2013) Epigenetic Regulation of SOX9 by the NF-kappa B Signaling Pathway in Pancreatic Cancer Stem Cells. *Stem Cells* **31**, 1454-1466
334. Clevers, H., and Nusse, R. (2012) Wnt/beta-Catenin Signaling and Disease. *Cell* **149**, 1192-1205
335. Campbell, K. J., Rocha, S., and Perkins, N. D. (2004) Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B. *Molecular Cell* **13**, 853-865

336. Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T. W., and Smith, A. (2008) Promotion of Reprogramming to Ground State Pluripotency by Signal Inhibition. *Plos Biology* **6**, 2237-2247
337. Deschenes-Simard, X., Roy, S., Ferbeyre, G. (2016) Genome reprogramming in cells that escape from senescence. *Bionatura* **1**, 54-61
338. Reynolds, B. A., and Weiss, S. (1996) Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Developmental Biology* **175**, 1-13
339. Hirsch, H. A., Iliopoulos, D., Tschlis, P. N., and Struhl, K. (2009) Metformin Selectively Targets Cancer Stem Cells, and Acts Together with Chemotherapy to Block Tumor Growth and Prolong Remission. *Cancer Research* **69**, 7507-7511
340. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research* **63**, 5821-5828
341. Seifert, L., Werba, G., Tiwari, S., Ly, N. N. G., Alothman, S., Alqunaibit, D., Avanzi, A., Barilla, R., Daley, D., Greco, S. H., Torres-Hernandez, A., Pergamo, M., Ochi, A., Zambirinis, C. P., Pansari, M., Rendon, M., Tippens, D., Hundeyin, M., Mani, V. R., Hajdu, C., Engle, D., and Miller, G. (2016) The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature* **532**, 245-+
342. Zambirinis, C. P., Ochi, A., Barilla, R., Greco, S., Deutsch, M., and Miller, G. (2013) Induction of TRIF- or MYD88-dependent pathways perturbs cell cycle regulation in pancreatic cancer. *Cell Cycle* **12**, 1153-1154
343. Farnie, G., Sotgia, F., and Lisanti, M. P. (2015) High mitochondrial mass identifies a sub-population of stem-like cancer cells that are chemo-resistant. *Oncotarget* **6**, 30472-30486
344. Viale, A., Pettazoni, P., Lyssiotis, C. A., Ying, H. Q., Sanchez, N., Marchesini, M., Carugo, A., Green, T., Seth, S., Giuliani, V., Kost-Alimova, M., Muller, F., Colla, S., Nezi, L., Genovese, G., Deem, A. K., Kapoor, A., Yao, W. T., Brunetto, E., Kang, Y., Yuan, M., Asara, J. M., Wang, Y. A., Heffernan, T. P., Kimmelman, A. C., Wang, H. M., Fleming, J. B., Cantley, L. C., DePinho, R. A., and Draetta, G. F. (2014) Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* **514**, 628-+
345. Gough, D. J., Corlett, A., Schlessinger, K., Wegrzyn, J., Larner, A. C., and Levy, D. E. (2009) Mitochondrial STAT3 Supports Ras-Dependent Oncogenic Transformation. *Science* **324**, 1713-1716
346. Lee, G. Y., Haverty, P. M., Li, L., Kljavin, N. M., Bourgon, R., Lee, J., Stern, H., Modrusan, Z., Seshagiri, S., Zhang, Z. M., Davis, D., Stokoe, D., Settleman, J., de Sauvage, F. J., and

- Neve, R. M. (2014) Comparative Oncogenomics Identifies PSMB4 and SHMT2 as Potential Cancer Driver Genes. *Cancer Research* **74**, 3114-3126
347. Hiraga, K., and Kikuchi, G. (1980) THE MITOCHONDRIAL GLYCINE CLEAVAGE SYSTEM - PURIFICATION AND PROPERTIES OF GLYCINE DECARBOXYLASE FROM CHICKEN LIVER-MITOCHONDRIA. *Journal of Biological Chemistry* **255**, 1664-1670
348. Zhang, W. C., Shyh-Chang, N., Yang, H., Rai, A., Umashankar, S., Ma, S. M., Soh, B. S., Sun, L. L., Tai, B. C., Nga, M. E., Bhakoo, K. K., Jayapal, S. R., Nichane, M., Yu, Q., Ahmed, D. A., Tan, C., Sing, W. P., Tam, J., Thirugananam, A., Noghabi, M. S., Pang, Y. H., Ang, H. S., Robson, P., Kaldis, P., Soo, R. A., Swarup, S., Lim, E. H., and Lim, B. (2012) Glycine Decarboxylase Activity Drives Non-Small Cell Lung Cancer Tumor-Initiating Cells and Tumorigenesis. *Cell* **148**, 259-272
349. Kreso, A., and Dick, J. E. (2014) Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* **14**, 275-291
350. Owen, M. R., Doran, E., and Halestrap, A. P. (2000) Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochemical Journal* **348**, 607-614
351. Coppe, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010) The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease* **5**, 99-118
352. Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M. C., Morton, J. P., Sansom, O. J., Zender, L., and Keyes, W. M. (2017) The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes & Development* **31**, 172-183
353. Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T. W., Lasitschka, F., Andrulis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., Inman, G. J., Longrich, T., Sansom, O. J., Benitah, S. A., Zender, L., and Gil, J. (2013) A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology* **15**, 978-U221
354. Lesina, M., Wormann, S. M., Morton, J., Diakopoulos, K. N., Korneeva, O., Wimmer, M., Einwachter, H., Sperveslage, J., Demir, I. E., Kehl, T., Saur, D., Sipos, B., Heikenwalder, M., Steiner, J. M., Wang, T. C., Sansom, O. J., Schmid, R. M., and Algul, H. (2016) RelA regulates CXCL1/CXCR2-dependent oncogene-induced senescence in murine Kras-driven pancreatic carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation* **126**, 2919-2932
355. Iannello, A., Thompson, T. W., Ardolino, M., Lowe, S. W., and Raulet, D. H. (2013) p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine* **210**, 2057-2069

