

Université de Montréal

**Intégration de signaux au niveau de la chromatine et
perturbations de la ribogénèse pour une suppression
tumorale efficace**

Par

Stéphane Lopes-Paciencia

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

Février 2023

© Stéphane Lopes-Paciencia, 2023

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

Cette thèse intitulée

**Intégration de signaux au niveau de la chromatine et perturbations de la
ribogénèse pour une suppression tumorale efficace**

Présentée par

Stéphane Lopes-Paciencia

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Jacques Drouin

Président-rapporteur

Dr. Gerardo Ferbeyre

Directeur de recherche

Dr. Éric Milot

Membre du jury

Dr. Alain Nepveu

Examineur externe

Dr. Alain Moreau

Représentant du doyen

Résumé

Environ 30% des cancers humains ont une mutation gain de fonction dans l'oncogène RAS, menant à une prolifération cellulaire accrue et une expansion clonale. Cependant, il est bien établi qu'une hyperactivation soutenue de cette voie mène au phénotype inverse, soit la sénescence cellulaire, définie par un arrêt stable de la prolifération. Ce destin cellulaire caractérise les lésions bénignes et la progression vers une tumeur maligne est associée à son contournement. Toutefois, les mécanismes moléculaires permettant aux cellules de distinguer entre une signalisation normale et oncogénique par RAS afin de les engager vers la sénescence plutôt que la prolifération demeurent inconnus. Ainsi, l'hypothèse à la base de ces travaux est que la décision d'engagement vers la sénescence implique une reprogrammation transcriptionnelle qui précède l'établissement des phénotypes caractéristiques de la sénescence, tel le phénotype sécrétoire (SASP) (Article 1).

Nous avons ainsi identifié un point de restriction (SeRP) critique pour l'engagement des cellules vers la sénescence en réponse à l'oncogène HRAS^{G12V}. Ce SeRP intègre l'intensité et la durée du stress oncogénique, tout en gardant une mémoire des stress antérieurs, en modulant l'accessibilité à la chromatine via l'induction d'un réseau auto-régulé de facteurs de transcription comprenant notamment ETV4 et RUNX1 (Article 2). Notre modèle actuel nous porte à croire que cette augmentation d'accessibilité à la chromatine impliquerait principalement une décondensation de l'hétérochromatine périnucléolaire. Ceci mènerait à l'induction du SASP et aux défauts de ribogénèse observés dans la sénescence. Nous montrons d'ailleurs via la génération d'un modèle murin transgénique que l'induction de tels défauts de ribogénèse à l'échelle systémique mène à un phénotype de vieillissement prématuré suggérant une sénescence des cellules souches (Article 3). Les cellules souches ayant des niveaux particulièrement élevés de ribogénèse et étant très sensibles à des altérations de leur niche tels que l'inflammation chronique, nous pensons que, de manière fortuite, ce modèle reproduit en quelque sorte les conséquences du SeRP.

En somme, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse permettent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'engagement vers la sénescence. À termes, ces nouvelles notions permettraient de concevoir des stratégies thérapeutiques permettant de faire pencher la balance vers la sénescence dans un contexte de cancers mutés en RAS.

Mots clés : Engagement, Sénescence, RAS, Chromatine, ETV4, RUNX1, Biogénèse des ribosomes, RSL1D1, Vieillissement prématuré, Cellules souches

Abstract

Around 30% of human cancers have a gain-of-function mutation in the RAS oncogene, resulting in increased cell proliferation and clonal expansion. However, it is well established that a sustained hyperactivation of this same pathway leads instead to the opposite phenotype, namely cellular senescence, which is defined by a stable proliferation arrest. This cell fate characterizes benign lesions and progression to malignancy is associated with its bypass. However, the molecular mechanisms allowing cells to distinguish between normal and oncogenic RAS signaling in order to commit them to senescence rather than proliferation remain unknown. Thus, the hypothesis underlying the present work is that this decision to commit to senescence involves a transcriptional reprogramming that precedes the establishment of the senescence-characteristic phenotypes such as the secretory phenotype (Article 1).

We have thus identified a restriction point (SeRP) critical for the commitment of cells towards senescence in response to HRAS^{G12V} oncogene. This SeRP integrates both the intensity and duration of oncogenic stress while keeping a memory of previous stresses. This integration is achieved by modulating chromatin accessibility via the induction of a self-regulated network of transcription factors including among others ETV4 and RUNX1 (Article 2). Our current model leads us to believe that this increase in chromatin accessibility during the SeRP would mainly involve decondensation of perinucleolar heterochromatin. This would lead to the induction of the pro-inflammatory secretome of senescent cells (SASP) and the ribogenesis defects observed in senescence. Besides, we show via the generation of a transgenic mouse model that the induction of such ribogenesis defects at the systemic scale leads to a premature aging phenotype suggesting stem cells senescence (Article 3). Stem cells having particularly high levels of ribogenesis and being very sensitive to alterations of their niche such as chronic inflammation, we believe that serendipitously, this model somehow reproduces the consequences of the SeRP.

In short, all the work presented in this thesis allows for a better understanding of the molecular mechanisms regulating the commitment to senescence. Ultimately, these new notions would allow to design therapeutic strategies to tip the balance towards senescence in the context of RAS-mutated cancers.

Keywords: Commitment, Senescence, RAS, Chromatin, ETV4, RUNX1, Ribosome biogenesis, RSL1D1, Premature aging, Stem cells

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
Liste des sigles et abréviations	13
Remerciements	27
1. Introduction.....	34
1.1. Avant-propos.....	34
1.2. La tumorigénèse, soit : comment se forme un cancer?	36
1.2.1. L'évolution de l'adénocarcinome canalaire pancréatique	39
1.3. La voie RAS/MAPK : un carrefour signalétique majeur.....	41
1.3.1. La voie de signalisation RAS/MAPK.....	41
1.3.2. Régulation transcriptionnelle en aval des kinases ERK1/2	43
1.4. La sénescence cellulaire : un puissant mécanisme de suppression tumorale.....	46
1.4.1. Découverte de la sénescence et ses inducteurs	46
1.4.1.1. La sénescence RAS : dualité oncogène/suppresseur de tumeur	49
1.4.2. Arrêt du cycle cellulaire dans la sénescence : le rôle des voies RB et P53	50
1.4.3. Les voies de réponse aux dommages à l'ADN dans la sénescence	53
1.4.4. Changements métaboliques dans la sénescence	55
1.4.5. Le sécrétome des cellules sénescents (SASP).....	58
1.4.6. Régulation de la protéostasie dans la sénescence	60
1.4.7. Défauts de biogénèse des ribosomes dans la sénescence (SARD)	61
1.4.7.1. La biogénèse des ribosomes en conditions normales	62
1.4.7.2. Le nucléole : un senseur de stress cellulaire impliqué dans la sénescence	64
1.4.8. Changements au niveau de la chromatine dans la sénescence.....	66
1.4.8.1. Organisation structurale de la chromatine	66

1.4.8.1.	La régulation de la transcription : de la structure à la fonction.....	68
1.4.8.2.	L'épigénétique au cœur de la régulation transcriptionnelle.....	71
1.4.8.3.	Des dérèglements de l'homéostasie chromatinienne vers la sénescence.....	76
1.5.	Implications <i>in vivo</i> de l'accumulation de cellules sénescents.....	80
1.6.	Thérapies sénolytiques et sénomorphes.....	83
1.6.1.	Sénothérapies : le sujet de l'heure.....	83
1.6.2.	Stratégies sénotherapeutiques actuelles.....	84
1.7.	Problématique et objectifs de la thèse.....	86
2.	Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence et sa régulation.....	89
2.1.	Mise en contexte de l'article 1.....	90
2.2.	Contribution à l'article 1.....	91
2.3.	Article 1.....	92
2.3.1.	Abstract.....	93
2.3.2.	Introduction.....	93
2.3.3.	A brief overview of the SASP.....	94
2.3.4.	C/EBP controls the SASP.....	94
2.3.5.	NF-κB controls the SASP.....	95
2.3.6.	P53 controls the SASP: N-SASP and P-SASP.....	97
2.3.7.	Epigenetic control of the SASP.....	98
2.3.8.	Secreted proteases as modulators of the SASP.....	99
2.3.9.	HMGB1 and the DAMPs.....	100
2.3.10.	Lipids in the SASP.....	101
2.3.11.	SASP factors as intracrine signalling molecules.....	102
2.3.12.	Therapy-induced senescence and tumor-promoting properties of the SASP.....	103
2.3.13.	The SASP in senescence induced by Lamin A defects.....	103
2.3.14.	SASP, reprogramming and cellular plasticity.....	104
2.3.15.	Conclusions.....	105
2.3.16.	Acknowledgments.....	105
3.	Un point de restriction pour l'entrée en sénescence agit sur la chromatine et intègre des signaux oncogéniques.....	106

3.1.	Mise en contexte de l'article 2	107
3.2.	Contribution à l'article 2	108
3.3.	Article 2	109
3.3.1.	Abstract	110
3.3.2.	Introduction.....	111
3.3.3.	Results.....	112
3.3.3.1.	The Senescence Restriction point (SeRP) depends on duration and intensity of oncogenic signaling	112
3.3.3.2.	Memory and integration of aberrant signaling.....	113
3.3.3.3.	The transcriptome of senescence-committed cells reveals a transcription factor network that regulates senescence	115
3.3.3.4.	Commitment correlates with chromatin enrichment of transcription factors regulating senescence	117
3.3.3.5.	ETV4 restores senescence in cells that escape from therapy-induced senescence	118
3.3.3.6.	ETV4 and RUNX1 are highly expressed in premalignant lesions of the pancreas and downregulated in pancreatic adenocarcinomas	118
3.3.4.	Discussion	119
3.3.5.	Acknowledgements.....	121
3.3.6.	Contributions.....	122
3.3.7.	Material and methods.....	122
3.3.8.	Main figures and legends	130
3.3.9.	Supplemental Material	141
3.3.9.1.	List of supplemental material.....	141
3.3.9.2.	Supplemental figures and legends	142
3.3.9.3.	Supplemental tables	152
4.	Sénescence et vieillissement prématuré dans un modèle murin de déficience conditionnelle en Rsl1d1	158
4.1.	Mise en contexte de l'article 3	159
4.2.	Contribution à l'article 3	160
4.3.	Article 3	161
4.3.1.	Abstract	162

4.3.2.	Introduction.....	163
4.3.3.	Results.....	163
4.3.3.1.	Alterations in RSL1D1 levels trigger senescence.....	163
4.3.3.2.	Rsl1d1 depletion in mouse progenitor myoblasts induces senescence.....	164
4.3.3.3.	Generation of Rsl1d1 conditional knockdown mice.....	165
4.3.3.4.	Phenotype of Rickdo mice.....	166
4.3.3.5.	Rickdo mice do not develop insulin resistance with age.....	167
4.3.4.	Discussion.....	167
4.3.5.	Materials and methods.....	169
4.3.6.	Acknowledgements.....	176
4.3.7.	Contributions.....	177
4.3.8.	Main figures and legends.....	178
4.3.9.	Supplemental material.....	183
4.3.9.1.	List of Supplemental Material.....	183
4.3.9.2.	Supplemental figures and legends.....	184
4.3.9.3.	Supplemental tables.....	187
4.3.9.4.	Supplemental methods.....	190
5.	Discussion générale.....	193
5.1.	Mise en contexte des modèles utilisés.....	193
5.2.	Domages à l'ADN et activation des voies de DDR : une conséquence de l'entrée en sénescence?.....	195
5.3.	L'augmentation d'accessibilité à la chromatine comme mécanisme d'engagement vers la sénescence induite par RAS.....	198
5.4.	ERK2 agit comme suppresseur de tumeur dans la sénescence RAS en médiant l'accessibilité à la chromatine.....	199
5.5.	Un réseau de facteurs de transcription agissant en amont de P53 contrôle l'engagement vers la sénescence.....	202
5.6.	Conséquences fonctionnelles d'une accessibilité accrue à la chromatine.....	204
5.7.	Défauts de ribogénèse : un élément stabilisateur de la sénescence.....	210
5.8.	Établissement du modèle murin transgénique Rickdo.....	211
5.9.	Critique du modèle transgénique et expériences futures.....	213

6. Conclusion219

7. Bibliographie.....221

8. Annexe280

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Quelques marques de méthylation et d'acétylation communes.	73
Table 3.1. Transcription factors cloned for overexpression.....	152
Table 3.2. List of antibodies used in this article.	154
Table 3.3. List of qPCR primers and shRNAs used in this article.	156
Table 4.1. List of primers used for qPCR, cloning, genotyping, and shRNAs sequences....	187
Table 4.2. List of antibodies used in this article.	189

Liste des figures

Figure 1.1. Modèle de tumorigénèse.	38
Figure 1.2. Régulation transcriptionnelle en aval de la voie RAS-MAPK canonique.	44
Figure 1.3. Induction de la sénescence et ses conséquences fonctionnelles.	48
Figure 1.4. Caractéristiques associées aux cellules sénescents.	59
Figure 1.5. Organisation fonctionnelle de la chromatine.	69
Figure 2.1. Regulation of NF-κB in senescent cells.	96
Figure 2.2. Classification of the SASP according to the major transcription factors regulating its components.	97
Figure 2.3. Model proposed for positive and negative modulation of SASP through secreted proteases.	100
Figure 3.1. Commitment to RAS-Induced Senescence integrates both duration and intensity of MAPK signaling.	130
Figure 3.2. Commitment to RAS-Induced Senescence is ERK2-dependent and integrated at the chromatin.	132
Figure 3.3. The transcriptome of cells committed to senescence.	134
Figure 3.4. Overexpression of TFs whom signature is enriched during commitment recapitulates the senescence program.	136
Figure 3.5. ETV4 and RUNX1 binding to chromatin increases during commitment to senescence, leading to nuclear accumulation and increase in their levels.	138
Figure 3.6. ETV4 and RUNX1 levels are high in human pancreatic benign lesions and decrease in pancreatic ductal adenocarcinoma.	139
Figure 3.7. (Fig. S1) Senescence Restriction Point in normal human fibroblasts MRC5.	142
Figure 3.8. (Fig. S2) Sustained ERK activation is required for commitment towards senescence but is dispensable after commitment window.	143
Figure 3.9. (Fig. S3) MYC and RAS cooperate at the chromatin level to induce senescence.	144
Figure 3.10. (Fig. S4) Supplementary GSEA analyses and validation of RNA-Seq.	146
Figure 3.11. (Fig. S5) ETV4 induces senescence by activating both p53 and RB pathways.	148

Figure 3.12. (Fig. S6) ETV4 acts as a tumor suppressor in Therapy-Induced Senescence in PDAC cells.	150
Figure 4.1. Nucleolar functions of RSL1D1 are essential for cell proliferation and its delocalization from nucleolus induces senescence.....	178
Figure 4.2. Rsl1d1 depletion induces senescence in murine C2C12 myoblasts stem cells...179	179
Figure 4.3. Design and validation of genetically engineered mouse model for conditional knockdown of Rsl1d1.....	180
Figure 4.4. Systemic depletion of Rsl1d1 in adult mice gradually induces a premature aging-like phenotype after 2-3 months.....	181
Figure 4.5. (Fig. S1) Senescence induced by overexpression of RSL1D1 is more importantly mediated by the P53 pathway.	184
Figure 4.6. (Fig. S2) Breeding strategy to generate non-mosaic females expressing both transgenes.....	185
Figure 4.7. (Fig. S3) Rickdo mice do not develop insulin resistance and obesity like control mice as they age.	186
Figure 5.1. Modèle proposé intégrant les concepts issus des articles 2, 3 et de la discussion de cette thèse.	207
Figure 8.1. Niveaux de quelques cibles du SAPD à différents temps suivant l'activation de l'oncogène RAS.....	280
Figure 8.2. Niveaux d'ARNm de CDKN1A / P21 à différents temps suivant l'activation de l'oncogène RAS.....	280
Figure 8.3. RB n'est pas enrichi dans la chromatine des cellules induites en sénescence par RAS.....	281
Résumé graphique 3.1.....	107

Liste des sigles et abréviations

Abréviation	Définition
3PK	MAPK Activated Protein Kinase 3
4OHT	4-hydroxytamoxifène
53BP1	TP53-binding protein 1
AcadM	Acyl-CoA Dehydrogenase Medium Chain
ADM	Métaplasie acinaire à canalaire (Acinar-to-ductal metaplasia)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ADNr	ADN ribosomique
AEBP2	Adipocyte Enhancer-Binding Protein 2
AKT	AKT Serine/Threonine Kinase 1
AMPK	Kinase activée par l'AMP
ANE	Alopecia, neurological defects and endocrinopathy syndrome
ANOVA	Analyse de variance (Analysis of Variance)
AP-1	Activator protein 1
ARF	Voir P14/INK4D
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
ARNp	ARNs promoteurs
ARNr	ARN ribosomiques
ARNt	ARNs de transfert
ASF1a	Anti-silencing function 1A Histone Chaperone
ATAC-seq	Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP5A	ATP Synthase F1 Subunit Alpha
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
BAT	Tissu adipeux brun (Brown adipose tissue)

BCL-2	BCL2 apoptosis regulator
BCL-W	Bcl-2-Like Protein 2
BCL-XL	Bcl-2-Like Protein 1
BJ	Fibroblastes normaux humains originant de prépuce néonatal
BM	Moelle osseuse
BMI1	B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1 Homolog
BPH	Hyperplasie bénigne de la prostate (Benign prostate hyperplasia)
BRCA1	Breast cancer susceptibility protein 1
BRD4	Bromodomain Containing 4
BW	Poids (Body weight)
C/EBP β	CCAAT-enhancer-binding protein beta
C2C12	Myoblastes murins immortalisés
CAG	Promoteur synthétique: Cytomégalo­virus (amplificateur), β -Actin (promoteur), β -Globine (site accepteur d'épissage)
Cal.	Calcification
CAR-T	Cellules T à récepteur antigénique chimérique
Cas9	CRISPR associated protein 9
CBX	Chromobox
CCDC6	Coiled-Coil Domain Containing 6
CCFs	Fragments cytoplasmiques de chromatine
CDC25A/C	Cell Division Cycle 25A/C
CDC6	Cell Division Cycle 6
CDK1/2/4/6	Kinases dépendantes des cyclines
CDKN1A	Inhibiteur 1A des kinases dépendantes des cyclines (CDK inhibitor 1A), protéine p21
CDKN2A	Inhibiteur 2A des kinases dépendantes des cyclines (CDK inhibitor 2A), protéine p16
c-FOS	Finkel-Biskis-Jinkins murine osteogenic sarcoma virus
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
ChIP-Seq	Chromatin Immunoprecipitation with high-throughput Sequencing
CHK1	Checkpoint kinase 1