356. Lujambio, A., Akkari, L., Simon, J., Grace, D., Tschaharganeh, D. F., Bolden, J. E., Zhao, Z., Thapar, V., Joyce, J. A., Krizhanovsky, V., and Lowe, S. W. (2013) Non-Cell-Autonomous Tumor Suppression by p53. *Cell* **153**, 449-460
357. Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2008) Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**, 1019-1031
358. Gosselin, K., Martien, S., Pourtier, A., Vercamer, C., Ostoich, P., Morat, L., Sabatier, L., Duprez, L., de Roodenbeke, C. T., Gilson, E., Malaquin, N., Wernert, N., Slijepcevic, P., Ashtari, M., Chelli, F., Deruy, E., Vandenbunder, B., De Launoit, Y., and Abbadie, C. (2009) Senescence-Associated Oxidative DNA Damage Promotes the Generation of Neoplastic Cells. *Cancer Research* **69**, 7917-7925
359. Milanovic, M., Fan, D. N. Y., Belenki, D., Dabritz, J. H. M., Zhao, Z., Yu, Y., Dorr, J. R., Dimitrova, L., Lenze, D., Barbosa, I. A. M., Mendoza-Parra, M. A., Kanashova, T., Metzner, M., Pardon, K., Reimann, M., Trumpp, A., Dorken, B., Zuber, J., Gronemeyer, H., Hummel, M., Dittmar, G., Lee, S., and Schmitt, C. A. (2018) Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* **553**, 96-+
360. Guerra, C., Collado, M., Navas, C., Schuhmacher, A. J., Hernandez-Porrás, I., Canamero, M., Rodríguez-Justo, M., Serrano, M., and Barbacid, M. (2011) Pancreatitis-Induced Inflammation Contributes to Pancreatic Cancer by Inhibiting Oncogene-Induced Senescence. *Cancer Cell* **19**, 728-739
361. Farrell, J. J., Zhang, L., Zhou, H., Chia, D., Elashoff, D., Akin, D., Paster, B. J., Joshipura, K., and Wong, D. T. W. (2012) Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut* **61**, 582-588
362. Pushalkar, S., Hundeyin, M., Daley, D., Zambirinis, C. P., Kurz, E., Mishra, A., Mohan, N., Aykut, B., Usyk, M., Torres, L. E., Werba, G., Zhang, K., Guo, Y. Q., Li, Q. H., Akkad, N., Lall, S., Wadowski, B., Gutierrez, J., Rossi, J. A. K., Herzog, J. W., Diskin, B., Torres-Hernandez, A., Leinwand, J., Wang, W., Taunk, P. S., Savadkar, S., Janal, M., Saxena, A., Li, X., Cohen, D., Sartor, R. B., Saxena, D., and Miller, G. (2018) The Pancreatic Cancer Microbiome Promotes Oncogenesis by Induction of Innate and Adaptive Immune Suppression. *Cancer Discovery* **8**, 403-416
363. Lin, A., Wang, G., Zhao, H. J., Zhang, Y. Y., Han, Q. J., Zhang, C., Tian, Z. G., and Zhang, J. (2016) TLR4 signaling promotes a COX-2/PGE(2)/STAT3 positive feedback loop in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *Oncoimmunology* **5**
364. Grivennikov, S. I., and Karin, M. (2010) Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappa B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **21**, 11-19
365. Genini, D., Brambilla, L., Laurini, E., Merulla, J., Civenni, G., Pandit, S., D'Antuono, R., Perez, L., Levy, D. E., Pricl, S., Carbone, G. M., and Catapano, C. V. (2017) Mitochondrial



- dysfunction induced by a SH2 domain-targeting STAT3 inhibitor leads to metabolic synthetic lethality in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E4924-E4933
366. Lesina, M., Kurkowski, M. U., Ludes, K., Rose-John, S., Treiber, M., Kloppel, G., Yoshimura, A., Reindl, W., Sipos, B., Akira, S., Schmid, R. M., and Algul, H. (2011) Stat3/Socs3 Activation by IL-6 Transsignaling Promotes Progression of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Development of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **19**, 456-469
367. Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschenes-Simard, X., and Ferbeyre, G. (2009) Mitochondrial Dysfunction Contributes to Oncogene-Induced Senescence. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 4495-4507
368. Chen, K., Qian, W. K., Jiang, Z. D., Cheng, L., Li, J., Sun, L. K., Zhou, C. C., Gao, L. P., Lei, M., Yan, B., Cao, J. Y., Duan, W. X., and Ma, Q. Y. (2017) Metformin suppresses cancer initiation and progression in genetic mouse models of pancreatic cancer. *Molecular Cancer* **16**
369. Corcoran, R. B., Contino, G., Deshpande, V., Tzatsos, A., Conrad, C., Benes, C. H., Levy, D. E., Settleman, J., Engelman, J. A., and Bardeesy, N. (2011) STAT3 Plays a Critical Role in KRAS-Induced Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Research* **71**, 5020-5029
370. Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Mamarbachi, A. M., Villeneuve, L., Mallette, F. A., Ferbeyre, G., Farhat, N., Perrault, L. P., Carrier, M., and Thorin, E. (2010) Endogenous oxidative stress prevents telomerase-dependent immortalization of human endothelial cells. *Mech Ageing Dev* **131**, 354-363
371. Schreiber, F. S., Deramaudt, T. B., Brunner, T. B., Boretti, M. I., Gooch, K. J., Stoffers, D. A., Bernhard, E. J., and Rustgi, A. K. (2004) Successful growth and characterization of mouse pancreatic ductal cells: functional properties of the Ki-RAS(G12V) oncogene. *Gastroenterology* **127**, 250-260
372. Blazejczyk, M., Miron, M., Nadon, R. (2007) FlexArray: A statistical data analysis software for gene expression microarrays. *Genome Quebec, Montreal, Canada*
373. Medina, I., Carbonell, J., Pulido, L., Madeira, S. C., Goetz, S., Conesa, A., Tarraga, J., Pascual-Montano, A., Nogales-Cadenas, R., Santoyo, J., Garcia, F., Marba, M., Montaner, D., and Dopazo, J. (2010) Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res* **38**, W210-213
374. Gotea, V., and Ovcharenko, I. (2008) DiRE: identifying distant regulatory elements of co-expressed genes. *Nucleic Acids Res* **36**, W133-139
375. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005) Gene

- set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-15550
376. Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **37**, 1-13
377. Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44-57
378. Deschenes-Simard, X., Kottakis, F., Meloche, S., and Ferbeyre, G. (2014) ERKs in cancer: friends or foes? *Cancer Res* **74**, 412-419
379. Deng, Q., Liao, R., Wu, B. L., and Sun, P. (2004) High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *J Biol Chem* **279**, 1050-1059
380. Rahmouni, S., Cerignoli, F., Alonso, A., Tsutji, T., Henkens, R., Zhu, C., Louis-dit-Sully, C., Moutschen, M., Jiang, W., and Mustelin, T. (2006) Loss of the VHR dual-specific phosphatase causes cell-cycle arrest and senescence. *Nat Cell Biol* **8**, 524-531
381. Zhu, B., Ferry, C. H., Blazanin, N., Bility, M. T., Khozoie, C., Kang, B. H., Glick, A. B., Gonzalez, F. J., and Peters, J. M. (2014) PPARbeta/delta promotes HRAS-induced senescence and tumor suppression by potentiating p-ERK and repressing p-AKT signaling. *Oncogene* **33**, 5348-5359
382. Shin, S., Buel, G. R., Wolgamott, L., Plas, D. R., Asara, J. M., Blenis, J., and Yoon, S. O. (2015) ERK2 Mediates Metabolic Stress Response to Regulate Cell Fate. *Mol Cell* **59**, 382-398
383. Caldwell, M. E., DeNicola, G. M., Martins, C. P., Jacobetz, M. A., Maitra, A., Hruban, R. H., and Tuveson, D. A. (2012) Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene* **31**, 1599-1608
384. Deschenes-Simard, X., Parisotto, M., Rowell, M. C., Le Calve, B., Igelmann, S., Moineau-Vallee, K., Saint-Germain, E., Kalegari, P., Bourdeau, V., Kottakis, F., Bardeesy, N., and Ferbeyre, G. (2019) Circumventing senescence is associated with stem cell properties and metformin sensitivity. *Aging Cell*, e12889
385. Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T., and Takaori, K. (2016) Pancreatic cancer. *Lancet* **388**, 73-85
386. Morris, J. P. t., Wang, S. C., and Hebrok, M. (2010) KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* **10**, 683-695

387. Collins, M. A., Yan, W., Sebolt-Leopold, J. S., and Pasca di Magliano, M. (2014) MAPK signaling is required for dedifferentiation of acinar cells and development of pancreatic intraepithelial neoplasia in mice. *Gastroenterology* **146**, 822-834 e827
388. Sipos, B., Frank, S., Gress, T., Hahn, S., and Kloppel, G. (2009) Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology* **9**, 45-54
389. Smirnov, A., Cappello, A., Lena, A. M., Anemona, L., Mauriello, A., Di Daniele, N., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., and Candi, E. (2018) ZNF185 is a p53 target gene following DNA damage. *Aging (Albany NY)* **10**, 3308-3326
390. Lin, C. Y., Navarro, S., Reddy, S., and Comai, L. (2006) CK2-mediated stimulation of Pol I transcription by stabilization of UBF-SL1 interaction. *Nucleic Acids Res* **34**, 4752-4766
391. Voit, R., and Grummt, I. (2001) Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13631-13636
392. Perera, Y., Farina, H. G., Gil, J., Rodriguez, A., Benavent, F., Castellanos, L., Gomez, R. E., Acevedo, B. E., Alonso, D. F., and Perea, S. E. (2009) Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. *Mol Cancer Ther* **8**, 1189-1196
393. Reynolds, R. C., Montgomery, P. O., and Hughes, B. (1964) Nucleolar "Caps" Produced by Actinomycin D. *Cancer Res* **24**, 1269-1277
394. van Sluis, M., and McStay, B. (2015) A localized nucleolar DNA damage response facilitates recruitment of the homology-directed repair machinery independent of cell cycle stage. *Genes Dev* **29**, 1151-1163
395. Ide, S., Imai, R., Ochi, H., and Maeshima, K. (2020) Transcriptional suppression of ribosomal DNA with phase separation. *Sci Adv* **6**
396. Kroschwald, S., Maharana, S., Mateju, D., Malinowska, L., Nuske, E., Poser, I., Richter, D., and Alberti, S. (2015) Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules. *Elife* **4**, e06807
397. Quin, J. E., Devlin, J. R., Cameron, D., Hannan, K. M., Pearson, R. B., and Hannan, R. D. (2014) Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 802-816
398. Pelletier, J., Thomas, G., and Volarevic, S. (2018) Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nat Rev Cancer* **18**, 51-63
399. Khot, A., Brajanovski, N., Cameron, D. P., Hein, N., Maclachlan, K. H., Sanij, E., Lim, J., Soong, J., Link, E., Blombery, P., Thompson, E. R., Fellowes, A., Sheppard, K. E.,