CHK2	Checkpoint kinase 2
CIC	Capicua
c-JUN	Jun Proto-Oncogene
CKI	Cyclin-dependent kinase inhibitors
COVID-19	Coronavirus disease 19
CpG	Dinucléotides cytosine guanine
Cpt1 α	Carnitine Palmitoyltransferase 1A
CRBN	E3 ligase Cereblon
CRCHUM	Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CRE	Recombinase Cre
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRL4	Cullin-RING E3 ubiquitin ligase 4 system
CTCF	CCCTC-binding factor
CTF	CCAAT-Binding Transcription Factor
Ctrl	Control
CXCL1/2/3/5/6/8	C-X-C motif chemokine ligand 1/2/3/5/6/8
DAB	Di-amine benzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDR	Réponse aux dommages à l'ADN
DDX21 / 51	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 21 or 51
DEG	Delayed Early Genes
DFC	Composantes fibrillaires denses
DHX9	DExH-Box Helicase 9
DIRE	Distant Regulatory Elements of Co-regulated genes
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNA-SCARS	DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence
DNase	Deoxyribonuclease
DNMT	DNA Methyltransferase
DRAM1	DNA Damage Regulated Autophagy Modulator 1
DUSP6	Phosphatases à double spécificité 6

E1A	Adenovirus early region 1A
E2F1/2	E2F Transcription Factor 1/2
E3	E3 ubiquitine ligase
E6	Papillomavirus E6 oncoprotein
E7	Papillomavirus E7 oncoprotein
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur au facteur de croissance épidermique
EGR1	Early Growth Response 1
EHF	ETS Homologous Factor
ELK-1	ETS Transcription Factor ELK1
Elov13	ELOVL Fatty Acid Elongase 3
ER	Domaine de liaison au ligand modifié du récepteur des œstrogènes α
ERK	Kinase régulée par les signaux extracellulaires (Extracellular-signal regulated kinase)
ERKi	ERK inhibitor (SCH772984)
eRNA	ARN non-codant amplificateur
ER-RAS	Fusion du domaine de liaison au ligand modifié du récepteur des œstrogènes α avec HRAS-G12V
ER α	Récepteur des œstrogènes α
EtOH	Éthanol
ETS	Facteurs de transcription de la famille E26 transformation-specific
ETS-AP1	Motif de liaison bipartites pour ETS-AP1
ETV4	ETS Variant Transcription Factor 4
eWAT	Epididymal white adipose tissue
EZH2	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
FC	Centres fibrillaires
FGF	Facteur de croissance fibroblastique
FGFR	Récepteur au facteur de croissance fibroblastique
FIS	Folfirinox-induced senescence
Folfirinox	Combinaison d'acide FOLinique, 5-Fluorouracile, IRINotécan et Oxaliplatin
FOS	Voir cFOS

FOXA1	Forkhead Box A1
FRET-FISH	Fluorescence Resonance Energy Transfer - Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
G12D	Substitution de la glycine à la position 12 par un aspartate
G12V	Substitution de la glycine à la position 12 par une valine
GADD45	Growth Arrest And DNA Damage Inducible 45
GAP	GTPase-Activating Protein
GATA1	GATA Binding Protein 1
GC	Composante granulaire
GCN5	Lysine Acetyltransferase 2
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange de nucléotide guanine
GEMM	Genetically engineered mouse model
GNAS	Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha Stimulating
GNAT	Gcn5-related N-acetyltransferase family
GO	Gene ontology
GOF	Gain Of Function
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GTP	Guanosine triphosphate
H&E	Hematoxylin & eosin
H1	Histone H1
H2A	Histone H2A
H2A.X	Variant d'histone H2A.X
H2AK119Ub	Monoubiquitination de la Lys119 de l'histone H2A
H2B	Histone H2B
H3	Histone H3
H3K27Ac	Acétylation de la Lys27 de l'histone H3
H3K27me3	Triméthylation de la Lys27 de l'histone H3
H3K4me1	Monométhylation de la Lys4 de l'histone H3
H3K4me3	Triméthylation de la Lys4 de l'histone H3

H3K9Ac	Acétylation de la Lys9 de l'histone H3
H3K9me3	Triméthylation de la Lys9 de l'histone H3
H4	Histone H4
HATs	Histones acétyltransférases
HDACs	Histones déacétylases
HDM2	Human double minute 2
HEK293T	Lignée de rein embryonnaire humain 293 avec antigène grand T
HFSCs	Hair Follicle Stem Cells
HIRA	Histone repressor A
HMGA	High Mobility Group AT-Hook
HMGB2	High Mobility Group Box 2
HMTs	Histones méthyltransférases
HP1	Heterochromatin protein 1
HRAS	Harvey Rat Sarcoma Oncogene
HRP	Peroxydase de Raifort (Horseradish peroxydase)
Hs	Homo sapiens
hSATII	Human satellite II
HSCs	Cellules souches hématopoïétiques
HSP70	Heat Shock Protein Family A (Hsp70)
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IEG	Immediate Early Genes
IGS-ARNr	Inter-Genic Spacer ribosomal RNA
IL1 α/β	Interleukin 1 Beta
IL6	Interleukin 6
IL8 / CXCL8	C-X-C Motif Chemokine Ligand 8
IMR90	Fibroblastes fœtaux pulmonaires normaux humains
INK4	Inhibitor of Kinase 4 locus (locus codant pour P14, P15, P16 et P18)
INK-ATTAC	INK4A(P16)-Apoptosis through targeted activation of caspase
INO80	Complexe remodeleur Inositol requiring 80
IPMN	Néoplasmes intracanaux papillaires et mucineux (Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm)

IRBC	Impaired ribosome biogenesis checkpoint
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
IRIC	Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie
ISWI	Complexes remodeleurs de la famille Imitation SWItch (ISWI)
ITS	Espaceurs transcrits internes
JARID2	Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JUN	Jun proto-oncogene
KDMs	Histones lysine déméthylases
KI	Index de kyphose
KI67	Prolifération Marker Protein Ki-67
KP4	Cellules métastatiques issues d'adénocarcinome canalaire pancréatique
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma oncogene
LADs	Domaines associés à la lamina
LEFs	Facteurs d'extrusion de boucle
LINE-1	Family of class I transposable elements (retrotransposon)
lncARN	Long ARN non-codant
Log	Logarithme
LSL	LoxP-Stop-LoxP
MacroH2A	Histone, variant Macro H2A
MAFB	MAF BZIP Transcription Factor B
MAPK	Kinase activée par les mitogènes (Mitogen activated protein kinase)
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 (BCL2-Related)
MCM6	Minichromosome maintenance complex component 6
MCN	Néoplasmes kystiques mucineux (Mucinous cystic neoplasia)
MDSCs	Cellules suppressives dérivées de myéloïdes
MED23	Mediator Complex Subunit 23
MEFs	Fibroblastes embryonnaires de souris
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
MEKi	MEK inhibitor (AZD6244)

miARN	micro ARN
miR-125b	micro ARN 125b
mKATE2	Far-red monomeric fluorescent protein (reporter of rtTA3 expression)
MLL1	Lysine Methyltransferase 2A
Mm	Mus musculus
MMP-1/3/9/12	Métalloprotéinase matricielle 1/3/9/12
MNase	Nucléase micrococcale
MNK	MAPK Interacting Serine/Threonine Kinase 1
MOZ	Lysine Acetyltransferase 6A
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
MSCs	Cellules souches mésenchymateuses
MSK	Nuclear Mitogen- and Stress-activated protein kinase
mTOR	Mechanistic target of Rapamycin kinase
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
MYST	MOZ, YBF2, SAS2 and TIP60 acetyltransferase family
NaBu	Sodium butyrate; HDAC inhibitor
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduite
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NADs	Domaines associés aux nucléoles
NCL	Nucleolin
NES	Normalized enrichment score
NF1	Neurofibromine 1
NF-Y	voir CTF
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHDF	Normal human diploid fibroblasts
NK	Natural Killer cell
NNT	Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase
NOC2L	Nucleolar complex associated 2 homolog
NOLC1	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1
NOP56	NOP56 Ribonucleoprotein

NoRC	Complexe remodeleur du nucléole (répresseur)
NORs	Régions organisatrices du nucléole
NPM	Nucléophosmine
NRAS	Neuroblastoma RAS oncogene
NS	Not significant
NURD	Famille de complexes remodeleurs
OCT1	POU Class 2 Homeobox 1
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test
OIS	Sénescence induite par les oncogènes (Oncogene-induced senescence)
P110	Sous-unité catalytique de PI3K
P14/INK4D	p14 Alternative reading frame
P15/INK4B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B
P16	Voir CDKN2A
P18/INK4C	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2C
P21/CIP1/WAF1	Voir CDKN1A
p300/CBP	P300/CREB-binding protein
P38	Mitogen-activated protein kinase p38
P53	Voir TP53
P65	RELA Proto-Oncogene, NF-KB Subunit
P90	Voir RSK
PAI-1	Serpin Family E Member 1
PanIN	Néoplasie intraépithéliale du pancréas (Pancreatic intraepithelial neoplasia)
PARPs	Poly-ADP-ribose polymerases
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate buffered saline)
PC3	Lignée humaine de cancer de la prostate
PCAF	Lysine Acetyltransferase 2B
PcG	Polycomb group proteins
PCH	Hétérochromatine péricentromérique
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
PD PDAC	Adénocarcinome canalaire pancréatique faiblement différencié
PD-1	Programmed cell death 1

PDAC	Adénocarcinome canalaire pancréatique (Pancreatic ductal adenocarcinoma)
PD-L1	Programmed death-ligand 1
Pdx1	Pancreatic and Duodenal Homeobox 1
PEA15	Proliferation and apoptosis adaptor protein 15
PEA3	Facteurs de transcription ETS de la sous-famille Polyomavirus enhancer activator 3
PH	Pleckstrin homology domain
PI3K	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-3-kinase
PIN	Néoplasies intraépithéliales prostatiques
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PML	Promyelocytic leukemia protein
PNH	Hétérochromatine périnucléolaire
POU2F1	Voir OCT1
PRC1	Polycomb repressive complex 1
PRC2	Polycomb repressive complex 2
Prdm16	PR/SET Domain 16
PROTACs	PROteolysis TArgeting Chimera
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
PU.1	Spi-1 Proto-Oncogene
RAF	RAF Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase
Rags	GTPases de la famille Rag
RAS	Rat sarcoma
RB	Protéine du Rétinoblastome
RHEB	Ras Homolog Enriched In Brain
Rickdo	Ribosomal L1 Domain-Containing Protein 1 (Rsl1d1) Conditional KnockDown mice
RING1A/B	Ring Finger Protein 1/2
RIS	Sénescence induite par RAS
R-loops	Hybrides ADN : ARN triple-brin
RNF43	Ring Finger Protein 43

ROS	Reactive Oxygen Species
RPL5/11/22/23	Protéine ribosomique de la grande sous-unité 5/11/23/23
RP _s	Protéines ribosomiques
RPS14	Protéine ribosomique de la petite sous-unité 14
RS	Sénescence répllicative
RSK	Ribosomal Protein S6 Kinase A1
RSL1D1	Ribosomal L1 domain containing 1
RTK	Récepteur tyrosine kinase
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel
rtTA3	Transactivateur contrôlé par la tetracycline
RUNX1	RUNX Family Transcription Factor 1
S.D.	Standard deviation
SADS	Distension des satellites associée à la sénescence
SAHF _s	Foci d'hétérochromatine associés à la sénescence
SAPA	Senescence-Associated Proliferation Arrest
SAPD	Senescence-Associated Protein Degradation
SAPK	Protéines kinases activées par le stress
SARD	Défauts de ribogénèse associés à la sénescence
SAS2	Histone acétyltransférase de la famille des MYST
SASP	Phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SA-β-Gal	Senescence-Associated β-galactosidase activity
SEM	Standard error of the mean
SeRP	Senescence restriction point
SERPINB2/4	Protéase à sérine de la famille B, membre 2/4
SE _s	Super-amplificateurs (super-enhancers)
SESN1 /2	Sestrin 1/2
SH2	Src Homology 2 domain
SH3	Src Homology 3 domain
shARN/shRNA	Petit ARN en épingle à cheveux (Short hairpin RNA)
shNTC	shARN contrôle (Non-Targeting Control)
SICC	Senescence-induced CTCF clusters

SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
snARN	Petits ARNs nucléaires
SOS	Son of Sevenless
SP1	Transcription factor Sp1
SPRY	Sprouty protein
SRC	SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase
SRE	Serum response element
SRF	Facteur de réponse au sérum
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STING	Stimulator of interferon response CGAMP Interactor
SUV39H1	Suppressor of variegation 39 homolog 1
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable subfamily of ATP-dependant chromatin remodeling complex
SWR1	Famille de complexes remodeleurs
TADs	Domaines topologiquement associés
TAFs	TFIID-Associated Factors
TASCC	TOR-autophagy spatial coupling compartment
TATA	Séquence d'ADN TATA se trouvant dans la région promotrice des gènes eucaryotes
TBP	TATA-Binding Protein
TCF	Ternary complex factor
Tert	Téломérase
Tet	voir rtTA3
TF	Facteur de transcription
TFIID	Transcription factor IID (Complexe de pré-initiation de la transcription)
TFs	Facteurs de transcription
tGFP	turboGFP (Green Fluorescent Protein)
THRB	Thyroid Hormone Receptor Beta
TIP60	Lysine Acetyltransferase 5
TIS	Therapy-induced senescence
TLE3/GRG3	TLE Family Member 3, Transcriptional Corepressor

TOP	5'Terminal OligoPyrimidine
TOP2	DNA Topoisomerase II
TP53	Tumor protein 53
TRE	Tet-responsive element
TRE	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) response element
TREX1	Three Prime Repair Exonuclease 1
TSC1/2	Tuberous Sclerosis Protein 1/2
TTF-I	Facteur de terminaison de la transcription 1
Tukey HSD	Tukey (Honest significant difference) statistical test
turboGFP	voir tGFP
Ucp1	Uncoupling Protein 1
uORF	Cadre de lecture en amont
uPAR	Plasminogen Activator, Urokinase Receptor
UPS	Système ubiquitine protéasome
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolet
Veh	Véhicule
WAT	Tissu adipeux blanc (White adipose tissue)
WD PDAC	Adénocarcinome canalaire pancréatique bien différencié
WEE1	WEE1 G2 Checkpoint Kinase
WI-38	Fibroblastes fœtaux pulmonaires normaux humains
WT	Type sauvage (Wild type)
YBF2	Histone acétyltransférase de la famille des MYST
YY1	YY1 Transcription Factor

Notes importantes :

- 1- Le préfixe *p-* devant le nom d'une protéine indique sa forme phosphorylée (*e.g.* p-P53 Ser15: P53 phosphorylé en sérine 15).
- 2- Le préfixe *sh* devant le nom d'un gène indique l'utilisation d'un shARN contre ce gène (*e.g.* shERK2, shARN ciblant ERK2).
- 3- L'utilisation de lettres minuscules dans le nom d'un gène désigne la forme murine, tandis que l'utilisation de majuscules dénote la forme humaine.

*À mes collègues du labo Ferbeyre, pour avoir
entretenu ma soif de connaissances
et ma curiosité*

*À Marie-Camille, pour avoir été ma lanterne
et mon pilier au travers de cette aventure*

*À ceux qui prendront le
temps de lire cette thèse*

Remerciements

Cette thèse représente la fin d'un long parcours au cours duquel j'aurai eu l'occasion de m'épanouir non seulement d'un point de vue scientifique, mais également à titre personnel. Évidemment, comme n'importe qui ayant passé au travers d'un doctorat en recherche, j'aurai vécu des moments où je me serai demandé pourquoi je faisais ce que je faisais. Néanmoins, lorsqu'on dresse les pour et les contres, le meilleur l'emporte toujours! Au bout du compte, un doctorat c'est surtout une histoire de résilience et d'humilité. Cette aventure m'aura permis de faire des rencontres inestimables et c'est pour cette raison que j'aimerais prendre un instant pour remercier toutes ces personnes sans qui cette thèse ne serait possible.

Je commencerai tout d'abord par remercier celui sans qui cette aventure n'aurait tout simplement pas pu avoir lieu, c'est-à-dire mon directeur de recherche **Gerardo**. En plus d'être un scientifique hors norme, vous êtes un être humain en or! Je tiens à vous remercier pour toutes ces années où vous aurez non seulement été un mentor, mais également un membre de famille à plusieurs égards! En effet, de par votre approche constamment positive et votre passion contagieuse pour la recherche vous aurez toujours su remonter le moral des troupes. Merci de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire qui est pour la plupart d'entre nous comme une deuxième famille. Merci également de m'avoir transmis tant de connaissances et de m'avoir supporté durant toutes ces années. Votre bienveillance et votre générosité sont deux qualités que je n'oublierai pas. Espero que nos sigamos viendo después y que tengamos un día la oportunidad de colaborar de nuevo.

Merci aussi aux membres de mon comité de thèse **James G. Omichinski** et **Marc Therrien** qui ont été d'excellents guides scientifiques dans mon cheminement! Vous aurez su stimuler davantage ma curiosité tout au long de mon parcours. Thanks, Jim, for being there since the beginning in the honor program during the B.Sc.

Je remercie également les membres du jury de thèse **Jacques Drouin**, **Éric Milot**, **Alain Nepveu** et **Alain Moreau** qui ont gentiment accepté d'évaluer le présent ouvrage. Je vous en suis très reconnaissant.

Chère **Véro**, le pilier et la maman du labo, la reine des qPCR, tant de qualificatifs qui ne sauraient pourtant rendre justice à ton apport incroyable au labo! Merci pour ton authenticité, ton humilité, ta compétence, ton partage de connaissances et ton amitié! Le labo n'aurait jamais été ce

qu'il est sans toi! Tu auras non seulement aidé tous les projets du labo, mais tu auras également contribué à façonner nos esprits scientifiques! Il n'y a aucun doute que tu aurais facilement pu avoir ton propre labo si tu avais voulu! J'espère que nous continuerons de nous voir pendant de nombreuses années et qu'on aura l'occasion de faire plein de belles sorties!

Chère **Emma**, mon ancienne collègue de labo et, je l'espère, future collègue de biochimie clinique! Je suis content que nos routes se soient croisées avant que tu termines ton doctorat. Ça m'aura permis de rencontrer une personne brillante, déterminée, avec les valeurs à la bonne place et pleine de talents insoupçonnés (kung-fu, violon, danse, etc.). Au-delà d'une collègue de labo, j'aurai rencontré une amie! (Début de 🎵 You've got a friend in me [Toy Story]). Merci pour les beaux moments tant au labo qu'en dehors du labo! Merci pour les belles journées jeux de société, les cours de Swing, les campings, les treks, pi toute pi toute! Merci aussi pour les commandes «de labo» auxquelles je ne me serais jamais attendu #DeL'Amour #Ana etc. Je nous souhaite encore plein de belles aventures avec de petits êtres humains en devenir! Je tiens également à dire quelques mots à ton doux monsieur. Mon cher **Seb**, malgré que tu n'aies pas été au labo, tu as tout de même été un mentor dans les dernières années en me faisant prendre conscience de mes priorités! À certains égards, tu as été comme un grand frère. Je suis content qu'on se soit rencontrés! Merci pour tes conseils, ton écoute et ta franchise! Tu es un bel être humain, avec de belles valeurs et je sais que je pourrai compter sur toi lorsque nécessaire. Saches que c'est réciproque! J'ai hâte de déposer ce document pour qu'on puisse s'organiser de belles soirées!