- McArthur, G. A., Pearson, R. B., Hannan, R. D., Poortinga, G., and Harrison, S. J. (2019) First-in-Human RNA Polymerase I Transcription Inhibitor CX-5461 in Patients with Advanced Hematologic Cancers: Results of a Phase I Dose-Escalation Study. *Cancer Discov* **9**, 1036-1049
400. Peltonen, K., Colis, L., Liu, H., Trivedi, R., Moubarek, M. S., Moore, H. M., Bai, B., Rudek, M. A., Bieberich, C. J., and Laiho, M. (2014) A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell* **25**, 77-90
401. Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Pere-Verge, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M., Groupe Tumeurs Digestives of, U., and Intergroup, P. (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* **364**, 1817-1825
402. Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C., Raoul, J. L., Chone, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J. J., Lecomte, T., Assenat, E., Faroux, R., Ychou, M., Volet, J., Sauvanet, A., Breysacher, G., Di Fiore, F., Cripps, C., Kavan, P., Texereau, P., Bouhier-Leporrier, K., Khemissa-Akouz, F., Legoux, J. L., Juzyna, B., Gourgou, S., O'Callaghan, C. J., Jouffroy-Zeller, C., Rat, P., Malka, D., Castan, F., Bachet, J. B., Canadian Cancer Trials, G., and the Unicancer, G. I. P. G. (2018) FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* **379**, 2395-2406
403. Gadai, O., Mariotte-Labarre, S., Chedin, S., Quemeneur, E., Carles, C., Sentenac, A., and Thuriaux, P. (1997) A34.5, a nonessential component of yeast RNA polymerase I, cooperates with subunit A14 and DNA topoisomerase I to produce a functional rRNA synthesis machine. *Mol Cell Biol* **17**, 1787-1795
404. El Hage, A., French, S. L., Beyer, A. L., and Tollervey, D. (2010) Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis. *Genes Dev* **24**, 1546-1558
405. Silverstein, R. A., Gonzalez de Valdivia, E., and Visa, N. (2011) The incorporation of 5-fluorouracil into RNA affects the ribonucleolytic activity of the exosome subunit Rrp6. *Mol Cancer Res* **9**, 332-340
406. Abraham, K. J., Khosraviani, N., Chan, J. N. Y., Gorthi, A., Samman, A., Zhao, D. Y., Wang, M., Bokros, M., Vidya, E., Ostrowski, L. A., Oshidari, R., Pietrobon, V., Patel, P. S., Algouneh, A., Singhanian, R., Liu, Y., Yerlici, V. T., De Carvalho, D. D., Ohh, M., Dickson, B. C., Hakem, R., Greenblatt, J. F., Lee, S., Bishop, A. J. R., and Mekhail, K. (2020) Nucleolar RNA polymerase II drives ribosome biogenesis. *Nature* **585**, 298-302
407. Unni, A. M., Harbourne, B., Oh, M. H., Wild, S., Ferrarone, J. R., Lockwood, W. W., and Varmus, H. (2018) Hyperactivation of ERK by multiple mechanisms is toxic to RTK-RAS mutation-driven lung adenocarcinoma cells. *eLife* **7**

408. Leung, G. P., Feng, T., Sigoillot, F. D., Geyer, F. C., Shirley, M. D., Ruddy, D. A., Rakiec, D. P., Freeman, A. K., Engelman, J. A., Jaskelioff, M., and Stuart, D. D. (2019) Hyperactivation of MAPK Signaling Is Deleterious to RAS/RAF-mutant Melanoma. *Mol Cancer Res* **17**, 199-211
409. Wu, P. K., Hong, S. K., and Park, J. I. (2017) Steady-State Levels of Phosphorylated Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2 Determined by Mortalin/HSPA9 and Protein Phosphatase 1 Alpha in KRAS and BRAF Tumor Cells. *Mol Cell Biol* **37**
410. Igelmann, S., Lessard, F., Uchenunu, O., Bouchard, J., Fernandez-Ruiz, A., Rowell, M. C., Lopes-Paciencia, S., Papadopoli, D., Fouillen, A., Ponce, K. J., Huot, G., Mignacca, L., Benfdil, M., Kalegari, P., Wahba, H. M., Pencik, J., Vuong, N., Quenneville, J., Guillon, J., Bourdeau, V., Hulea, L., Gagnon, E., Kenner, L., Moriggl, R., Nanci, A., Pollak, M. N., Omichinski, J. G., Topisirovic, I., and Ferbeyre, G. (2021) A hydride transfer complex reprograms NAD metabolism and bypasses senescence. *Mol Cell* **81**, 3848-3865 e3819
411. Saleh, T., Carpenter, V. J., Tyutyunyk-Massey, L., Murray, G., Levenson, J. D., Souers, A. J., Alotaibi, M. R., Faber, A. C., Reed, J., Harada, H., and Gewirtz, D. A. (2020) Clearance of therapy-induced senescent tumor cells by the senolytic ABT-263 via interference with BCL-XL -BAX interaction. *Mol Oncol* **14**, 2504-2519
412. Short, S., Fielder, E., Miwa, S., and von Zglinicki, T. (2019) Senolytics and senostatics as adjuvant tumour therapy. *EBioMedicine* **41**, 683-692
413. Ruscetti, M., Morris, J. P. t., Mezzadra, R., Russell, J., Leibold, J., Romesser, P. B., Simon, J., Kulick, A., Ho, Y. J., Fennell, M., Li, J., Norgard, R. J., Wilkinson, J. E., Alonso-Curbelo, D., Sridharan, R., Heller, D. A., de Stanchina, E., Stanger, B. Z., Sherr, C. J., and Lowe, S. W. (2021) Senescence-Induced Vascular Remodeling Creates Therapeutic Vulnerabilities in Pancreas Cancer. *Cell* **184**, 4838-4839
414. Pluquet, O., Abbadie, C., and Coqueret, O. (2019) Connecting cancer relapse with senescence. *Cancer Lett* **463**, 50-58
415. Saleh, T., Tyutyunyk-Massey, L., Murray, G. F., Alotaibi, M. R., Kawale, A. S., Elsayed, Z., Henderson, S. C., Yakovlev, V., Elmore, L. W., Toor, A., Harada, H., Reed, J., Landry, J. W., and Gewirtz, D. A. (2019) Tumor cell escape from therapy-induced senescence. *Biochem Pharmacol* **162**, 202-212
416. Jonchere, B., Vetillard, A., Toutain, B., Lam, D., Bernard, A. C., Henry, C., De Carne Trecesson, S., Gamelin, E., Juin, P., Guette, C., and Coqueret, O. (2015) Irinotecan treatment and senescence failure promote the emergence of more transformed and invasive cells that depend on anti-apoptotic Mcl-1. *Oncotarget* **6**, 409-426
417. Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A. M., Alston, S., Academia, E. C., Kilmarx, S., Valdovinos, A., Wang, B., de Bruin, A., Kennedy, B. K., Melov, S., Zhou, D., Sharpless, N. E., Muss, H., and

- Campisi, J. (2017) Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov* **7**, 165-176
418. Wang, C., Vegna, S., Jin, H., Benedict, B., Liefink, C., Ramirez, C., de Oliveira, R. L., Morris, B., Gadiot, J., Wang, W., du Chatinier, A., Wang, L., Gao, D., Evers, B., Jin, G., Xue, Z., Schepers, A., Jochems, F., Sanchez, A. M., Mainardi, S., Te Riele, H., Beijersbergen, R. L., Qin, W., Akkari, L., and Bernards, R. (2019) Inducing and exploiting vulnerabilities for the treatment of liver cancer. *Nature* **574**, 268-272
419. Carpenter, V. J., Saleh, T., and Gewirtz, D. A. (2021) Senolytics for Cancer Therapy: Is All That Glitters Really Gold? *Cancers (Basel)* **13**
420. Malaquin, N., Vancayseele, A., Gilbert, S., Antenor-Habazac, L., Olivier, M. A., Ait Ali Brahem, Z., Saad, F., Delouya, G., and Rodier, F. (2020) DNA Damage- But Not Enzalutamide-Induced Senescence in Prostate Cancer Promotes Senolytic Bcl-xL Inhibitor Sensitivity. *Cells* **9**
421. Gradiz, R., Silva, H. C., Carvalho, L., Botelho, M. F., and Mota-Pinto, A. (2016) MIA PaCa-2 and PANC-1 - pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. *Sci Rep* **6**, 21648
422. Sanjana, N. E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014) Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* **11**, 783-784
423. Dorr, J. R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Dabritz, J. H., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., Kratzat, S., Purfurst, B., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., Graler, M., Hummel, M., Keller, U., Buck, A. K., Dorken, B., Willmitzer, L., Reimann, M., Kempa, S., Lee, S., and Schmitt, C. A. (2013) Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* **501**, 421-425
424. Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M., and Lamond, A. I. (2010) The nucleolus under stress. *Mol Cell* **40**, 216-227
425. Iadevaia, V., Caldarola, S., Biondini, L., Gismondi, A., Karlsson, S., Dianzani, I., and Loreni, F. (2010) PIM1 kinase is destabilized by ribosomal stress causing inhibition of cell cycle progression. *Oncogene* **29**, 5490-5499
426. Ni, C., Schmitz, D. A., Lee, J., Pawlowski, K., Wu, J., and Buszczak, M. (2022) Labeling of heterochronic ribosomes reveals C1ORF109 and SPATA5 control a late step in human ribosome assembly. *Cell Rep* **38**, 110597
427. Lo, Y. H., Romes, E. M., Pillon, M. C., Sobhany, M., and Stanley, R. E. (2017) Structural Analysis Reveals Features of Ribosome Assembly Factor Nsa1/WDR74 Important for Localization and Interaction with Rix7/NVL2. *Structure* **25**, 762-772 e764