Chère **Lian** #LaMirtronnesse #MissÇaDépendDuContexte #CAR-TGirl, je tiens à te dire que sans toi, mon doctorat n'aurait pas été le même! Ton sourire, ta bonne humeur et ton humour sont si contagieux qu'ils m'auront mis le sourire aux lèvres pendant toutes ces années. Ce n'est pas une blague, je suis en train de sourire pendant que j'écris ces lignes! Merci pour tous ces beaux moments de complicité au labo! Tu es une perle et je me considère choyé de t'avoir comme amie! Malheureusement, le CRCHUM nous aura séparé pour tes derniers moments au labo. Néanmoins, je suis content qu'on soit demeurés proches et j'espère qu'on continuera de se voir et de faire de beaux treks et plein d'autres belles sorties pendant de longues années! Je te souhaite le meilleur pour les années à venir, tu le mérites amplement!

Cher **Fredou**, je tiens à te remercier pour ton support et tes conseils tout au long du doctorat! Tu auras été un réel mentor autant au point de vue scientifique qu'humain. Je crois sincèrement

que chacun d'entre nous en ressort réellement grandit d'avoir pu te côtoyer et il n'y a tout simplement pas assez de mots pour t'en remercier. Ton énergie, ta bonne humeur et ta vivacité d'esprit sont les souvenirs que je garderai toujours de toi au laboratoire. Tu as non seulement su nous guider à travers les embûches qu'on rencontre nécessairement au cours d'un doctorat, mais tu auras également toujours été excellent pour relativiser les choses et faire ressortir du positif de tout. Mon ami, je te souhaite tout ce que tu désires pour la suite de ton cheminement professionnel et personnel. Dit bonjour à Chantale et les enfants! À bientôt!

Cher **Benjamin** #BennyLaFripouille, on ne se sera somme toute pas côtoyés si longtemps. Néanmoins, ça l'a immédiatement cliqué. J'ai adoré ton énergie, ta franchise et ta rigueur scientifique! Ces qualités t'amèneront très loin je n'en doute pas! Merci d'avoir été là lorsque j'avais besoin de conseils durant mon stage. Je te souhaite le meilleur pour la suite de tes projets! Laisse-nous savoir si jamais tu es de passage à Montréal!

Chère **Gen** #MissMottée, merci de m'avoir pris sous ton aile durant mon stage d'été avant le doctorat! Ça l'aura été bref, mais mémorable! J'ai adoré tous les beaux moments qu'on aura partagés, pleins de fous rires! Tu m'auras appris plusieurs techniques différentes et tu auras certainement contribué à mon choix de laboratoire pour le doc! J'espère qu'on recommencera à se voir plus souvent dès la fin du doctorat! Cheers à vous 5!

Mariana, gracias por ser quien eres! ¡Además de ser una muy buena científica, siempre has sido honesta, generosa y amable! ¡Gracias por los hermosos momentos que pasamos juntos y también por las salsas picantes! ¡Espero que nos sigamos viendo durante muchos años y que sigamos haciendo hermosas salidas de camping! ¡un abrazo!

Ana #AnitaDynamita, el sol del laboratorio que ahora está en Bélgica. Gracias por todos estos maravillosos años contigo. Todavía me recuerdo de nuestros inicios cuando estábamos haciendo nuestra práctica de predoc mientras jugábamos a Slither.io., o cuando asistimos al “curso avanzado de pérdida de tiempo” y que esperábamos solamente que hubiera drama. ¡Habrás sido para mí un ejemplo de perseverancia y sobre todo de multi-tasking (japonés, dibujo, kárate, piano, etc.)! ¡Tu buen humor y tu sonrisa son armas contagiosas a las que nunca debes renunciar! ¡Estoy feliz de haber compartido hermosos recuerdos contigo en Atenas y en tu *alma mater* Málaga! ¡También me encantaron todas las salidas que hicimos con Dimitri y tú en los últimos años! Ustedes

son amigos de oro y espero que siempre nos mantendremos en contacto a pesar de la distancia. Sachez que si jamais vous passez par Montréal, nous aurons toujours une place pour vous!

Paloma #PalomitaLaBombita #OAnjoDoLaboratório, fico feliz que vieste para o Québec fazer o teu doutorado porque isso nos terá permitido encontrar um anjinho! Já te dissemos provavelmente bastante vezes, mas tens uma personalidade única! Acho que não conheço ninguém tão bem-intencionada como tu! És gentil, generosa e atenciosa! Eu sei que vocês ainda têm muitas decisões a tomar sobre os vossos futuros, mas quero que saibam que se o Ricardo e tu decidirem ficar no Québec, sempre estaremos cá para vocês! Também, será um prazer para a Évelyne e a Eloïse de crescerem juntas! Obrigado por seres quem és! Beijinhos!

Cher **Jordan** #Jojo, une chance que t'es arrivé au labo! Je sais que les conditions n'ont pas été optimales ces dernières années (pandémie, isolement, distance avec ta famille), mais somme toute, tu n'as jamais montré un signe de perte d'intérêt envers la science! J'ai adoré toutes nos discussions, scientifiques ou autres. Toutes ces petites séances de «café» afin de redonner de l'énergie pour aller plaquer des cellules. Si je peux me permettre un conseil, arrête de douter de toi. Tu es parmi les plus brillants esprits scientifiques que j'aurai croisé durant mon cheminement et je n'ai aucun doute que tu finiras par trouver un très bon poste où tu seras heureux...et plus proche de ta famille! Sur ce, saches que si jamais tu reviens à Montréal après ton post-doc, il y aura toujours une place pour toi ici!

Chère **Camille** #Camomille #Marie-CamilleJunior, tu as été un vrai rayon de soleil au laboratoire! J'ai adoré discuter avec toi de tout et de rien pendant ces dernières années! Tu es une personne très brillante, toujours souriante, facile à aborder et pleine d'énergie, avec qui on se sent très rapidement à l'aise! À bien des moments j'ai eu l'impression de parler avec Marie tellement vous étiez des jumelles cosmiques! J'espère qu'on continuera de se voir longtemps et qu'on pourra faire des petites sorties relaxes! Je te souhaite le meilleur pour la suite de ton cheminement en conseil génétique! À bientôt!

Chère **Bianca** #Biancôhh #MissKaraoké, merci pour ton énergie, ton sourire et ta bonne humeur! Tu auras également été un rayon de soleil au labo. Je me rappellerai toujours du moment où on a réalisé que t'étais une chanteuse professionnelle et qu'on n'en avait aucune idée (la soirée de départ de Ana, au bar)! Merci pour ces discussions de tout et de rien qui font tant de bien! Merci

d'avoir pris en charge la fonction qu'Ana occupait auparavant d'organisatrice non-officielle des événements! Tu es brillante et je n'ai aucun doute que le futur te réserve de belles aventures!

Lieber **Seb**, ich warne dich im Voraus, dass der folgende Text wahrscheinlich einige Fehler enthält! Zunächst einmal herzlichen Glückwunsch zu deiner beeindruckenden Promotionsleistung! Du bist zweifellos ein exzellenter Wissenschaftler geworden! In den letzten Jahren hast du mir sowohl auf technischer als auch auf wissenschaftlicher Ebene viel beigebracht, und dafür danke ich dir. Danke auch für die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen, die Korrektur meines halbwegs korrekten Deutschs und die schönen Momente beim Singen von "O Tannenbaum" im Karaoke. Bitte beachte, dass die Diskussionen im Labor-Meeting seit deiner Abreise nicht mehr dieselben sind! Ich wünsche dir eine hervorragende Postdoc-Zeit und eine Stelle als leitender Forscher, wo immer du willst! Grüße Alix, Olivia und Elodie von mir! Bis bald!

Cher **Guillaume** #LaCastagne, ne change surtout pas mec! Ça l'a été un plaisir de te côtoyer ces dernières années! Je me rappellerai toujours de ton humour, ton énergie et ton corps d'Apollon! Sans blagues, t'es un gars brillant et je suis convaincu que de belles aventures t'attendent! À+

Cher **Jacob** #MrSkittle, je commencerai en disant que je ne pense pas qu'on va revoir quelqu'un d'aussi motivé repasser au labo dans les prochaines années! Ton énergie, ta fougue et ta curiosité sont des qualités dont je me rappellerai toujours! Je te souhaite une bonne continuation dans tes études en médecine! Je n'ai aucun doute qu'un beau futur t'attend!

Cher **Tony**, merci pour ta bonne humeur, ton humour et ton énergie contagieuse! Ça m'a fait un grand bien durant mon cheminement! J'ai rarement rencontré des gens avec autant de détermination. Mine de rien, ça prend du courage pour changer de parcours comme tu l'as fait et c'est tout à ton honneur. Je te souhaite le meilleur pour ton cheminement futur! Prends soin de toi!

Chers **Audrey et Phil** #LeComitéSocial, merci pour votre bonne humeur contagieuse, votre humour, votre bienveillance et votre compétence! Vous êtes des membres indispensables du département, non seulement du point de vue social, mais également du point de vue fonctionnel! Ça l'a été un réel plaisir de vous côtoyer au cours des dernières années. Vous êtes des êtres humains en or et je vous souhaite tout le meilleur pour la suite des choses! En espérant qu'on reste en contact! Qui sait, peut-être qu'on se recroisera éventuellement dans un corridor! Prenez soin de vous! À+

Cher **Robert**, merci d'être qui tu es! Tu es un motivateur sans pareil! Ne sous-estime surtout pas l'apport que tu amènes à la vie de chaque personne au département! Ton énergie, ta positivité et ta fougue font de toi un être spécial! Je tiens à te remercier du fond du cœur pour ton support durant les dernières années! Toutes ces discussions que nous avons eues par ci par là auront été précieuses pour moi! Tu nous donne le courage de faire ce que l'on fait tout simplement! En espérant qu'on reste en contact! Prends soin de toi mon ami!

Merci aux membres de l'association étudiante **Lionel, Max, Émilie, Fadi, Alix, Sam, Lian, Emma, Marie-Camille, Yulemi, Jacob, Nassim** (j'espère ne pas en oublier)! Merci pour les beaux moments partagés durant des 5 à 7 et autres événements qui nous auront permis de relâcher un peu de pression durant les périodes plus difficiles en termes de résultats! Merci également pour l'entraide et la camaraderie les soirs et les fins de semaine au 5ième étage. Ces moments furent précieux dans mon cheminement!

Merci à mes amis de longue date (**Pel, Frank, Éric, Elio, Genève, Alexe, Noémie, Pedro, Marie-Lou**) qui m'ont soutenu ces dernières années tout en me faisant penser à d'autres choses que la science! Sans vous en apercevoir, vous m'aurez aidé à mettre en perspective mes priorités dans la vie! Ne changez surtout pas; votre humour, votre joie de vivre et votre vivacité d'esprit font de vous des êtres humains en or! Je vous aime tous et espère vous avoir toujours dans ma vie!

Merci à ma famille, **Trindade, Gil et David**, votre support et votre amour m'ont soutenu à toutes les étapes de ce long cheminement. Vous avez toujours été des modèles de générosité, d'engagement et de persévérance. Je vous suis redevable pour les valeurs que vous m'avez transmis puisqu'elles m'ont servi tout au long de ce cheminement. Ce diplôme est en quelques sortes également le vôtre. Je vous aime beaucoup!

Merci également à mes beaux-parents, **Madeleine et Vincent**, ainsi qu'à ma belle-sœur **Justine**, pour votre soutien indéfectible. Au travers des dernières années nous avons bâti une relation qui m'est très précieuse! Je suis content de faire partie de votre famille! Merci pour tout!

À **Marie-Camille**, ma collègue, ma meilleure amie, mon épouse et la maman d'une petite boule d'amour en préparation nommée Évelyne, tu es la plus belle chose qui me soit arrivée dans la vie! Je tiens à te dire qu'au-delà d'être une partenaire de vie comme il n'y en a pas d'autres, tu es une scientifique incroyablement talentueuse! J'ai rarement vu quelqu'un d'aussi vif d'esprit lors

des labmeetings! Chaque mot qui sortait de ta bouche se transformait en une idée brillante! D'ailleurs, la recherche ne s'arrête pas au laboratoire! En effet, ta soif de connaissance te pousse à explorer d'autres domaines tels que la chimie, la pharmacie, et qui sait, la thanatologie? (...so weird...) dans le cadre de ta nouvelle carrière de professeure. Ainsi, à tous les jours je m'émerveille à constater ta détermination, ta persévérance et ta passion pour l'enseignement. Je n'ai aucun doute que tu vas accomplir de grandes choses dans ta carrière et que tu vas pouvoir changer la vie de bien des étudiants. Je veux également te dire à quel point je suis reconnaissant de t'avoir eu à mes côtés tout au long de notre aventure commune de doctorat. Les dernières années ont été intenses, mais grâce à toi, j'ai eu la force de persévérer et de réussir. Nous avons tous les deux travaillé dur et je sais que si j'ai réussi à me rendre au bout de ce parcours, c'est grâce à ton soutien constant et ta présence à mes côtés. Tu as toujours été là pour m'encourager, me conseiller et m'aider à plaquer des cellules quand j'étais trop motivé et que je lançais trop de choses en même temps ;). Je pourrais presque dire que tu as été mon roc, mon pic, mon cap, que dis-je mon cap...ma péninsule! Maintenant, alors que nous nous préparons à accueillir notre petite Évelyne, je suis heureux de savoir que nous allons continuer à avancer ensemble dans cette nouvelle aventure qu'est la parentalité. Je suis sûr que tu seras la meilleure maman qui soit, et je me considère chanceux de t'avoir à mes côtés pour élever notre boubou. Je t'aime de tout mon cœur. Le chat

À **Évelyne**, notre petite boule d'amour en formation, merci pour tes coups de pieds d'encouragement dans le bedon de maman. Il reste encore deux mois avant que tu puisses pointer le bout de ton nez, mais sache que nous sommes déjà excités à l'idée de te rencontrer! C'est cette même idée qui me donne l'énergie de poursuivre dans ces derniers moments de doctorat. À bientôt!

1. Introduction

1.1. Avant-propos

Cancer, tumeur, deux termes en apparence si simples et souvent considérés à tort interchangeables pour décrire un phénomène pourtant si complexe et mal compris. Originaire du mot latin *tumor* signifiant simplement gonflement, le terme tumeur est fallacieux et peut paraître menaçant lorsqu'on le décompose en français : « tu meurs ». En effet, tout semble dit et déterminé à l'avance. La réalité est pourtant tout autre selon qu'il s'agisse d'une tumeur bénigne (non-cancéreuse) ou maligne (cancéreuse).

Le cancer est une maladie dont le simple nom évoque chez tous un mélange complexe d'émotions. Angoisse, peur et tristesse, nous voilà dès lors au bout d'un précipice contemplant le néant qui ne saurait se dévoiler sans se trahir. Parmi toutes les maladies chez l'homme, rares sont celles dont le simple nom fait autant d'effet. L'auteur, chercheur et médecin Dr. Siddhartha Mukherjee a d'ailleurs su capturer cela de façon élégante dans son roman « L'Empereur de toutes les maladies : une biographie du cancer ».

Trois principales raisons expliquent ce sentiment à l'égard de cette maladie : les statistiques montrant une croissance du nombre de cas (tous cancers confondus) au Canada en 2022 (1), le taux de mortalité important observé dans certains types de cancers (*e.g.* le mésothéliome et le cancer du pancréas) et l'incompréhension générale du public face à l'origine du cancer (tumorigénèse) et son traitement. Tout d'abord, il faut comprendre que le cancer est une maladie associée au vieillissement. Ainsi, puisqu'on observe un vieillissement général de la population, il est normal que l'incidence de cette maladie augmente. Ce premier chapitre de la thèse permettra d'ailleurs au lecteur de mieux comprendre ce lien intime entre le vieillissement (sénescence) et le cancer en décrivant les événements moléculaires impliqués dans ce processus de tumorigénèse.

Il faut mentionner que la recherche au cours des 40 dernières années a tout de même permis d'améliorer grandement le pronostic attribué à plusieurs types de cancers. À titre d'exemple, depuis 1980 au Canada, le taux de mortalité pour les cancers suivants a baissé de près de 50% : cancer colorectal (homme et femme), cancer du poumon (homme), cancer du sein (femme) et cancer de la prostate (homme) (1). Néanmoins, malgré les récentes percées majeures en immunothérapie et

en médecine personnalisée ayant révolutionné la prise en charge de quelques types de cancers tels que le mélanome (2) par exemple, certains types de cancers demeurent réfractaires aux traitements. Parmi ceux-ci, le cancer du pancréas affiche une survie nette après 5 ans de 10 % tous âges confondus, signifiant que 90% des gens atteints en décéderont avant 5 ans. Plus encore, même dans les plus jeunes groupes d'âge (15 à 44 ans) ayant reçu un diagnostic, le taux de survie nette à 1 an est de moins de 50%, signifiant qu'une personne sur deux diagnostiquée avec le cancer du pancréas décèdera dans la même année que son diagnostic (3).

La recherche des 30 dernières années dans le domaine de la sénescence cellulaire a permis de lever le voile sur plusieurs aspects jusque-là mal compris de l'origine du cancer. C'est ainsi qu'on a pu découvrir que l'activation de gènes jusqu'alors considérés pro-cancer (oncogènes), *e.g.* RAS, menait dans un premier temps à un arrêt de prolifération et à l'activation d'un programme de suppression tumorale appelé sénescence cellulaire (4,5). Ce n'est que par la suite que ce programme serait contourné via l'accumulation d'autres mutations, afin de générer une tumeur maligne, soit un cancer. Il a d'ailleurs été montré que les cellules cancéreuses générées à partir d'un échappement à l'état de sénescence donnent lieu à des phénotypes tumoraux plus agressifs que les cellules cancéreuses n'étant pas passées préalablement par un état de sénescence (6). Depuis, par des mécanismes qui seront détaillés dans ce premier chapitre, les cellules sénescents ont également été impliquées dans la pathogénèse de plusieurs maladies associées au vieillissement telles que l'Alzheimer, l'athérosclérose, la fibrose pulmonaire, l'arthrite; et leur élimination dans des modèles animaux a permis d'améliorer ces conditions. C'est ainsi que plusieurs industries se sont récemment lancées dans la course au développement de sénolytiques, soit des médicaments (drogues) qui seraient capables d'éliminer spécifiquement les cellules sénescents afin de traiter ces différentes maladies, incluant « l'Empereur de toutes [ces] maladies ».