428. Saporita, A. J., Chang, H. C., Winkeler, C. L., Apicelli, A. J., Kladney, R. D., Wang, J., Townsend, R. R., Michel, L. S., and Weber, J. D. (2011) RNA helicase DDX5 is a p53-independent target of ARF that participates in ribosome biogenesis. *Cancer Res* **71**, 6708-6717
429. Kaistha, B. P., Krattenmacher, A., Fredebohm, J., Schmidt, H., Behrens, D., Widder, M., Hackert, T., Strobel, O., Hoheisel, J. D., Gress, T. M., and Buchholz, M. (2017) The deubiquitinating enzyme USP5 promotes pancreatic cancer via modulating cell cycle regulators. *Oncotarget* **8**, 66215-66225
430. Bano, I., Horiky, P., Abbas, S. Q., Majid, M., Bilal, A. H. M., Ali, F., Behl, T., Hassan, S. S. U., and Bungau, S. (2022) Ferroptosis: A New Road towards Cancer Management. *Molecules* **27**
431. Zhang, T., Sun, L., Hao, Y., Suo, C., Shen, S., Wei, H., Ma, W., Zhang, P., Wang, T., Gu, X., Li, S. T., Chen, Z., Yan, R., Zhang, Y., Cai, Y., Zhou, R., Jia, W., Huang, F., Gao, P., and Zhang, H. (2022) ENO1 suppresses cancer cell ferroptosis by degrading the mRNA of iron regulatory protein 1. *Nat Cancer* **3**, 75-89
432. Yang, W. S., and Stockwell, B. R. (2008) Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol* **15**, 234-245
433. Guo, J. Y., Chen, H. Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A. M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J. J., Chen, G., Lemons, J. M., Karantza, V., Collier, H. A., Dipaola, R. S., Gelinas, C., Rabinowitz, J. D., and White, E. (2011) Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* **25**, 460-470
434. Hu, Y., Lu, W., Chen, G., Wang, P., Chen, Z., Zhou, Y., Ogasawara, M., Trachootham, D., Feng, L., Pelicano, H., Chiao, P. J., Keating, M. J., Garcia-Manero, G., and Huang, P. (2012) K-ras(G12V) transformation leads to mitochondrial dysfunction and a metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Cell Res* **22**, 399-412
435. Rozeveld, C. N., Johnson, K. M., Zhang, L., and Razidlo, G. L. (2020) KRAS Controls Pancreatic Cancer Cell Lipid Metabolism and Invasive Potential through the Lipase HSL. *Cancer Res* **80**, 4932-4945
436. Peng, G., Tang, Z., Xiang, Y., and Chen, W. (2019) Glutathione peroxidase 4 maintains a stemness phenotype, oxidative homeostasis and regulates biological processes in Panc1 cancer stemlike cells. *Oncol Rep* **41**, 1264-1274
437. Ngoi, N. Y., Liew, A. Q., Chong, S. J. F., Davids, M. S., Clement, M. V., and Pervaiz, S. (2021) The redox-senescence axis and its therapeutic targeting. *Redox Biol* **45**, 102032
438. DeNicola, G. M., Karreth, F. A., Humpton, T. J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K. H., Yeo, C. J., Calhoun, E. S., Scrimieri, F., Winter, J. M., Hruban, R.

- H., Iacobuzio-Donahue, C., Kern, S. E., Blair, I. A., and Tuveson, D. A. (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106-109
439. Badgley, M. A., Kremer, D. M., Maurer, H. C., DelGiorno, K. E., Lee, H. J., Purohit, V., Sagalovskiy, I. R., Ma, A., Kapilian, J., Firl, C. E. M., Decker, A. R., Sastra, S. A., Palermo, C. F., Andrade, L. R., Sajjakulnukit, P., Zhang, L., Tolstyka, Z. P., Hirschhorn, T., Lamb, C., Liu, T., Gu, W., Seeley, E. S., Stone, E., Georgiou, G., Manor, U., Iuga, A., Wahl, G. M., Stockwell, B. R., Lyssiotis, C. A., and Olive, K. P. (2020) Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice. *Science* **368**, 85-89
440. Weiwer, M., Bittker, J. A., Lewis, T. A., Shimada, K., Yang, W. S., MacPherson, L., Dandapani, S., Palmer, M., Stockwell, B. R., Schreiber, S. L., and Munoz, B. (2012) Development of small-molecule probes that selectively kill cells induced to express mutant RAS. *Bioorg Med Chem Lett* **22**, 1822-1826
441. Miotto, G., Rossetto, M., Di Paolo, M. L., Orian, L., Venerando, R., Roveri, A., Vuckovic, A. M., Bosello Travain, V., Zaccarin, M., Zennaro, L., Maiorino, M., Toppo, S., Ursini, F., and Cozza, G. (2020) Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1. *Redox Biol* **28**, 101328
442. Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W., Schreiber, S. L., and Stockwell, B. R. (2014) Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* **156**, 317-331
443. Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J. W., Calabresi, P., Sedivy, J., Hendrickson, E. A., Balan, K. V., Pantazis, P., and Wyche, J. H. (2002) Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J Biol Chem* **277**, 17154-17160
444. Yang, H., Bailey, P., and Pilarsky, C. (2019) CRISPR Cas9 in Pancreatic Cancer Research. *Front Cell Dev Biol* **7**, 239
445. Dai, E., Han, L., Liu, J., Xie, Y., Zeh, H. J., Kang, R., Bai, L., and Tang, D. (2020) Ferroptotic damage promotes pancreatic tumorigenesis through a TMEM173/STING-dependent DNA sensor pathway. *Nat Commun* **11**, 6339
446. Li, J., Lama, R., Galster, S. L., Inigo, J. R., Wu, J., Chandra, D., Chemler, S. R., and Wang, X. (2022) Small-Molecule MMRi62 Induces Ferroptosis and Inhibits Metastasis in Pancreatic Cancer via Degradation of Ferritin Heavy Chain and Mutant p53. *Mol Cancer Ther* **21**, 535-545
447. Kremer, D. M., Nelson, B. S., Lin, L., Yarosz, E. L., Halbrook, C. J., Kerk, S. A., Sajjakulnukit, P., Myers, A., Thurston, G., Hou, S. W., Carpenter, E. S., Andren, A. C., Nwosu, Z. C., Cusmano, N., Wisner, S., Mbah, N. E., Shan, M., Das, N. K., Magnuson, B.,



- Little, A. C., Savani, M. R., Ramos, J., Gao, T., Sastra, S. A., Palermo, C. F., Badgley, M. A., Zhang, L., Asara, J. M., McBrayer, S. K., di Magliano, M. P., Crawford, H. C., Shah, Y. M., Olive, K. P., and Lyssiotis, C. A. (2021) GOT1 inhibition promotes pancreatic cancer cell death by ferroptosis. *Nat Commun* **12**, 4860
448. Wang, H., Liu, C., Zhao, Y., Zhang, W., Xu, K., Li, D., Zhou, Y., Li, H., Xiao, G., Lu, B., and Gao, G. (2020) Inhibition of LONP1 protects against erastin-induced ferroptosis in Pancreatic ductal adenocarcinoma PANC1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **522**, 1063-1068
449. Grachan, J. J., Kery, M., Giaccia, A. J., Denko, N. C., and Papandreou, I. (2021) Lipid droplet storage promotes murine pancreatic tumor growth. *Oncol Rep* **45**
450. Zou, Y., Palte, M. J., Deik, A. A., Li, H., Eaton, J. K., Wang, W., Tseng, Y. Y., Deasy, R., Kost-Alimova, M., Dancik, V., Leshchiner, E. S., Viswanathan, V. S., Signoretti, S., Choueiri, T. K., Boehm, J. S., Wagner, B. K., Doench, J. G., Clish, C. B., Clemons, P. A., and Schreiber, S. L. (2019) A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis. *Nat Commun* **10**, 1617
451. Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T., Heckl, D., Ebert, B. L., Root, D. E., Doench, J. G., and Zhang, F. (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* **343**, 84-87
452. Toledo, C. M., Ding, Y., Hoellerbauer, P., Davis, R. J., Basom, R., Girard, E. J., Lee, E., Corrin, P., Hart, T., Bolouri, H., Davison, J., Zhang, Q., Hardcastle, J., Aronow, B. J., Plaisier, C. L., Baliga, N. S., Moffat, J., Lin, Q., Li, X. N., Nam, D. H., Lee, J., Pollard, S. M., Zhu, J., Delrow, J. J., Clurman, B. E., Olson, J. M., and Paddison, P. J. (2015) Genome-wide CRISPR-Cas9 Screens Reveal Loss of Redundancy between PKMYT1 and WEE1 in Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Rep* **13**, 2425-2439
453. Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357-359
454. Winter, J., Schwering, M., Pelz, O., Rauscher, B., Zhan, T., Heigwer, F., and Boutros, M. (2017) CRISPRAnalyzeR: Interactive analysis, annotation and documentation of pooled CRISPR screens. *bioRxiv*, 109967
455. Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D., and Groop, L. C. (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* **34**, 267-273
456. Fu, J., Dang, Y., Counter, C., and Liu, Y. (2018) Codon usage regulates human KRAS expression at both transcriptional and translational levels. *J Biol Chem* **293**, 17929-17940

457. Yip-Schneider, M. T., Lin, A., and Marshall, M. S. (2001) Pancreatic tumor cells with mutant K-ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 992-997
458. Cheng, J. Q., Ruggeri, B., Klein, W. M., Sonoda, G., Altomare, D. A., Watson, D. K., and Testa, J. R. (1996) Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3636-3641
459. Takauji, Y., Wada, T., Takeda, A., Kudo, I., Miki, K., Fujii, M., and Ayusawa, D. (2016) Restriction of protein synthesis abolishes senescence features at cellular and organismal levels. *Sci Rep* **6**, 18722
460. Jagust, P., Alcalá, S., Sainz Jr, B., Heeschen, C., and Sancho, P. (2020) Glutathione metabolism is essential for self-renewal and chemoresistance of pancreatic cancer stem cells. *World J Stem Cells* **12**, 1410-1428
461. Lees, J. G., Cliff, T. S., Gammilonghi, A., Ryall, J. G., Dalton, S., Gardner, D. K., and Harvey, A. J. (2019) Oxygen Regulates Human Pluripotent Stem Cell Metabolic Flux. *Stem Cells Int* **2019**, 8195614
462. Degirmenci, U., Wang, M., and Hu, J. (2020) Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells* **9**
463. Deschenes-Simard, X., Lessard, F., Gaumont-Leclerc, M. F., Bardeesy, N., and Ferbeyre, G. (2014) Cellular senescence and protein degradation: breaking down cancer. *Cell Cycle* **13**, 1840-1858
464. Coppe, J. P., Mori, M., Pan, B., Yau, C., Wolf, D. M., Ruiz-Saenz, A., Brunen, D., Prahallad, A., Cornelissen-Steijger, P., Kemper, K., Posch, C., Wang, C., Dreyer, C. A., Krijgsman, O., Lee, P. R. E., Chen, Z., Peeper, D. S., Moasser, M. M., Bernards, R., and van 't Veer, L. J. (2019) Mapping phospho-catalytic dependencies of therapy-resistant tumours reveals actionable vulnerabilities. *Nat Cell Biol* **21**, 778-790
465. Gunawardena, S. R., Ruis, B. L., Meyer, J. A., Kapoor, M., and Conklin, K. F. (2008) NOM1 targets protein phosphatase I to the nucleolus. *J Biol Chem* **283**, 398-404
466. Russo, L. C., Ferruzo, P. Y. M., and Forti, F. L. (2021) Nucleophosmin Protein Dephosphorylation by DUSP3 Is a Fine-Tuning Regulator of p53 Signaling to Maintain Genomic Stability. *Front Cell Dev Biol* **9**, 624933
467. Panico, K., and Forti, F. L. (2013) Proteomic, cellular, and network analyses reveal new DUSP3 interactions with nucleolar proteins in HeLa cells. *J Proteome Res* **12**, 5851-5866