Il est important de comprendre que l'aspect translationnel de la recherche en laboratoire vers la clinique prend plusieurs années. À juste titre, on a commencé à découvrir l'importance de la sénescence dans le processus de tumorigénèse dans les années 90 et on commence tout juste à effleurer le sommet de l'iceberg en ce qui concerne le développement de drogues sénolytiques. Il s'agit là d'une excellente démonstration de la nécessité de continuer à investir en recherche, car la recherche d'aujourd'hui est le traitement de demain.

1.2. La tumorigénèse, soit : comment se forme un cancer?

Il est estimé qu'un être humain est composé d'environ 3×10^{13} cellules (7) se répartissant en plus de 200 types cellulaires différents à travers tous les organes. Chaque cellule possède exactement le même génome et ne se distingue d'un autre type cellulaire que par les gènes qu'elle exprime. Ainsi, l'identité cellulaire est définie par un réseau d'environ 25 000 gènes pouvant coder pour plus de 100 000 protéines ayant des fonctions différentes (8). Chacune de ces protéines pouvant subir de multiples modifications post-traductionnelles afin de réguler sa compartimentalisation cellulaire et sa fonction, ce nombre est rapidement démultiplié. Cependant, cela ne s'arrête pas là. En effet, la production de protéines à partir d'ARN messager (ARNm) peut être régulée par la liaison à des micro-ARNs (miARN) (9), qui peuvent eux-mêmes être régulés par leur liaison à des longs ARNs non-codants (lncARN) (10,11). Ainsi, on constate que l'intégrité cellulaire repose sur un réseau extrêmement complexe d'interactions moléculaires régulées à différents niveaux. Une fine coordination de toutes ces interactions est donc non seulement cruciale à l'homéostasie cellulaire mais également tissulaire. Conséquemment, ce fragile équilibre est constamment mis à l'épreuve, puisque plusieurs mutations arrivent quotidiennement dans différentes cellules du corps. Ces mutations peuvent avoir plusieurs origines. Notamment, cela peut être dû à une erreur de réplication de l'ADN lors de la division cellulaire, à des réactions entre des sous-produits du métabolisme (*e.g.* espèces réactives d'oxygène; ROS) et des bases nucléotidiques d'ADN, ou encore à des erreurs de réparation de l'ADN. La majorité de ces mutations auront peu d'incidence, puisqu'elles auront lieu dans des régions non-codantes ou seront dites silencieuses, ne changeant pas la séquence d'une protéine par exemple. D'autres mutations causeront un stress insoutenable qui selon l'intensité mènera soit à la mort cellulaire ou à un arrêt stable de la prolifération cellulaire via l'activation d'un mécanisme de suppression tumorale nommé sénescence cellulaire, qui sera détaillé sous peu. Cependant, certaines mutations pourront conférer un avantage sélectif à une cellule, menant à l'initiation du processus de tumorigénèse. La transformation d'une cellule normale vers une cellule cancéreuse serait donc décrite par un modèle d'évolution clonale (12).

Ainsi, une cellule aura besoin d'acquérir des mutations dans des gènes (proto-oncogènes) lui conférant un avantage de prolifération, ce qui lui permettra de se diviser plus rapidement et de transmettre cette mutation à la prochaine génération. Ces mutations seront souvent associées à un

gain de fonction (GOF) de la protéine qui sera alors hyperactive (oncogène). Chaque cellule fille issue de cette première cellule mutée pourra subir de nouvelles mutations conférant un avantage sélectif plus ou moins grand, ce qui favorisera l'émergence de sous-populations clonales ayant un génotype de plus en plus différent de la cellule d'origine. Ceci expliquerait l'hétérogénéité observée dans des tumeurs *in vivo*, où ce ne sont pas toutes les cellules qui ont le même ensemble de mutations. Ainsi, le processus de tumorigénèse suivrait un modèle similaire au processus de sélection naturelle, où une cellule serait sélectionnée selon sa capacité à résister à différents stress. La **Figure 1.1** illustre d'ailleurs bien ce processus.

La prolifération incontrôlée de ce clone mènera alors à un amas localisé de cellules formant une lésion pré-cancéreuse. À cette étape, il sera toujours possible que des mécanismes intrinsèques de suppression tumorale tels que la sénescence ou l'apoptose soient activés si les cellules n'acquièrent pas les mutations adéquates. Rarement, en absence de tels mécanismes, l'acquisition de mutations additionnelles favorables peut éventuellement mener à la formation d'une tumeur maligne, soit un cancer. Par contre, le plus souvent, les cellules au sein de ces lésions pré-cancéreuses vont engager des voies de signalisation activant des protéines menant à un arrêt du cycle cellulaire (suppresseurs de tumeurs) afin de bloquer cette prolifération incontrôlée. Ces voies de signalisation seront également discutées sous peu. Ceci mène donc à la formation de tumeurs/lésions bénignes (sénescents), *i.e.* non cancéreuses, qui auront une prolifération très lente et demeureront au site primaire sans envahir de structures voisines. Ces tumeurs bénignes peuvent demeurer quasi non-prolifératives pendant des années voire des décennies et ne causent généralement pas de problèmes puisqu'elles vont très rarement générer un cancer. On en retrouve d'ailleurs plusieurs exemples tels que les nævus mélanocytaires (grains de beauté) (5) que tout le monde possède, ou les hyperplasies bénignes de la prostate (BPH) (13,14) qui vont affecter environ un homme sur deux à partir de ses soixante ans (15). Il faudra ainsi que ces cellules acquièrent des mutations additionnelles, particulièrement dans des gènes suppresseurs de tumeurs, afin d'inactiver ces points de contrôle. L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs lèvera le frein à leur prolifération, permettant un échappement à la sénescence afin de générer une tumeur maligne non invasive (cancer non-invasif) ou carcinome *in situ*. À noter, le terme carcinome signifie un cancer développé à partir de cellules épithéliales. Suivant la même logique d'évolution, ces cellules désormais cancéreuses devront finalement acquérir des mutations supplémentaires leur permettant

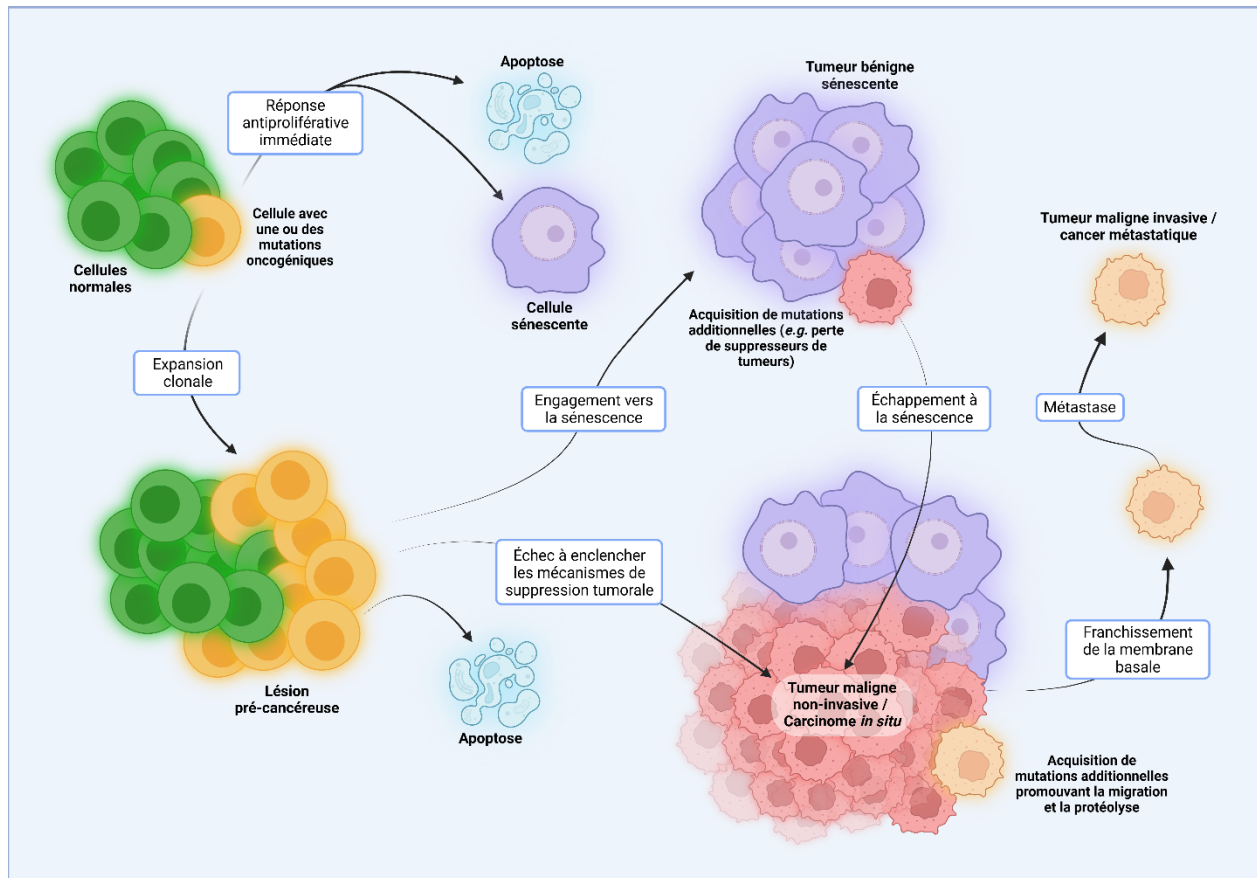


Figure 1.1. Modèle de tumorigénèse.

Lorsqu'une cellule normale acquiert une ou des mutations oncogéniques, elle a trois options principales. Si le stress causé par la mutation est très important, la cellule engagera un programme de mort cellulaire (apoptose). Si ce stress est en deçà du seuil d'induction de l'apoptose, la cellule entrera dans un programme de suppression tumorale nommé sénescence. Autrement, si la mutation confère un avantage sélectif en termes de prolifération, cette cellule engagera une expansion clonale afin de générer une lésion pré-cancéreuse. En absence d'acquisition de mutations supplémentaires protégeant ce clone, des mécanismes de suppression tumorale tels que l'apoptose ou la sénescence pourront être engagés à nouveau. L'émergence de différents clones pourra ainsi avoir lieu dans un tel contexte de pression de sélection, expliquant l'hétérogénéité cellulaire observée dans le cancer. Si la sénescence est engagée, il faudra des mutations supplémentaires telles que la perte de gènes suppresseurs de tumeurs afin de permettre un échappement et la génération d'une tumeur maligne non-invasive ou carcinome *in situ*. En absence d'engagement de mécanismes de suppression tumorale, la lésion pré-cancéreuse évoluera directement vers le carcinome *in situ*. Il faudra alors que ces clones acquièrent des mutations supplémentaires afin de leur permettre de traverser la membrane basale et de métastaser, générant un cancer métastatique. Figure réalisée avec BioRender et adaptée à partir de (16).

de franchir la membrane basale et de migrer pour envahir des tissus environnants, générant ainsi des métastases.

Une fois avoir passé à travers toutes ces étapes mutationnelles pouvant s'échelonner sur de multiples années, les cellules cancéreuses finissent par acquérir certaines propriétés qui leur sont

propres. Ce sont d'ailleurs ces propriétés, dont la liste ne cesse de s'accroître, qui sont aujourd'hui utilisées pour définir des cellules cancéreuses, soit : une insensibilité aux signaux antiprolifératifs couplée à une signalisation soutenue des voies pro-prolifératives, une capacité à échapper au système immunitaire, une réactivation de la télomérase afin de proliférer sans limites (immortalisation), une propension à générer un micro-environnement pro-inflammatoire stimulant la croissance tumorale, une capacité à induire de l'angiogenèse afin d'éventuellement métastaser, une présence d'instabilité génomique et plusieurs mutations, une résistance aux mécanismes de suppression tumorale (sénescence et apoptose), une dérégulation du métabolisme cellulaire, le développement d'une plasticité phénotypique (capacité à se dédifférencier / transdifférencier), une reprogrammation épigénétique et finalement une croissance influencée par la composition polymorphique du microbiome et par la présence de cellules sénescents ayant un sécrétome pro-inflammatoire (17).

1.2.1. L'évolution de l'adénocarcinome canalaire pancréatique

Les étapes mutationnelles susmentionnées requises afin de générer des cellules cancéreuses sont de mieux en mieux comprises dans certains types de cancer, notamment l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC). Ainsi, les PDAC vont provenir de lésions précurseurs bénignes du pancréas dont il existe trois types, soit les néoplasmes intraépithéliaux du pancréas (PanIN) qui représentent environ 90% des cas, les néoplasmes intracanaux papillaires et mucineux du pancréas (IPMN) qui représentent 5 à 10% des cas et les néoplasmes kystiques mucineux (MCN) qui représentent moins de 3% des cas (18,19). Les MCN étant des lésions plutôt rares, nous nous focaliserons ici sur les PanIN et IPMN étant les lésions précurseurs les plus fréquentes. Ainsi, tel qu'illustré dans l'article de Patra *et al.* (19), dans le cas des PanINs, ces lésions proviennent initialement de cellules acinaires exocrines ayant subi une métaplasie acinaire-canaux (acinar-to-ductal metaplasia; ADM), *i.e.* une dé-différenciation suivi d'une re-différenciation en cellule canalaire (20,21). Dans le cas des IPMN, ces lésions proviennent directement des cellules canaux du pancréas. Dans les deux cas, l'événement initial sera le plus souvent une mutation sporadique G12V ou G12D du gène KRAS encodant une petite GTPase, cette mutation étant retrouvée dans $\pm 90\%$ des PanIN (22) et $\pm 70-80\%$ des IPMN (23,24). Il est à mentionner que selon le sous-type de IPMN, la mutation R201H du gène GNAS, encodant une sous-unité α couplée aux protéines G, sera parfois légèrement plus fréquente que KRAS dans les événements initiaux.

Somme toute, la moitié des IPMN aura une double mutation GNAS et KRAS (23). Cette mutation oncogénique de KRAS mène ainsi à une hyperactivation de la voie RAS/MAPK, déclenchant le programme de sénescence induite par les oncogènes (OIS) comme mécanisme de sécurité. Conséquemment, les premiers stades de PanIN classiquement nommés PanIN-1 et 2, et les premiers stades d'IPMN classiquement nommés de bas grade et de grade intermédiaire, correspondent à des lésions bénignes pouvant demeurer non prolifératives pendant plusieurs années chez un patient. De ce fait il a été montré pour ces deux types de lésions précurseurs qu'elles étaient caractérisées par la présence de cellules sénescents (25-28). De plus, grâce à des modèles murins transgéniques permettant l'expression de l'oncogène KRAS^{G12D} spécifiquement dans le pancréas (résultat du croisement Pdx1-Cre avec le modèle LSL-KRAS^{G12D}), il a été montré que la simple activation de cet oncogène était suffisante afin d'initier la formation de PanIN (29). Aussi, l'activation de KRAS^{G12D} couplée à l'inactivation de SMAD4, un gène fréquemment inactivé dans l'évolution des lésions bénignes vers malignes du pancréas, a été montrée pour mener à la formation d'IPMN (30). Enfin, après une longue période de latence, ces PanIN et IPMN peuvent parfois progresser vers l'adénocarcinome (PDAC). La fréquence et la vitesse de cette progression vers PDAC est d'ailleurs démultipliée lorsque couplée à la perte d'un gène suppresseur de tumeur naturellement perdu dans cette progression chez l'humain. C'est notamment le cas avec la perte de CDKN2A/P16 (31), TP53/P53 (32), SMAD4 (33) ou RNF43 (34), qui vont permettre un échappement au programme de sénescence dans les lésions bénignes, générant un cancer. Ainsi, pour résumer, l'hyperactivation initiale de l'oncogène KRAS (et/ou GNAS pour les IPMN) permet la génération de lésions bénignes non-prolifératives caractérisées par la présence de cellules sénescents. Ensuite, la perte des gènes suppresseurs de tumeurs P16 (chez les PanIN) ou RNF43 (chez les IPMN) permet un échappement au programme de sénescence afin de générer un carcinome *in situ* (cancer localisé). Enfin, la perte/inactivation subséquente des gènes P53 et SMAD4 permet de générer un cancer invasif.

À titre informatif, il est à mentionner que les lésions bénignes et malignes du pancréas susmentionnées seront rediscutées dans l'article 2 de cette thèse puisque ce modèle servira à valider *in vivo* nos observations effectuées *in vitro*. Ainsi, il convient de mentionner que la nomenclature des lésions précurseurs a récemment été mise à jour. De ce fait, les PanIN-1 et 2 ainsi que les IPMN de bas grade et grade intermédiaire ont été reclassés comme étant des dysplasies de bas grade, alors

que les PanIN-3 et IPMN de haut grade, tous deux étant des carcinomes *in situ*, ont été reclassés comme des dysplasies de haut grade (35).

1.3. La voie RAS/MAPK : un carrefour signalétique majeur

Tel que démontré dans la section précédente, les mutations GOF de l'oncogène RAS sont un événement clé dans le processus de tumorigénèse dans le cancer du pancréas. Cependant, il faut mentionner que ceci n'est pas restreint à ce type de cancer. En effet, RAS est l'oncogène le plus fréquemment muté à travers tous les cancers humains. De ce fait, il est estimé qu'environ 20% de tous les cancers humains (tous types confondus) ont une mutation dans l'une de ses trois isoformes, soit KRAS, HRAS ou NRAS (36). La voie des MAP kinases (*Mitogen-activated protein kinases*; MAPK) en aval de RAS étant une voie de réponse aux signaux mitogéniques, ces mutations vont généralement mener à une prolifération accrue des cellules. Cependant, il est aujourd'hui clairement établi que l'activation de cette même voie mène également à un phénotype complètement antagoniste, soit la sénescence cellulaire (4) dont nous avons brièvement parlé et qui sera abordé plus en détail prochainement. Les mécanismes décisionnels précis d'engagement vers la prolifération versus la sénescence suivant l'activation de l'oncogène RAS ne sont cependant toujours pas bien compris. Le deuxième article qui sera présenté dans cette thèse portera d'ailleurs sur cette décision d'engagement. Ainsi, une description de la voie en aval de RAS est nécessaire afin de bien comprendre le rôle des effecteurs qui seront discutés dans cet article.

1.3.1. La voie de signalisation RAS/MAPK

La voie de signalisation RAS/MAPK est un carrefour signalétique majeur dans la cellule qui implique une cascade de phosphorylations effectuées par différentes kinases. Ainsi, dans des conditions normales, la petite GTPase RAS sera recrutée à la membrane plasmique via des modifications post-traductionnelles impliquant sa farnésylation et sa palmitoylation (37,38). En parallèle, certains facteurs de croissance extracellulaires iront lier leurs récepteurs tyrosine kinase (RTK) respectifs (EGF:EGFR, FGF:FGFR, etc.), ce qui induira une auto-transphosphorylation et dimérisation du récepteur en question (39-41). La protéine adaptatrice GRB2 viendra alors lier les tyrosines phosphorylées sur la partie intracellulaire du récepteur via son domaine SH2 (42). La présence de GRB2 permettra ainsi le recrutement subséquent de la protéine échangeuse de nucléotide guanine (GEF) SOS (*Son of Sevenless*) via sa liaison aux domaines SH3 de GRB2 (43).

SOS permet l'échange du GDP en GTP dans la GTPase RAS permettant ainsi son activation. Les kinases RAF (A, B ou C-RAF) sont alors recrutées à la membrane via des interactions avec RAS liée au GTP (44,45). Cependant, il faut mentionner que le processus d'activation des kinases RAF par RAS demeure à ce jour quelque peu nébuleux. Néanmoins, on sait qu'il implique des événements multiples de phosphorylations (activatrices et inhibitrices) par différentes kinases (46-49), la dimérisation des kinases RAF (50) et des interactions avec différentes protéines (51). Une fois actives, les kinases RAF vont activer par phosphorylation les kinases à double spécificité (sérine/thréonine et tyrosine) MEK1/2 (52,53) en aval, qui vont à leur tour activer par phosphorylation les sérine/thréonine kinases ERK1/2 étant leur seuls seules cibles connues (54-56). Ces kinases ERK1/2 vont alors pouvoir phosphoryler une multitude d'effecteurs différents ayant un motif Pro-X-Ser/Thr-Pro, tant cytoplasmiques que nucléaires, afin de moduler leur activité. Ainsi, selon le contexte cellulaire et le niveau d'activation de la voie ERK1/2, ces kinases vont pouvoir réguler différents processus tels que la différenciation, la mort cellulaire, la sénescence et la prolifération cellulaire (57,58).

Il faut mentionner qu'il existe également des voies de signalisation MAPK parallèles à celles des kinases RAF-MEK-ERK. Cependant, celles-ci sont activées en aval de récepteurs différents de ceux activant la petite GTPase RAS. Ainsi, il y a la voie des MAP kinases P38 ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$) qui joue un rôle important dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire via l'activation du suppresseur de tumeur P53 (59,60) et dans l'inflammation en régulant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (61). Il y a aussi la voie des MAP kinases JNK1-3, également connues sous le nom de *Stress-Activated Protein Kinases* (SAPK). Comme leur nom l'indique, ces dernières sont activées dans des conditions de stress (inflammation, dommages à l'ADN, etc.) et elles régulent des processus antagonistes tels que la survie cellulaire et l'apoptose selon la durée et l'intensité de leur signalisation (62). Enfin, il y a également les voies des MAP kinases ERK3/4, ERK5 et ERK7/8 qui semblent aussi réguler différents processus. Cependant, leurs fonctions demeurent moins étudiées que les autres MAPK susmentionnées (63).

De plus, l'activation de RAS va permettre d'enclencher des voies de signalisation parallèles à la voie MAPK, notamment l'importante voie pro-survie PI3K/AKT/mTOR. Cette voie de signalisation est un deuxième carrefour signalétique important dans la cellule, régulant différents processus. Ainsi, suivant l'activation de RAS par GRB2-SOS tel que susmentionné, RAS ira

parallèlement activer la sous-unité catalytique de PI3K p110. Une fois PI3K activée, cette dernière pourra convertir le phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate (PIP3). Ce dernier se fera lier par le domaine PH de la kinase AKT, permettant son activation et la phosphorylation subséquente d'une myriade de protéines régulant différents processus tels que le cycle cellulaire, la survie cellulaire et la transformation (64,65).

1.3.2. Régulation transcriptionnelle en aval des kinases ERK1/2

En ce qui concerne les kinases ERK1/2, tel qu'illustré à la **Figure 1.2**, une des caractéristiques principales de leur activation est l'induction rapide d'un ensemble de gènes appelés *Immediate Early Genes* (IEG) (66) qui sont transcriptionnellement régulés par le facteur de transcription (TF) *Serum Response Factor* (SRF) qui se lie aux éléments de réponse sérique (SRE) présents dans les régions régulatrices des IEG. De ce fait, les kinases ERK vont tout d'abord activer par phosphorylation un premier ensemble d'effecteurs comprenant les protéines RSK, MNK et MSK, permettant de relayer la signalisation. L'effecteur nommé P90/RSK va à son tour phosphoryler SRF afin d'augmenter sa liaison à l'ADN (67). En parallèle, les kinases ERK vont également activer une large famille de TFs appelée ETS (*E26 transformation-specific*). Une des sous-familles de ces facteurs ETS nommée *Ternary Complex Factor* (TCF) jouera alors un rôle important puisqu'un de ses trois membres, ELK-1, une fois activé par ERK (68), ira s'associer avec SRF (69,70). Ceci va permettre à ELK-1 phosphorylé de recruter le complexe coactivateur transcriptionnel Mediator via sa sous-unité MED23 au niveau des promoteurs IEG (71,72) afin d'initier la transcription des IEG, des gènes typiquement associés à la prolifération et à la différenciation cellulaire. Parmi ces gènes, il y a notamment EGR1, c-JUN, JUNB, FOSB et c-FOS. À ce moment, si le signal des kinases ERK persiste toujours après que les ARNm des gènes susmentionnés aient été traduits, ces dernières vont phosphoryler c-FOS. Ceci le stabilise et permet son association avec JUN (73), formant ainsi le complexe hétérodimérique AP-1. Ce dernier est responsable de la transcription des *Delayed Early Genes* (DEG), des gènes régulant divers processus tels que la différenciation, la prolifération, la sénescence et l'apoptose. De plus, parmi ces gènes se trouvent aussi des rétro-inhibiteurs de la voie, dont nous discuterons sous peu. Nous reviendrons aussi plus tard sur l'importance des facteurs susmentionnés, notamment SRF et AP-1.

Il est à mentionner que le motif de liaison à l'ADN 5'-CCGGAA-3' par les facteurs ETS n'étant pas très complexe, cela implique des propriétés de liaison à l'ADN similaires pour la plupart

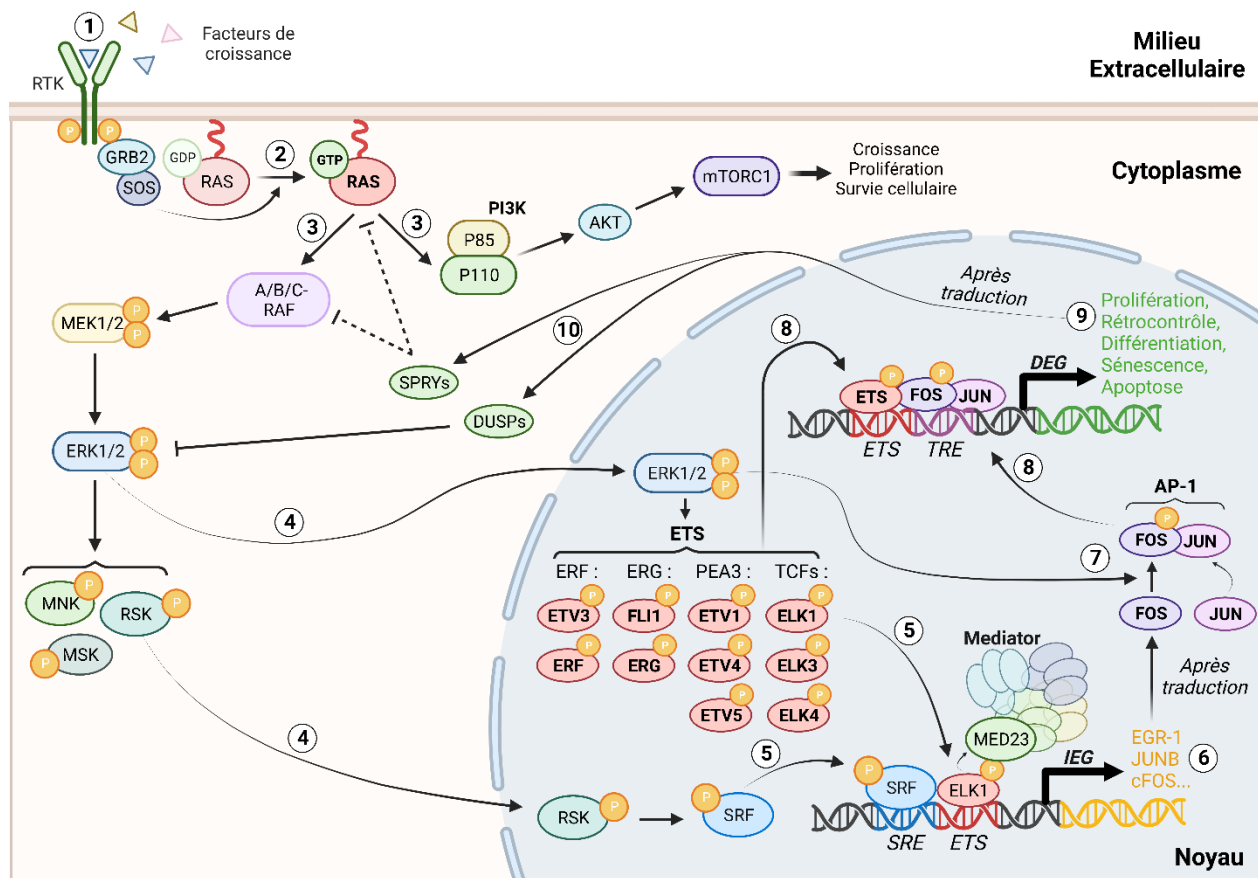


Figure 1.2. Régulation transcriptionnelle en aval de la voie RAS-MAPK canonique.

Suivant la liaison de facteurs de croissance à leur récepteur tyrosine kinase [1], il y aura transphosphorylation de ce dernier permettant le recrutement du facteur d'échange de nucléotide guanine SOS médiant l'échange de GDP en GTP sur la petite GTPase RAS [2]. Une fois active, cette dernière activera ses effecteurs en aval [3], notamment la voie canonique des MAP kinases (RAF-MEK-ERK) et la voie PI3K-AKT. Suivant la cascade de phosphorylation des MAPK, les kinases ERK activeront des cibles cytoplasmiques telles que P90RSK. Cette dernière transloquera au noyau [4] pour phosphoryler SRF et permettre sa liaison aux SRE [5]. Parallèlement, les kinases ERK transloqueront également au noyau [4] pour activer une multitude de facteurs ETS dont ELK-1 qui liera le site ETS de l'élément bipartite SRE-ETS [5] également lié par SRF. Ceci permettra l'induction transcriptionnelle des *Immediate Early genes* (IEG) [6] dont fait partie FOS. Si les kinases ERK demeurent actives suffisamment longtemps, celles-ci phosphoryleront alors FOS [7], permettant son association avec JUN afin de former le complexe AP-1. Ce dernier ira alors lier le site TRE des éléments bipartites ETS-TRE [8] également liés par des facteurs ETS. La liaison de différents facteurs ETS conférera une sélectivité dans l'induction des gènes alors transcrits [9]. Ces gènes sont nommés *Delayed Early genes* (DEG) et contiennent entre autres des régulateurs négatifs de la voie permettant un rétrocontrôle [10]. ETS, facteurs de transcription E26 Transformation-Specific; SRE, Serum Response Element; AP-1, facteur de transcription Activator protein 1; TRE, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) response element. Figure réalisée avec BioRender.

des membres de cette famille (74). Néanmoins, il a abondamment été montré que les différents facteurs ETS ont tout de même des fonctions biologiques distinctes (70). Ainsi, cette spécificité pourrait être attribuable à une co-régulation avec d'autres facteurs de transcription via différents éléments de régulation génique, inhibiteurs ou activateurs, flanquant les régions étant spécifiques

à des sous-familles de facteurs ETS. De tels éléments bipartites sont d'ailleurs souvent observables dans la régulation de la transcription par les ETS, notamment avec les facteurs de transcription ETS1 et RUNX1 qui se lient à des sites RUNX1/ETS pour réguler l'hématopoïèse (75,76). De plus, l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1, lui-même une cible des facteurs ETS, est co-régulée par son association avec d'autres facteurs ETS. À titre d'exemple, il a été suggéré que FOS dans le complexe AP-1, et ETV4, un facteur ETS de la sous-famille PEA3, pourraient lier simultanément le complexe coactivateur Mediator afin de co-réguler certains gènes (77). Ainsi, l'activation parallèle de différents facteurs de transcription par les kinases ERK1/2 permet une modulation fine du programme transcriptionnel.

Il faut également mentionner que la voie RAS/MAPK est très finement régulée via des boucles de rétrocontrôle induites tant au niveau transcriptionnel que post-traductionnel. Notamment, les kinases ERK vont médier la transcription de phosphatases à double spécificité (DUSP) qui vont permettre d'éteindre la signalisation via la déphosphorylation des kinases ERK suivant la fin d'un stimulus. Il faut toutefois mentionner que le mécanisme exact d'induction des phosphatases n'est toujours pas bien caractérisé. Néanmoins, il a été montré que dans des conditions normales, le répresseur transcriptionnel CIC réprime l'expression de DUSP6, puis que suivant l'activation des kinases ERK, celles-ci vont activer P90/RSK qui va à son tour phosphoryler CIC, menant à son export nucléaire et à la dérégulation de DUSP6 (78). DUSP6 serait alors induit via l'activation ERK-dépendante des facteurs ETS en aval de la voie (79). Parmi les autres cibles transcriptionnelles induites par la voie ERK médiant un rétrocontrôle négatif sur la voie, il y a la famille de protéines Sprouty (SPRY1-4). Cependant, le mécanisme d'action de ces protéines est toujours incertain (80) et semble être dépendant du contexte cellulaire, puisque certains rapportent une inhibition de la voie en amont de RAS (81) et d'autres au niveau de RAF (82).

Enfin, il est intéressant de mentionner que dans un contexte d'initiation de la tumorigénèse impliquant des mutations GOF dans l'oncogène RAS, la mutation en glycine 12 (G12V/D), une des mutations les plus fréquentes, rend la protéine constitutivement liée au GTP. Ainsi, puisque la protéine GAP (*GTPase-Activating Protein*) ne peut pas stimuler l'activité d'hydrolyse du GTP par RAS, la GTPase demeure constitutivement active indépendamment de la présence de mitogènes (83,84). S'en suit donc une hyper-signalisation via les kinases ERK qui, selon le contexte cellulaire, mènera à une prolifération soutenue ou à une phase d'hyper-prolifération suivie d'un arrêt stable

de la prolifération, caractéristique de l'état de sénescence cellulaire, tel que nous verrons incessamment.

1.4. La sénescence cellulaire : un puissant mécanisme de suppression tumorale

Ainsi, pour essayer de mieux comprendre comment une signalisation par la voie RAS/MAPK peut mener à des destins cellulaires antagonistes tels que la prolifération et la sénescence, il incombe tout d'abord de définir précisément la sénescence cellulaire. De plus, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse sera centré sur différents aspects de ce phénotype cellulaire, soit le phénotype sécrétoire associé aux cellules sénescents (Article 1), le processus d'engagement des cellules dans ce programme (Article 2) et l'étude d'un mécanisme impliqué dans la maintenance de la sénescence cellulaire (Article 3).

1.4.1. Découverte de la sénescence et ses inducteurs

La sénescence cellulaire a tout d'abord été identifiée par Leonard Hayflick dans les années soixante, suivant l'observation que des cellules primaires gardées longtemps en culture finissaient par perdre leur potentiel de prolifération jusqu'à atteindre un seuil critique où elles arrêtent de proliférer (85). Autrement dit, les cellules avaient un nombre fini de divisions cellulaires qu'elles pouvaient faire avant d'être compromises et d'arrêter de proliférer. Il ne s'agissait cependant pas de cellules en train de mourir, mais plutôt de cellules viables, toujours métaboliquement actives mais simplement non-prolifératives (85). Il fallut presque trois décennies avant de comprendre que cette observation était due à une attrition progressive des télomères à la fin de chaque division cellulaire. Ceci menait ultimement à une perte de protection de l'extrémité des chromosomes et une incapacité à répliquer l'ADN dans ces régions, menant ainsi à un arrêt stable du cycle cellulaire (86). À l'inverse, des cellules immortalisées et/ou cancéreuses semblaient exprimer la télomérase, une polymérase permettant de rallonger les télomères pour contrebalancer la perte à chaque division cellulaire (86). Il est maintenant établi que des cellules primaires humaines subissent une attrition des télomères à chaque division cellulaire jusqu'à atteindre une limite nommée la limite de Hayflick, après laquelle les cellules cessent de proliférer et entrent en sénescence dite répliquative. La sénescence répliquative a ainsi été le premier exemple d'un phénotype de vieillissement à l'échelle cellulaire : la cytogérontologie (87). Dans les années qui ont suivi, il a été

montré que les cellules sénescents s'accumulent avec le vieillissement, tant chez les humains que dans les organismes modèles tels que la souris et qu'elles sont responsables de plusieurs maladies associées au vieillissement telles que l'Alzheimer, l'athérosclérose, l'arthrose, le cancer, etc. (88,89). Nous reviendrons plus en détails sur ces aspects de la sénescence vers la fin de l'introduction.

Depuis, tel qu'illustré en **Figure 1.3**, différents types de stress ont été montrés comme induisant un phénotype de sénescence cellulaire, notamment le stress oxydant, l'exposition à des rayons UV ou γ causant des dommages à l'ADN, la chimiothérapie, l'hyperactivation d'oncogènes, la perturbation de la biogénèse des ribosomes, etc. (88,90). Ainsi, la sénescence induite par ces différents mécanismes est nommée sénescence prématurée, puisqu'elle arrive avant même que les cellules n'atteignent la limite de Hayflick. Il est important de mentionner que ces observations ne se limitent pas qu'à des cellules en culture *ex vivo*, puisque la sénescence prématurée a également été observée dans différents contextes *in vivo* et que les évidences suggèrent un rôle crucial de ce phénotype cellulaire dans le processus de suppression tumorale. De plus, il serait possible de stratifier cette sénescence prématurée en deux grandes catégories, soit la sénescence induite par le stress et la sénescence induite par les oncogènes (90). Tel que leur nom l'indique, la sénescence induite par le stress fait référence à tous les facteurs environnementaux intrinsèques et extrinsèques (*e.g.* ROS et agents chimiothérapeutiques), alors que la sénescence induite par les oncogènes englobe l'hyperactivation d'oncogènes (*e.g.* RAS (4)) et la perte de suppresseurs de tumeurs (*e.g.* PTEN (91)). Conséquemment, la sénescence cellulaire représente un moyen pour l'organisme de se protéger contre l'accumulation de cellules ayant des défauts (*e.g.* dommages à l'ADN, mutations activatrices d'oncogènes, etc.), en arrêtant de manière stable leur prolifération. Autrement, ces cellules pourraient générer plusieurs problèmes, notamment le cancer. Ainsi, chez les jeunes individus, ces cellules sénescents se font éliminer à mesure qu'elles sont générées grâce au phénotype sécrétoire pro-inflammatoire des cellules sénescents (SASP) qui permet le recrutement du système immunitaire (sénescence aiguë). Nous reviendrons plus tard sur cette caractéristique des cellules sénescents, notamment dans l'Article 1.