468. Clemente-Blanco, A., Mayan-Santos, M., Schneider, D. A., Machin, F., Jarmuz, A., Tschochner, H., and Aragon, L. (2009) Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature* **458**, 219-222
469. Mostofa, M. G., Morshed, S., Mase, S., Hosoyamada, S., Kobayashi, T., and Ushimaru, T. (2021) Cdc14 protein phosphatase and topoisomerase II mediate rDNA dynamics and nucleophagic degradation of nucleolar proteins after TORC1 inactivation. *Cell Signal* **79**, 109884
470. Manzano-Lopez, J., and Monje-Casas, F. (2020) The Multiple Roles of the Cdc14 Phosphatase in Cell Cycle Control. *Int J Mol Sci* **21**
471. Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J., and Gygi, S. P. (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10762-10767
472. Hayashi, K., and Matsunaga, S. (2019) Heat and chilling stress induce nucleolus morphological changes. *J Plant Res* **132**, 395-403
473. Jimenez-Garcia, L. F., Segura-Valdez, M. L., Ochs, R. L., Rothblum, L. I., Hannan, R., and Spector, D. L. (1994) Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell* **5**, 955-966
474. Hamdane, N., Tremblay, M. G., Dillinger, S., Stefanovsky, V. Y., Nemeth, A., and Moss, T. (2017) Disruption of the UBF gene induces aberrant somatic nucleolar bodies and disrupts embryo nucleolar precursor bodies. *Gene* **612**, 5-11
475. Hamdane, N., Stefanovsky, V. Y., Tremblay, M. G., Nemeth, A., Paquet, E., Lessard, F., Sanij, E., Hannan, R., and Moss, T. (2014) Conditional inactivation of Upstream Binding Factor reveals its epigenetic functions and the existence of a somatic nucleolar precursor body. *PLoS Genet* **10**, e1004505
476. Louvet, E., Junera, H. R., Le Panse, S., and Hernandez-Verdun, D. (2005) Dynamics and compartmentation of the nucleolar processing machinery. *Exp Cell Res* **304**, 457-470
477. Latonen, L., Moore, H. M., Bai, B., Jaamaa, S., and Laiho, M. (2011) Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability. *Oncogene* **30**, 790-805
478. Ernoult-Lange, M., Wilczynska, A., Harper, M., Aigueperse, C., Dautry, F., Kress, M., and Weil, D. (2009) Nucleocytoplasmic traffic of CPEB1 and accumulation in Crm1 nucleolar bodies. *Mol Biol Cell* **20**, 176-187
479. Hutten, S., Prescott, A., James, J., Riesenber, S., Boulon, S., Lam, Y. W., and Lamond, A. I. (2011) An intranucleolar body associated with rDNA. *Chromosoma* **120**, 481-499

480. Velichko, A. K., Ovsyannikova, N., Petrova, N. V., Luzhin, A. V., Vorobjeva, M., Gavrikov, A. S., Mishin, A. S., Kireev, I., Razin, S. V., and Kantidze, O. L. (2021) Treacle and TOPBP1 control replication stress response in the nucleolus. *J Cell Biol* **220**
481. Gout, J. F., Li, W., Fritsch, C., Li, A., Haroon, S., Singh, L., Hua, D., Fazelinia, H., Smith, Z., Seeholzer, S., Thomas, K., Lynch, M., and Vermulst, M. (2017) The landscape of transcription errors in eukaryotic cells. *Sci Adv* **3**, e1701484
482. Zhao, D., Liu, W., Chen, K., Wu, Z., Yang, H., and Xu, Y. (2021) Structure of the human RNA polymerase I elongation complex. *Cell Discov* **7**, 97
483. Yu, X., Chini, C. C., He, M., Mer, G., and Chen, J. (2003) The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* **302**, 639-642
484. Sims, J., Sestini, G., Elgert, C., von Haeseler, A., and Schlogelhofer, P. (2021) Sequencing of the Arabidopsis NOR2 reveals its distinct organization and tissue-specific rRNA ribosomal variants. *Nat Commun* **12**, 387
485. Ladouceur, A. M., Parmar, B. S., Biedzinski, S., Wall, J., Tope, S. G., Cohn, D., Kim, A., Soubry, N., Reyes-Lamothe, R., and Weber, S. C. (2020) Clusters of bacterial RNA polymerase are biomolecular condensates that assemble through liquid-liquid phase separation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 18540-18549