Cependant, tel qu'illustré en **Figure 1.3**, avec le vieillissement, les cellules sénescents s'accumulent dans le corps, notamment parce que leur élimination ne se fait plus de façon optimale. Les raisons précises de leur accumulation ne sont toujours pas bien comprises, mais tel que nous

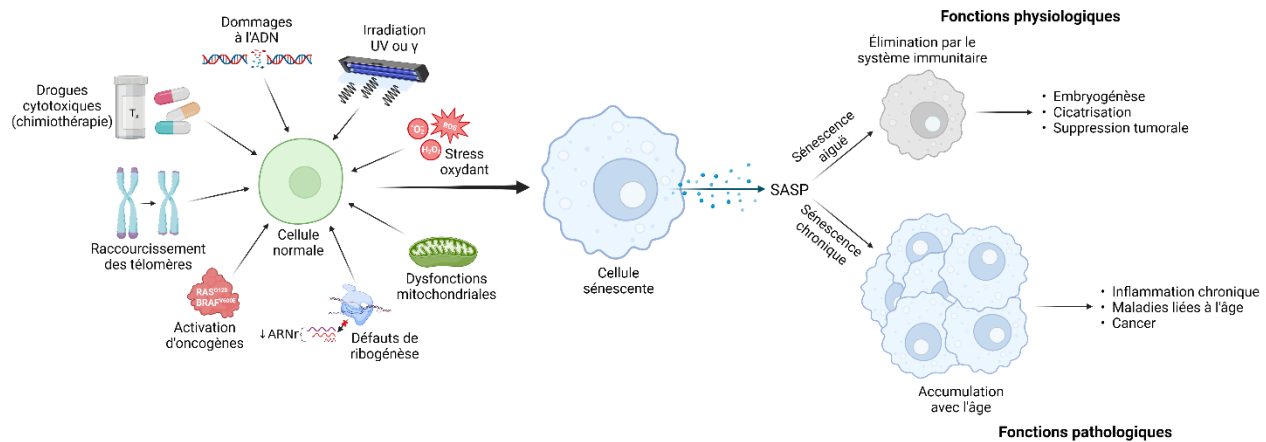


Figure 1.3. Induction de la sénescence et ses conséquences fonctionnelles.

La sénescence est un mécanisme de suppression tumorale induit face à différents stress cellulaires tels que l'attrition des télomères, l'activation d'oncogènes, l'accumulation de dommages à l'ADN causés par la chimiothérapie, l'irradiation ou l'accumulation d'espèces réactives d'oxygène induisant un stress oxydant, ainsi que différentes perturbations cellulaires telles que des défauts de biogénèse des ribosomes ou d'homéostasie mitochondriale. D'un point de vue aigu, la sénescence est bénéfique puisque la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par les cellules sénescentes permet le recrutement du système immunitaire afin d'éliminer ces cellules problématiques. Ceci permet non seulement une suppression tumorale efficace, mais également le processus de cicatrisation et le développement embryonnaire normal. Cependant, d'un point de vue chronique, l'accumulation de cellules sénescentes est plutôt associée à de l'inflammation chronique et à la pathogénèse de plusieurs maladies liées à l'âge dont le cancer. ARNr, ARN ribosomique; SASP, Senescence-Associated Secretory Phenotype. Figure réalisée avec BioRender.

le verrons plus tard, il est connu que la sénescence des cellules souches hématopoïétiques mène à une différenciation biaisée vers la lignée myéloïde au détriment de la lignée lymphoïde, ce qui pourrait en partie expliquer leur élimination moins efficace (92).

Ainsi, une diminution du nombre de lymphocytes T, B et de cellules NK compétents pourrait mener à l'accumulation progressive des cellules sénescentes, menant à de l'inflammation chronique, puisque ces cellules continuent à produire un SASP pro-inflammatoire (sénescence chronique) (93). C'est d'ailleurs cet aspect de la sénescence, aiguë versus chronique, qui a mené à définir la sénescence comme étant un phénotype à double tranchant (*double-edged sword*). En effet, de façon aiguë, la sénescence joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire (94-96), dans la cicatrisation en limitant la fibrose (97,98) et dans la suppression tumorale (5,91,99-101). Cependant, de façon chronique, la sénescence médie plutôt de l'inflammation chronique, la fibrose tissulaire et la tumorigénèse via son sécrétome pro-inflammatoire (102-104).

1.4.1.1. La sénescence RAS : dualité oncogène/suppresseur de tumeur

Malgré le fait que ces deux fonctions antagonistes de la sénescence sont aujourd'hui clairement établies, il faut mentionner que ce fut un processus laborieux. En effet, la fonction suppresseur de tumeur associée à la sénescence fut longtemps un sujet de discordance entre chercheurs, puisqu'elle a initialement été identifiée dans le contexte de la sénescence induite par un mutant hyperactif de l'oncogène RAS (4). La voie de signalisation RAS/MAPK étant généralement décrite comme oncogénique puisqu'elle médie la prolifération cellulaire en réponse à des mitogènes, la découverte en 1997 de Dr. Manuel Serrano vint bousculer ce dogme. En effet, c'était la première démonstration qu'un oncogène pouvait également induire de la sénescence cellulaire. La sénescence induite par RAS *in vivo* fut dès lors le sujet de nombreux débats, puisqu'il a ensuite été montré que des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) exprimant un seul allèle constitutivement actif de KRas n'entraient pas en sénescence mais devenaient immortalisés (105). Il a ensuite été montré que ces souris développaient des adénomes (tumeurs bénignes) au niveau des poumons qui progressaient rarement en adénocarcinome (tumeur maligne) et que ces adénomes étaient caractérisés par une forte présence de cellules sénescents *in vivo* (100). Cela suggérait qu'un même signal pouvait être intégré de différentes façons selon le type cellulaire. De plus, il a ensuite été montré que la déplétion par ARN interférant (shRNA) de NF1, la GAP stimulant l'hydrolyse du GTP lié par RAS et engendrant donc l'arrêt de signalisation, immortalisait des MEFs, alors que sa déplétion dans des fibroblastes diploïdes humains normaux (IMR90 et BJ) induisait une sénescence dépendante de RAS (106). Enfin, il a également été montré qu'une forte amplitude de signalisation par RAS menait à de la sénescence, alors qu'une augmentation plus modeste d'amplitude menait plutôt à une hyper-prolifération (107). Il existe ainsi une zone en termes d'amplitude de signalisation permettant une prolifération, zone au-delà de laquelle les cellules entrent plutôt en sénescence et cessent de proliférer. Cette zone idéale pour la prolifération a été nommée la zone boucle d'or (*Goldilocks zone*) en hommage au conte éponyme. Enfin, notre laboratoire a également montré que les kinases ERK étaient essentielles pour l'engagement vers la sénescence induite par RAS, puisque leur déplétion ou inhibition mène à un contournement de la sénescence et à la transformation des cellules (108).

De manière intéressante, il a également été suggéré que la localisation des kinases ERK1/2 permettrait d'expliquer leurs fonctions antagonistes, *i.e.* pro-prolifération vs antiprolifération.

Quoique certains rapports semblent faire état de fonctions antiprolifératives des kinases ERK1/2 lorsque localisées au noyau, cela pourrait aussi être lié à leur statut de mono/dimérisation. En effet, il semble tout de même y avoir un consensus plus ou moins général selon lequel les fonctions antiprolifératives de ces kinases seraient plutôt associées à leur localisation cytoplasmique (109,110). Conséquemment, une localisation nucléaire serait plutôt pro-proliférative. De plus, cette fonction cytoplasmique des kinases ERK1/2 semblerait régulée par le facteur PEA15 qui agit comme séquestrateur des kinases en empêchant leur translocation nucléaire (109,111). La liaison de PEA15 aux kinases ERK1/2 dans le cytoplasme empêche d'ailleurs leur déphosphorylation (112), favorisant ainsi l'accumulation de p-ERK et la phosphorylation de cibles cytoplasmiques au détriment des cibles nucléaires. Ainsi, la sénescence induite par RAS est aujourd'hui bien acceptée et est un bon exemple du fait que les termes «suppresseur de tumeur» et «oncogène» sont des termes qui dépendent du contexte/génotype cellulaire. Depuis, plusieurs autres modèles de sénescence induite par les oncogènes ont été décrits, notamment par E2F1/3 (113,114), cycline E (115), AKT (116), RAF (5,117) et RAS (4,100,107).

1.4.2. Arrêt du cycle cellulaire dans la sénescence : le rôle des voies RB et P53

Tel que mentionné ci-avant, les cellules sénescents sont caractérisées par un arrêt stable du cycle cellulaire (SAPA : *Senescence-Associated Proliferation Arrest*) généralement à la transition G1/S, mais parfois en G2/M selon le modèle (118). Contrairement aux cellules quiescentes capables de reprojiférer en présence de mitogènes, les cellules sénescents demeurent non-prolifératives même en présence de tels facteurs. Cet arrêt est médié par l'activation de deux principales voies de suppression tumorale, soit la voie RB (rétinoblastome) et la voie P53. Ainsi, il est important de prendre quelques instants afin de comprendre plus en détail le rôle de ces deux voies dans la sénescence et l'implication de leur inactivation dans le processus de tumorigénèse.

Tout d'abord, la progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire implique des points de restriction contrôlés par des kinases dépendantes des cyclines (CDK). Ainsi, durant la phase G1, le complexe CDK4/6-Cycline D phosphoryle la protéine du rétinoblastome (RB). Ceci mène à une inhibition partielle de RB qui n'est plus parfaitement en mesure de lier et séquestrer les facteurs de transcription de la famille E2F (119). Cette activation partielle des E2Fs est suffisante afin de leur permettre de transcrire certains gènes cibles, notamment la Cycline E (120-

122). Cette dernière peut alors aller lier CDK2 afin de former un complexe actif capable de phosphoryler davantage RB, permettant une activation complète des facteurs E2Fs (123-125). Ces derniers peuvent donc aller lier leurs éléments de régulation afin de permettre la transcription de gènes requis pour la phase S, notamment des facteurs impliqués dans la réplication de l'ADN (e.g. CDC6, MCM6, etc.) (126,127). Une fois en phase S, c'est plutôt le complexe CDK2-Cycline A qui prend le relais pour permettre la progression à travers les phases S-G2, puis l'engagement en mitose est contrôlé par le complexe CDK1-Cycline B. Finalement, vers la fin de la mitose, l'activité de ce complexe diminue puis le complexe CDK4/6-Cycline D se réactive afin de permettre un nouveau cycle cellulaire (119).

L'arrêt en G1/S observé dans la majorité des modèles de sénescence est principalement dépendant de l'induction de P16^{INK4A}, un inhibiteur du complexe CDK4/6-Cycline D. L'inhibition de CDK4/6 empêche donc la phosphorylation de RB qui demeure lié aux facteurs E2Fs, empêchant la transcription de gènes requis pour la progression vers la phase S. Il faut dire que le locus INK4 est normalement réprimé par le complexe répresseur Polycomb (PcG) dont nous discuterons plus tard dans la section concernant la régulation de la chromatine dans la sénescence. Cependant, suivant un stress inducteur de sénescence, l'inhibition par les PcG sera levée, permettant une dérégulation de ce locus et la transcription de P16. Différents mécanismes ont été rapportés pour l'induction de P16 dans la sénescence. Notamment, il a été montré que les niveaux de FOXA1, un facteur de transcription pionnier, augmentent dans la sénescence répllicative et la sénescence par RAS, et que ce dernier antagoniserait l'action des PcG au locus INK4 (128). Ainsi, par son activité pionnier, FOXA1 permettrait de diminuer la densité nucléosomale à ce locus, favorisant ainsi le recrutement d'autres facteurs promouvant la transcription de P16. De plus, il a été montré que les kinases ERK et P38 en aval de la voie RAS-MAPK activent une kinase nommée 3PK et que cette dernière phosphorylerait la sous-unité BMI1 du complexe répresseur PRC1 PcG. Ceci mènerait à la dissociation de ce complexe répresseur (129). De plus, la transcription de P16 serait régulée par les facteurs de transcription ETS en aval des kinases ERK (130) et par le recrutement de MLL1 (131), une H3K4 méthyltransférase apposant des marques d'activation transcriptionnelle. Il semble donc y avoir un lien direct entre l'activation des kinases ERK et l'induction de P16 dans un contexte de sénescence induite par RAS.

Enfin, puisqu'il n'existe pas à ce jour de marqueur universel pour identifier des cellules sénescences, il est de coutume d'utiliser différents marqueurs en parallèle. De ce fait, il est important de mentionner que P16 est un des marqueurs les plus couramment utilisés à ces fins, tant avec des cellules en culture *ex vivo* qu'avec des modèles animaux *in vivo*. Ainsi, plusieurs importantes découvertes faites dans les dernières années dans le domaine de la sénescence ont été accomplies grâce à l'établissement de modèles murins transgéniques ayant le promoteur de P16 couplé à des rapporteurs fluorescents (132,133) ou à des gènes suicide (98,134). Nous reviendrons d'ailleurs sur ces modèles murins vers la fin de l'introduction.

Il faut aussi mentionner que le locus INK4 codant pour P16^{INK4A} code également pour trois autres inhibiteurs du complexe CDK4/6-Cycline D, soit P14/ARF, P15^{INK4B} et P18^{INK4C}. En ce qui a trait à P14/ARF, ce dernier joue également un rôle important dans le programme de sénescence puisqu'il permet d'activer la seconde voie majeure de suppression tumorale dans la cellule, *i.e.* la voie P53. En effet, il a été montré que ARF lie directement HDM2, la E3 ubiquitine ligase du facteur de transcription P53 (135,136), et la séquestre, empêchant ainsi la dégradation protéasomale de P53, favorisant sa stabilisation et son activité transcriptionnelle (137,138). De plus, plusieurs modifications post-traductionnelles de P53 permettent une augmentation de son activité dans la sénescence, notamment son acétylation dépendante d'histones acétyltransférases (HATs) dont nous discuterons plus tard et sa phosphorylation. La phosphorylation en Ser15 de P53 par la kinase ATM de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (139,140) est d'ailleurs un autre marqueur fréquemment utilisé pour l'identification de cellules sénescences. Ainsi, une fois activé, P53 va permettre un arrêt du cycle cellulaire via l'induction transcriptionnelle de différentes cibles, notamment CDKN1A (141) codant pour la protéine P21^{CIP1}/WAF1, un important inhibiteur des CDK1/2/4/6. Ainsi, P21 sera requis tant pour l'arrêt en G1/S (142,143) qu'en G2/M (144). De ce fait, il est important de mentionner que P21 est, lui aussi, un marqueur couramment utilisé dans le domaine pour identifier des cellules sénescences. Parmi les autres cibles transcriptionnelles importantes de P53 médiant l'arrêt de prolifération, il y a GADD45 (145,146) et 14-3-3 σ (147,148), toutes deux inhibant via différents mécanismes le complexe CDK1-Cycline B requis pour la mitose. De plus, P53 agit comme répresseur transcriptionnel du gène codant pour la cycline B1, ce qui lui permet d'agir à un second niveau pour réguler le point de restriction G2/M (149). Enfin, en réponse à l'activation d'oncogènes et aux dommages à l'ADN, P53 induit transcriptionnellement PML (150) qui forme des structures nucléaires appelées corps de PML, servant entre autres à

séquestrer les facteurs E2Fs liés à RB (151). Nous reviendrons d'ailleurs sur ces structures un peu plus tard dans l'introduction.

Ainsi, dans le contexte de la sénescence induite par RAS dans des cellules humaines normales, les deux voies P16^{INK4A}/RB et P53 sont enclenchées. Cependant, l'inactivation d'une seule voie n'est pas suffisante pour contourner/échapper à ce programme de suppression tumorale (4). Il faut ainsi que les deux voies soient inactivées pour médier le processus de tumorigénèse, ce qui n'est pas le cas chez la souris où l'inactivation d'une seule voie est suffisante pour contourner/échapper à la sénescence (4). Il faut cependant mentionner que contrairement aux cellules humaines, les cellules murines expriment la télomérase (Tert). Ceci leur permet donc de résister à la sénescence répllicative, contribuant ainsi à leur immortalisation, une étape importante dans le processus de tumorigénèse, d'où leur «facilité» à échapper à la sénescence via l'inactivation d'une seule voie (152).

Ainsi, suivant différents types de stress tels que l'activation aberrante d'oncogènes ou l'accumulation de dommages à l'ADN par exemple, les cellules pourront entrer dans un phénotype d'arrêt stable de prolifération nommé sénescence cellulaire. Il est à mentionner que cet arrêt de prolifération fut longtemps considéré irréversible du fait que la sénescence a initialement été étudiée dans un contexte d'attrition des télomères, empêchant ainsi toute division cellulaire sans catastrophe mitotique dans des cellules primaires. Il est désormais bien établi que la sénescence dite prématurée, n'est non pas irréversible, mais plutôt stable et que cette stabilité est dépendante du contexte cellulaire, *i.e.* cellules primaires *vs* cancéreuses, du génotype et de l'inducteur de sénescence. Conséquemment, l'inactivation par répression épigénétique, délétion ou mutation d'acteurs importants des deux principales voies de suppression tumorale P16^{INK4A}/RB et P53 permettrait de déstabiliser cet arrêt de prolifération, ce qui est en effet observé dans le processus de tumorigénèse.

1.4.3. Les voies de réponse aux dommages à l'ADN dans la sénescence

Tel que mentionné ci-avant, l'activation de P53 dans la sénescence est généralement liée à son statut de phosphorylation par la kinase ATM de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR). Dans la majorité des cas, cette activation de P53 résulte de l'accumulation de dommages à l'ADN observables dans différents modèles de sénescence tels que la sénescence induite par thérapie et la sénescence induite par les oncogènes (153). De ce fait, quoique non observable dans

certaines modèles de sénescence, l'accumulation de foci de dommages à l'ADN est un autre marqueur largement utilisé pour identifier des cellules sénescents. Ces dommages à l'ADN peuvent d'ailleurs se présenter sous différentes formes, soit des bris double-brins, des bris simple-brin ou des bases oxydées (*e.g.* 7,8-dihydro-8-oxoguanine [8-oxoG]) (154), notamment dû à la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) qui est augmentée dans la sénescence et dont nous discuterons à la prochaine section. Le type de dommage dépendra non seulement de l'inducteur des dommages, mais également du type cellulaire, puisqu'il a été montré que contrairement aux fibroblastes, les cellules épithéliales en sénescence répliquative n'activent pas les voies de DDR dépendantes d'ATM ou d'ATR, mais accumulent plutôt des bris simple-brins dus au stress oxydant qui ne sont pas réparés (155). Enfin, la pérennisation de ces dommages à l'ADN semble être un facteur important pour la stabilisation du phénotype sénescents, puisqu'il a été montré par divers groupes de recherche que la mise en place de mécanismes permettant d'accélérer la réparation de l'ADN ou permettant de diminuer le stress oxydant à l'origine de ces dommages permettrait aux cellules de contourner la sénescence (156-159).

Une fois les dommages à l'ADN établis, les kinases des voies de DDR, ATR et ATM, seront activées selon qu'il s'agissent de bris simple-brin ou double-brins respectivement. Dans le cas des bris double-brins, l'activation d'ATM va lui permettre d'activer par phosphorylation la kinase en aval CHK2. Cette dernière va à son tour phosphoryler et inactiver la phosphatase CDC25A, empêchant celle-ci d'enlever la phosphorylation inactivatrice sur CDK2, inhibant ainsi la transition G1/S. De plus, ATM et CHK2 vont phosphoryler P53, menant ainsi à l'induction de P21 qui va à son tour inhiber CDK2. Dans le cas de bris simple-brin tels que retrouvés dans des fourches de répliquations bloquées, l'activation de la kinase ATR va lui permettre de phosphoryler et ainsi activer la kinase CHK1 en aval. Cette dernière va alors inactiver la phosphatase CDC25C par phosphorylation, l'empêchant de retirer la phosphorylation inactivatrice sur CDK1, empêchant ainsi la progression vers la phase M. Il est à mentionner que tant dans la voie ATM que la voie ATR, la kinase WEE1 sera responsable de la phosphorylation inactivatrice de CDK1/2 qui est antagonisée par les phosphatases de la famille CDC25. De plus, il existe une signalisation croisée (*cross-talk*) entre ces deux voies puisque dans certains contextes CHK1 est également une cible d'ATM, CDC25A une cible de CHK1, puis ATR/CHK1 peuvent également cibler P53. Au final, selon la sévérité des dommages, l'activation des voies de DDR mènera à l'apoptose ou à un arrêt de la prolifération observé lors de la sénescence, le temps de permettre la mise en place des

mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (160). Néanmoins, certains dommages à l'ADN apparemment irréparables peuvent persister dans des cellules sénescents et former des DNA-SCARS (*DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence*) s'associant aux corps de PML (161). Parmi les autres cibles importantes de ATM et ATR impliquées dans le DDR, il y a notamment la E3 ubiquitine ligase BRCA1, la protéine 53BP1 et le variant d'histone H2A.X (162). À cet effet, il est à noter que la formation de foci nucléaires de 53BP1 et de H2A.X phosphorylée en Ser139 est un autre marqueur largement utilisé pour caractériser des cellules sénescents.

Puisque la surexpression d'une version oncogénique de RAS dans des cellules primaires induit initialement une phase d'hyper-prolifération avant l'établissement du phénotype sénescents, il a été suggéré que cela induisait un stress répliatif médiant l'accumulation de dommages à l'ADN, l'activation des voies de DDR et l'établissement de la sénescence (163). Cependant, il a également été montré que la sénescence par RAS n'était pas toujours couplée à l'accumulation de dommages à l'ADN et à l'activation du DDR (164). De plus, tel que nous le verrons dans l'article 2 et la discussion de cette thèse, plusieurs éléments semblent remettre en question ce modèle, notamment le moment où ces dommages apparaissent dans le temps suivant l'activation de la voie MAPK. Enfin, à ce jour, la ou les cause(s) exacte(s) des dommages à l'ADN dans le contexte de la sénescence induite par RAS n'est pas encore bien caractérisée. Ceci étant dit, plusieurs facteurs y contribuant ont été caractérisés, tels que l'accumulation d'espèces réactives d'oxygène (ROS) issues des dysfonctions mitochondriales observées dans les cellules sénescents (165). Ainsi, la présence de dommages à l'ADN dans les cellules sénescents les prédispose à de l'instabilité génomique, pouvant résulter en l'induction d'apoptose ou au contraire l'échappement à la sénescence selon la sévérité des dommages. De plus, cette instabilité génomique peut résulter en la génération de fragments cytoplasmiques de chromatine (CCFs) amplifiant le phénotype sécrétoire des cellules sénescents comme nous le verrons sous peu.

1.4.4. Changements métaboliques dans la sénescence

Parmi les multiples changements ayant lieu lors de la sénescence cellulaire, il y a notamment une reprogrammation métabolique à grande échelle. Ainsi, plusieurs modèles de sénescence incluant la sénescence induite par RAS se caractérisent par des dysfonctions mitochondriales malgré l'augmentation de leur masse mitochondriale (166). De ce fait, on constate

non seulement une augmentation de la production de ROS tel que susmentionné, mais également une diminution du potentiel membranaire avec une augmentation concomitante de la fuite de protons (167,168). Ces observations peuvent paraître contradictoires de prime abord puisqu'il est bien établi que la diminution du potentiel mitochondrial mène normalement à une diminution de la production de ROS mitochondriaux. Néanmoins, il est également connu que les ROS activent des protéines de découplage capables de diminuer le potentiel mitochondrial et comme de fait, il semble y avoir une augmentation de ces protéines de découplage dans la sénescence (167). De plus, il existe d'autres sources de ROS telles que les NADPH oxydases qui contribuent également à l'augmentation des ROS dans la sénescence, impactant entre autres les voies de DDR (169). Ces défauts sont aussi accompagnés d'une diminution de synthèse d'ATP, menant à l'activation d'AMPK (166) et à une dépendance plus forte à la glycolyse (170,171) expliquant la sensibilité des cellules sénescents à des inhibiteurs de glycolyse (172). Aussi, ces cellules voient leur ratio NAD^+/NADH diminuer de manière importante, affectant ainsi plusieurs enzymes utilisant le NAD^+ comme cofacteur, notamment les poly-ADP-ribose polymérase (PARPs) et les sirtuines (173). D'ailleurs, l'augmentation de masse mitochondriale malgré les dysfonctions observées dans la sénescence serait probablement attribuable à une mitophagie altérée. En effet, il a été montré que P53 réprime la mitophagie en interagissant avec la E3 ubiquitine ligase Parkin (174-176) responsable de cibler les mitochondries défectueuses pour l'autophagie. Enfin, il est connu que les dysfonctions mitochondriales promeuvent l'ouverture de mPTP, une protéine transmembranaire résidant dans la membrane interne mitochondriale, menant à un efflux d'ADN mitochondrial (ADNmt) vers le cytoplasme. Cet ADNmt va alors activer des réponses inflammatoires via la signalisation cGAS-STING et l'activation subséquente de IRF3 ou NF- κ B (177-179). C'est d'ailleurs cette même voie cGAS-STING qui sera activée par les fragments cytoplasmiques de chromatine (CCFs) provenant du noyau précédemment mentionnés (180). En effet, suivant une diminution des niveaux des DNases cytoplasmiques TREX1 et DNase2 dans la sénescence, ces fragments s'accumulent et activent la voie cGAS-STING, médiant en partie le secrétome pro-inflammatoire de ces cellules (180). Cependant, afin d'activer la voie cGAS-STING, ces CCFs doivent tout d'abord être départis de leurs histones via une dégradation dépendante de l'autophagie (181). Cette dégradation d'histones est d'ailleurs facilitée par l'augmentation d'autophagie observée durant la sénescence.

À cet effet, un des marqueurs les plus fréquemment employés pour identifier des cellules sénescents est l'essai enzymatique de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -Gal) (182). Il s'agit d'un essai dans lequel on mesure la capacité des cellules à hydrolyser un substrat nommé X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside) afin de générer un précipité bleu insoluble (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo). Cette réaction dépend de la β -Galactosidase, une enzyme lysosomale dont l'activité et les niveaux sont augmentés dans la plupart des modèles de sénescence (182-184). L'augmentation d'autophagie dans la sénescence serait surtout médiée par la voie P53. En effet, il a été montré que P53 active directement AMPK via la sous-unité AMPK β 1 et que AMPK inhibe la voie mTOR afin de promouvoir l'autophagie (185,186). De plus, P53 induit ses cibles transcriptionnelles SESN1 et SESN2 qui vont également activer AMPK, menant à la phosphorylation de TSC2 et la stimulation de son activité GAP envers la GTPase RHEB, menant à l'inhibition de mTOR (187). Il a aussi été montré que DRAM1, un gène codant pour une protéine de la membrane lysosomale, est une cible transcriptionnelle de P53 requise pour l'induction d'autophagie (188). Il faut cependant mentionner que la régulation de l'autophagie par P53 pourrait toutefois être plus complexe, puisqu'il a été montré que tant l'activation que l'inhibition de P53 mènent à une augmentation d'autophagie (189). Selon cette étude, la fraction cytoplasmique et non nucléaire de P53 pourrait réprimer l'autophagie de manière contexte-spécifique (189). Enfin, malgré le fait que la synthèse protéique (anabolisme) et la dégradation autophagique (catabolisme) soient généralement régulées de manière opposée par mTOR, il a été montré que dans le cas de la sénescence, un nouveau compartiment cellulaire permettait de coupler les deux phénomènes (190). En effet, ce compartiment nommé *TOR-autophagy spatial coupling compartment* (TASCC) permettrait l'accumulation de lysosomes à la surface desquels mTOR serait recruté. Ainsi, l'augmentation d'autophagie dans les cellules sénescents couplée à une accumulation focale de lysosomes causerait une forte concentration locale d'acides aminés qui mènerait au recrutement de mTOR via une signalisation par les GTPases Rags (190). Le TASCC serait ainsi important pour soutenir le rythme élevé de synthèse protéique requis par le phénotype sécrétoire pro-inflammatoire des cellules sénescents (190) dont nous discuterons brièvement ci-dessous et dans l'article 1 de cette thèse.

1.4.5. Le sécrétome des cellules sénescences (SASP)

Parmi les multiples changements que subissent les cellules sénescences (voir **Figure 1.4**), leur phénotype sécrétoire est probablement le plus étudié. L'article 1 de cette thèse (191) est d'ailleurs une revue de littérature sur l'importance du SASP, ses principaux effecteurs, ainsi que ses conséquences. Ainsi, nous ne nous attarderons pas longtemps sur ce sujet ici. Brièvement, les cellules sénescences vont sécréter une myriade de facteurs extracellulaires leur permettant d'interagir avec leur environnement et de le façonner. Parmi les régulateurs clés de ce programme transcriptionnel de SASP se trouvent notamment les facteurs de transcription NF- κ B, C/EBP β et p53. En ce qui a trait à P53, malgré qu'il promeuve la régulation à la hausse de plusieurs facteurs sécrétés, ce dernier est souvent considéré comme un régulateur négatif du SASP du fait qu'il réprime plusieurs facteurs pro-tumorigéniques du SASP (191-193). Les TFs susmentionnés vont ainsi réguler l'expression de plusieurs cytokines (191) dont des chimiokines (e.g. CXCL1/2/3/5/6/8 (194)) et interleukines (e.g. IL-1 α/β , IL-6 (195-197)), des métalloprotéinases matricielles (e.g. MMP-1/3/9/12 (198)), des inhibiteurs de protéases à sérine (e.g. PAI-1, SERPINB2/4 (199-201)), des lipides (202), etc. Certains de ces facteurs sécrétés agissent de manière autocrine et/ou paracrine afin de renforcer la sénescence (194,195,199,203) et de permettre le recrutement du système immunitaire pour éliminer ces cellules défectueuses (101,204). De plus, une exposition transitoire au SASP des cellules sénescences promeut l'induction d'une plasticité cellulaire favorisant une meilleure régénération (205). Ceci représente l'aspect suppresseur de tumeur bénéfique attribué au SASP observable chez les jeunes individus. Cependant, l'étude du SASP a également permis de lever le voile sur un côté obscur de ce phénotype ayant lieu lors du vieillissement et dans le cancer. De ce fait, il est aujourd'hui compris que l'inflammation chronique due au SASP des cellules sénescences qui s'accumulent lors du vieillissement devient plutôt délétère (134,205). Ceci est également vrai dans un contexte de cancer. En effet, en plus de cibler les cellules cancéreuses, les traitements chimio/radio-thérapeutiques ciblent aussi de manière non-spécifique des cellules normales dans le microenvironnement tumoral (e.g. cellules du stroma telles que les fibroblastes) ce qui induit leur sénescence. Le SASP de ces cellules va alors créer une inflammation chronique locale et systémique responsable de plusieurs effets délétères associées à la thérapie, notamment l'immunosuppression, les rechutes de cancer et l'asthénie (103). Plus d'informations sur les aspects moléculaires des éléments susmentionnés seront d'ailleurs abordés dans l'article 1 de la thèse.

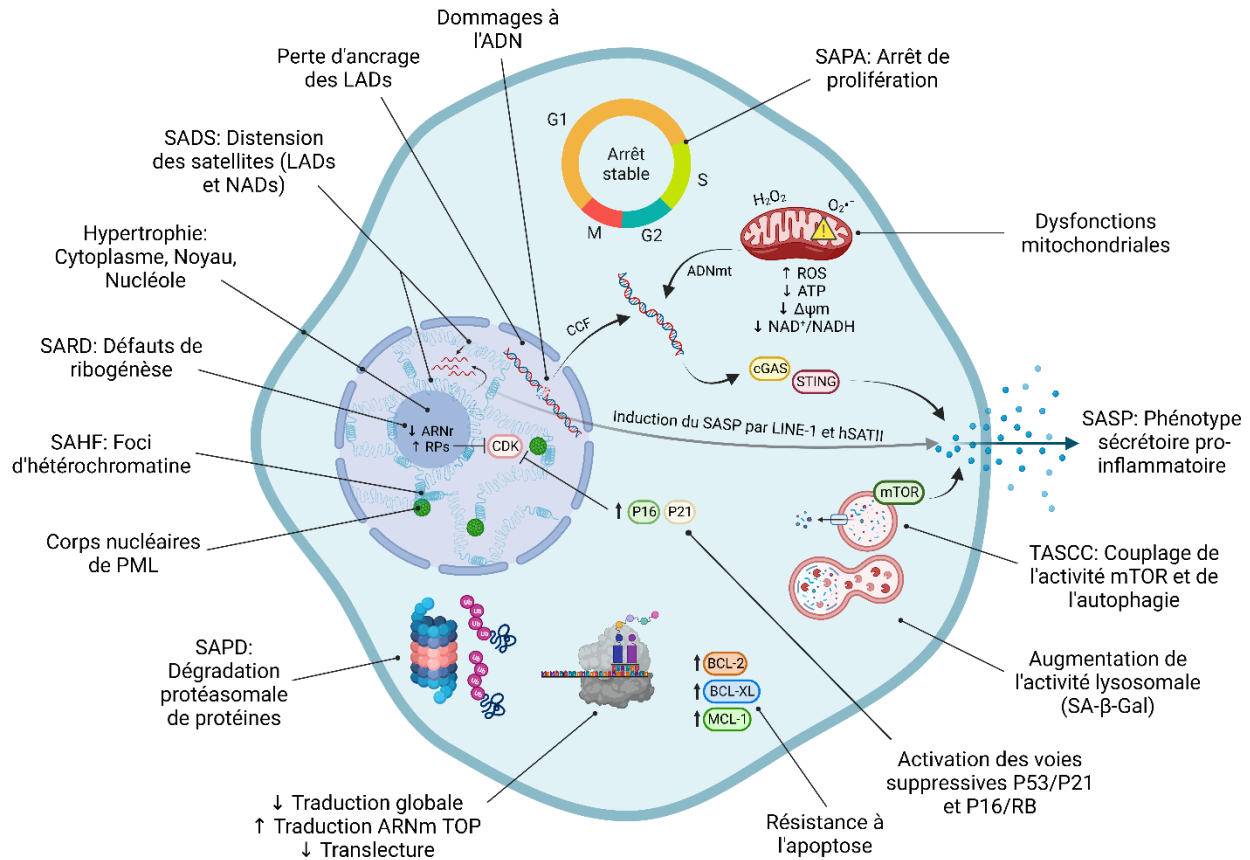


Figure 1.4. Caractéristiques associées aux cellules sénescences.

L'identification de cellules sénescences doit se faire via l'utilisation de différents marqueurs, puisqu'il n'existe pas à ce jour de marqueur universel spécifique permettant à lui seul d'identifier ces cellules. Le seul marqueur présent dans tous les types de sénescence est l'arrêt stable du cycle cellulaire, mais ce dernier peut également être associé à d'autres phénotypes tels que la quiescence, ce qui n'en fait pas un marqueur spécifique. Aussi, en ce qui a trait aux cellules normales, celles-ci ont une activation des deux voies principales de suppression tumorale, soit P53/P21 et P16/RB, ce qui n'est pas nécessairement vrai dans la sénescence des cellules cancéreuses qui ont souvent une inactivation d'une ou des deux voies. De plus, les cellules sénescences vont généralement être caractérisées par une hypertrophie générale : cytoplasmique, nucléaire et nucléolaire. Parmi les autres caractéristiques associées à ces cellules, il y a notamment leur résistance accrue à l'apoptose et la présence d'un phénotype sécrétoire pro-inflammatoire (SASP), lui-même nourrit par différents autres phénomènes tels que les dommages à l'ADN, la distension des satellites présents dans les LADs et NADs, l'activité autophagique couplée à mTOR et les dysfonctions mitochondriales. Ces dernières se caractérisent par une augmentation de la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et une diminution de la production d'ATP, une diminution du potentiel mitochondrial et une diminution du ratio $NAD^+/NADH$. Ces cellules voient également leur activité lysosomale être augmentée, ce qui permet leur identification par des essais β -galactosidase mesurant l'activité de cette enzyme qui est augmentée dans la sénescence. Enfin, ces cellules ont aussi une augmentation du nombre de corps de PML et montrent la présence de foci d'hétérochromatine facilitée par la perte d'ancrage des LADs, elle-même médiée par la dégradation de lamine B1. Finalement, ces cellules ont également des défauts de biogénèse des ribosomes caractérisés par une diminution de la synthèse et maturation des ARNr et une accumulation des protéines ribosomiques. Le tout est couplé à une diminution de la traduction globale et de la translecture ainsi qu'à une augmentation de la traduction des ARNm TOP et une dégradation protéasomale active. SAPA, Senescence-Associated Proliferation Arrest; $\Delta\psi_m$, Potentiel mitochondrial; ADNmt, ADN mitochondrial; CCF, Cytoplasmic Chromatin Fragments; SASP, Senescence-Associated Secretory Phenotype; TASCC, TOR-Autophagy Spatial Coupling Compartment; SAPD, Senescence-Associated Protein Degradation; SAHF, Senescence-Associated Heterochromatin Foci; SARD, Senescence-Associated Ribogenesis Defects; SADS, Senescence-

Associated Distension of Satellites; LAD, Lamina-Associated Domains; NAD, Nucleolus-Associated Domains; ARNr, ARN ribosomique; RPs, Protéines ribosomiques. Figure réalisée avec BioRender.

Enfin, il est intéressant de mentionner que parmi les facteurs sécrétés par les cellules sénescences, il y a également des vésicules extracellulaires dont des exosomes (206,207). Il s'agit de cargos cellulaires d'environ 50 à 150nm contenant de multiples éléments dont des protéines, des lipides, de l'ADN et de l'ARN, incluant de nombreux microARN. À ce jour, le rôle de ces cargos demeure encore mal compris mais de plus en plus d'évidences suggèrent qu'ils joueraient un rôle important dans la sénescence, l'inflammation et le cancer (208-210). Il s'agit d'un domaine de recherche très prometteur et en pleine expansion.

1.4.6. Régulation de la protéostasie dans la sénescence

Tel que mentionné précédemment, durant la sénescence on observe un couplage de deux phénomènes régulés de manière antagoniste, soit la synthèse protéique (anabolisme) et la dégradation autophagique (catabolisme). Ceci permet entre autres de répondre à la grande demande en synthèse protéique requise pour le SASP (190,211). En contrepartie, les cellules étant en arrêt stable de prolifération, leurs besoins en synthèse protéique sont amoindris. Ainsi, on observe une diminution globale de la traduction dans la sénescence (212,213). Celle-ci est cependant couplée à une augmentation de la traduction mTORC1-dépendante (213) de certains ARNm spécifiques nommés TOP (5'Terminal OligoPyrimidine) ayant un motif oligopyrimidine dans leur 5'UTR (214). Ces ARNm TOP encodent des protéines prioritaires dans des situations de stress (tel que la sénescence), *e.g.* les protéines ribosomiques et les facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction (215). Il est à noter cependant que les facteurs du SASP ne possèdent généralement pas de motif 5'TOP (216). Ainsi, il est à ce jour mal compris comment la traduction des ARNm codant pour les facteurs du SASP est augmentée malgré la diminution globale de traduction. Il pourrait par exemple s'agir d'une traduction sélective via d'autres éléments tels que la présence de cadres de lecture en amont (*uORF*) ou d'une régulation via des changements au niveau de la disponibilité de certains ARNs de transfert (ARNt). De manière intéressante, notre laboratoire a aussi montré que la sénescence était accompagnée d'une diminution de la translecture (*translational readthrough*), menant à une augmentation de la fidélité de traduction (217). Ceci a pour conséquence de diminuer la potentielle génération de variants de protéines ayant des fonctions pro-tumorigéniques, contribuant ainsi au caractère suppresseur de tumeur de la sénescence.

Enfin, notre laboratoire a également rapporté que la sénescence répliquative et celle induite par RAS étaient accompagnées d'un programme de dégradation protéique médié par le protéasome nommé SAPD (*Senescence-Associated Protein Degradation*) (108). Ainsi, selon ce modèle, une hyperactivation des kinases ERK mènerait à une hyper-phosphorylation de leurs cibles, les marquant pour une dégradation subséquente (108). Conséquemment, les cellules n'auraient plus les niveaux requis de ces effecteurs afin de soutenir une prolifération normale; les cellules entreraient ainsi en sénescence. La dégradation de ces effecteurs serait potentiellement reliée à plusieurs phénotypes associés aux cellules sénescents, notamment l'arrêt du cycle cellulaire (*e.g.* MYC, JUN, etc.), les dysfonctions mitochondriales (*e.g.* STAT3, ATP5A, HSP70, etc.), les voies de DDR (*e.g.* CCDC6, TOP2, etc.) et les défauts de biogénèse des ribosomes dont nous discuterons sous peu (*e.g.* NCL, DDX21, RSL1D1, etc.) (108,218). De manière intéressante, le fait de mimer la diminution des niveaux de ces cibles via des shARN suffit pour récapituler le programme de sénescence tant dans des cellules primaires que des cellules transformées (108).

1.4.7. Défauts de biogénèse des ribosomes dans la sénescence (SARD)

Un autre élément distinctif des cellules sénescents est le fait qu'elles arborent un seul nucléole hypertrophique par opposition à plusieurs plus petits (219). Le nucléole étant le siège cellulaire de la biogénèse des ribosomes (ribogénèse), cela suggère une altération de ce processus. En effet, ce sous-compartiment nucléaire sans membrane est le lieu où se produit la transcription et la maturation des ARN ribosomiques (ARNr) *i.e.* les 5.8S, 18S et 28S. C'est également dans ce compartiment que se déroule la première partie de l'assemblage des deux sous-unités pré-40S et pré-60S des ribosomes. De plus, tel que susmentionné, notre laboratoire a montré que la sénescence était accompagnée d'une dégradation de plusieurs protéines impliquées dans la ribogénèse telles que DDX21, DDX51, NOC2L, NOLC1, NOP56, Nucleolin et RSL1D1, et que leur déplétion par shARN phénocopiait leur dégradation en induisant la sénescence (108). Ainsi, suivant cette logique notre laboratoire a subséquemment identifié que la sénescence était caractérisée par des défauts de biogénèse des ribosomes et qu'alternativement il était possible d'induire la sénescence même dans des cellules cancéreuses en perturbant la ribogénèse (219). De plus, des travaux actuels au sein de notre laboratoire semblent suggérer que de tels défauts de ribogénèse seraient importants pour la pérennisation du phénotype de sénescence et que l'absence de ces défauts pourrait expliquer l'instabilité du phénotype observé par exemple dans certains modèles de sénescence induite par

thérapie (Rowell *et al.* en révision à *Comm. Biol.*). L'article 3 de cette thèse portant sur l'établissement d'un modèle murin transgénique de sénescence induite par des défauts de ribogénèse, nous nous attarderons dans la prochaine section à expliquer tout d'abord le processus normal de ribogénèse. Il sera ainsi plus simple de comprendre l'étendue et l'implication des défauts de ribogénèse observés dans la sénescence.

1.4.7.1. La biogénèse des ribosomes en conditions normales

La ribogénèse étant responsable de la production des ribosomes nécessaires à la synthèse protéique, cela en fait un des processus les plus importants pour l'homéostasie cellulaire. De ce fait, cela en fait également le processus le plus énergivore dans la cellule. Ainsi, les ribosomes sont constitués de deux sous-unités ribonucléoprotéiques, soit la 40S constituée de l'ARNr 18S associé à ± 33 protéines ribosomiques et la 60S constituée des ARNr 5.8S, 28S et 5S associés à ± 49 protéines ribosomiques (220). Dans le cas des ARNr 18S, 5.8S et 28S, ceux-ci sont générés à partir d'un précurseur nommé 47S transcrit par l'ARN polymérase I. En effet, ce dernier subira plusieurs étapes de maturation impliquant plus de 200 facteurs différents permettant ultimement des clivages multiples et l'ajout de modifications post-traductionnelles telles que la 2'-O-méthylation et pseudouridylation (221). Dans le cas de l'ARNr 5S, celui-ci sera plutôt transcrit par l'ARN polymérase III, elle-même responsable de la transcription des ARNt. Enfin les ARNm codant pour les protéines ribosomiques (RPs) seront quant à eux transcrits via l'action de l'ARN polymérase II, puis traduits par des ribosomes préexistants, avant d'être incorporés dans des nouveaux ribosomes en formation. Cette incorporation ainsi que les modifications post-traductionnelles se produisent de manière co-transcriptionnelle avec la synthèse de l'ARNr précurseur 47S, générant ainsi la pré-particule 90S. Cet assemblage co-transcriptionnel serait d'ailleurs essentiel au repliement complexe des ARNr matures et au positionnement adéquat des RPs (222,223). La pré-particule 90S terminera ainsi sa maturation dans le noyau afin de générer les sous-unités matures 40S et 60S. Celles-ci seront alors exportées vers le cytoplasme selon une dynamique dépendante de la relâche des différents facteurs d'assemblage et d'export. On constate ainsi que la production de ribosomes, en plus d'être le processus le plus énergivore dans la cellule, requiert une action concertée de centaines de facteurs de ribogénèse en plus de nécessiter une fine coordination de l'action des trois ARN polymérases.

Le précurseur 47S est généré à partir de l'ADN ribosomique (ADNr) dont on retrouve environ 200 à 600 copies dispersées en tandem sur les 5 paires de chromosomes acrocentriques (224). De plus, chaque copie représentant environ 43kb est séparée en deux, soit une partie codante d'environ 13kb et une région intergénique d'environ 30kb. La partie codante est elle-même constituée des espaceurs transcrits externes (ETS) en 5' et en 3', en plus des espaceurs transcrits internes (ITS) 1 et 2 situés entre les séquences 18S-5.8S et 5.8S-28S respectivement. Lors de la maturation co-transcriptionnelle du 47S, les espaceurs sont rapidement dégradés à mesure qu'ils sont clivés, afin de ne laisser que les ARNr matures liés aux RPs et aux facteurs d'assemblage. Les régions chromosomiques contenant ces répétitions sont d'ailleurs nommées régions organisatrices du nucléole (NOR), car c'est autour de ces régions que se reforment les nucléoles à la fin de chaque division cellulaire (225). En effet, la liaison de plusieurs facteurs à l'ADNr sous forme d'euchromatine permet une séparation de phase menant à la reformation des nucléoles. Une fois les nucléoles formés, les NORs actifs feront des protrusions à l'intérieur du nucléole et y seront transcrits. La multitude de facteurs de ribogénèse qui s'associeront à différentes étapes de synthèse et maturation des transcrits 47S permettront de créer d'autres séparations de phase à l'intérieur même de chaque nucléole, donnant ainsi lieu à des centres fibrillaires (FC) autour desquels se forment les composantes fibrillaires denses (DFC) et autour desquelles se forme la composante granulaire (GC) (226,227). Ainsi, c'est à l'interface entre les FC et les DFC que se localiseront les copies d'ADNr transcriptionnellement actives liées par toute la machinerie associée à l'ARN polymérase I. Les transcrits de 47S entreront alors dans les DFC où ils subiront plusieurs étapes de maturation susmentionnées. Enfin, une dernière série d'étapes de maturation ainsi que l'assemblage des pré-particules ribosomiques (pré-40S et pré-60S) prendra place dans le GC en périphérie du nucléole (228). Ainsi, de leur transcription/maturation jusqu'à leur incorporation dans des pré-particules ribosomiques, les ARNr migrent du centre du nucléole vers la périphérie de ce dernier (229).

Les frontières entre chaque sous-compartiment nucléolaire sont quant à elles définies par les propriétés physicochimiques intrinsèques aux protéines composant les FC, DFC et le GC (226). En ce qui concerne les NORs inactifs, en association avec d'autres régions chromosomiques comprenant des centromères, ceux-ci demeurent sous forme d'hétérochromatine, facilitant également la séparation de phase du nucléole avec le nucléoplasme via la création de domaines associés aux nucléoles (NADs) dont nous discuterons un peu plus tard (230,231). Les NADs sont

ainsi formés d'hétérochromatine périnucléolaire (PNH) et d'hétérochromatine péricentromérique (PCH) (231). Ainsi, il est possible de concevoir qu'une euchromatinisation des NADs telle qu'observée dans la sénescence réplivative (nous en discuterons un peu plus loin) aurait probablement comme conséquence une diminution de la tension de surface à l'interface entre le nucléole et le nucléoplasme (227,230). Ceci pourrait potentiellement résulter en une coalescence des nucléoles pour n'en former qu'un seul tel qu'observé dans la sénescence. Nous reviendrons sur cette hypothèse dans la discussion de cette thèse.

1.4.7.2. Le nucléole : un senseur de stress cellulaire impliqué dans la sénescence

Considérant le nombre de facteurs impliqués dans le processus de ribogénèse et la fine coordination requise par les trois ARN polymérases, cela en fait un processus très sensible aux moindres perturbations. Conséquemment, le nucléole agit comme senseur de stress cellulaire et plusieurs facteurs de ribogénèse ont été liés à l'activation du suppresseur de tumeur P53. De ce fait, en conditions normales, le suppresseur de tumeur P14/ARF est peu exprimé et séquestré au nucléole par le facteur de ribogénèse Nucléophosmine (NPM) (232), une chaperonne impliquée dans les étapes tardives de maturation et assemblage des sous-unités 40S et 60S. Cependant, en conditions de stress, NPM délocalise au nucléoplasme et se met à inhiber HDM2, menant à la stabilisation de P53 (233). En parallèle, ARF est libéré de sa séquestration, s'accumule aussi dû à la dérégulation du locus INK4 et se met également à séquestrer HDM2, menant encore une fois à l'activation de P53 (137). De plus, ARF réprime directement la transcription des ARNr en empêchant la phosphorylation activatrice de UBF, le facteur de transcription pionnier initiant la transcription de l'ADNr (234) et en empêchant l'import nucléolaire de TTF-I (235), le facteur de terminaison de la transcription de l'ADNr. Enfin, il a également été montré qu'en de telles conditions de stress, HDM2 est également inhibé par la liaison à des protéines ribosomiques hors des ribosomes, notamment le complexe RPL5-RPL11 (236-239) et RPL23 (239,240), résultant en la stabilisation de P53. Ainsi, l'inhibition de la ribogénèse permet d'agir comme point de contrôle en régulant l'arrêt du cycle cellulaire par un processus nommé *impaired ribosome biogenesis checkpoint* (IRBC). Cette stratégie est d'ailleurs étudiée avec des inhibiteurs de l'ARN polymérase I actuellement en essais cliniques (*e.g.* CX-5461 et Actinomycine D) pour traiter différents cancers. Cependant, l'inhibition du processus complètement en amont semble être associé à une certaine toxicité hématologique tel qu'exemplifié par quelques cas de neutropénie et thrombocytopénie

(241). Ainsi, une inhibition du processus plus en aval pourrait peut-être diminuer les effets indésirables d'une telle thérapie. C'est d'ailleurs une des questions qui sera abordée en discussion de l'article 3 de cette thèse, où nous évaluerons la faisabilité d'inhiber *in vivo* la maturation des ARNr via l'inhibition inductible du facteur de ribogénèse RSL1D1 impliqué dans le recrutement nucléolaire de facteurs de maturation tels que nucléostémine (242).

Ainsi, puisque la sénescence cellulaire est une réponse à différents types de stress (*e.g.* oxydant, oncogénique, dommages à l'ADN, etc.) et que les inhibiteurs de ribogénèse semblent induire la sénescence (243,244), il va de soi que l'établissement de ce phénotype de suppression tumorale implique des altérations au niveau de la ribogénèse. De plus, tel que mentionné précédemment, notre laboratoire a montré que la sénescence est accompagnée d'une hypertrophie nucléolaire (219) et d'une dégradation de plusieurs facteurs impliqués dans la transcription (*e.g.* NOC2L, NOLC1 et Nucléoline) et/ou la maturation (*e.g.* DDX21, DDX51, NOP56 et RSL1D1) des ARNr (108). Aussi, la simple déplétion par shARN de ces effecteurs récapitule le programme de sénescence (108,219). De ce fait, notre laboratoire a montré dans une publication subséquente que les cellules sénescents ont une diminution de la transcription et de la maturation des ARNr et que cela contribue à l'arrêt du cycle cellulaire via l'activation de la voie RB (219). Ceci serait dû au fait que l'ARN polymérase II semble continuer à produire les ARNm des protéines ribosomiques sans production concomitante d'ARNr par l'ARN polymérase I. Ce découplage entre les deux polymérases mène donc à l'accumulation hors du ribosome de protéines ribosomiques ayant de nouvelles fonctions, notamment à titre d'inhibiteurs de CDKs. Ainsi, dans ce contexte, la protéine de la petite sous-unité du ribosome RPS14 lie directement CDK4 seule ou en complexe avec cycline D1 et inhibe le complexe, favorisant l'activation de RB. De plus, sa simple surexpression suffit à induire la sénescence (219). Notre laboratoire a également montré des résultats similaires d'inhibition du complexe et d'induction de sénescence par une autre protéine ribosomique, soit RPL22 (245). Ces résultats ouvrent la porte à un nouveau pan de la biologie, puisqu'ils permettent d'entrevoir un nouveau design rationnel de thérapies anticancer dans des contextes de tumeurs dont les principaux suppresseurs de tumeur tels que P53 et P16 sont inactivés (246), *e.g.* dans le cancer du pancréas.

Il est toutefois important de mentionner que la cause des défauts de ribogénèse observés dans la sénescence n'a cependant pas encore été identifiée. Il en va d'ailleurs de même pour le

phénotype d'hypertrophie nucléolaire. Ainsi, la discussion à propos de l'article 2 de cette thèse amènera des pistes de réflexion afin d'essayer de répondre à ces inconnus. Nous y verrons notamment comment une augmentation de l'accessibilité à la chromatine et l'activation d'un réseau de facteurs de transcription nouvellement identifié pourraient potentiellement être à l'origine de ces observations.

1.4.8. Changements au niveau de la chromatine dans la sénescence

À cet effet, une des caractéristiques les plus notables des cellules sénescents est leur réorganisation structurale majeure de la chromatine menant entre autres à une reprogrammation transcriptionnelle responsable de leur sécrétome pro-inflammatoire. L'article 2 de cette thèse portera d'ailleurs sur l'importance de cette réorganisation structurale de la chromatine comme mécanisme d'intégration des stress oncogéniques permettant l'engagement vers la sénescence. Conséquemment, afin de pouvoir mettre en perspective et comprendre l'implication de ces changements au niveau de la chromatine ainsi que leurs impacts sur les programmes transcriptionnels dans les cellules sénescents, il faut tout d'abord commencer par revisiter la régulation de la structure de la chromatine et ses impacts sur la transcription en conditions normales. En effet, ce domaine de recherche a été grandement chamboulé par de nombreuses découvertes effectuées dans les 10 dernières années grâce à la venue de la technologie Hi-C permettant de coupler la technique de capture de conformation de l'ADN et la technologie de séquençage nouvelle-génération.

1.4.8.1. Organisation structurale de la chromatine

Le génome humain est constitué d'environ 6 milliards de paires de bases réparties sur 23 paires de chromosomes, soit 22 paires d'autosomes et une paire de chromosomes sexuels. Mis bout à bout, cela représente une longueur d'environ 2 mètres d'ADN contenus dans un noyau d'environ 10 à 20 micromètres de diamètre (247). Afin de réussir cet exploit d'empaquetage, chaque chromosome voit son ADN enroulé autour d'octamères d'histones, formant des centaines de milliers d'unités appelées nucléosomes constitués de 146 paires de bases d'ADN et 2 copies d'histones H2A, H2B, H3 et H4. Les histones étant chargées positivement, celles-ci s'associent très étroitement à l'ADN qui est quant à lui chargé négativement dû aux groupements phosphates dans son squelette (248-252). La formation de ces nucléosomes permet ainsi de générer la fibre de 10nm. Chaque nucléosome est séparé par une courte séquence d'ADN de liaison (*linker DNA*)

d'une longueur de 20 à 90 nucléotides. À ce nucléosome s'ajoute une molécule d'histone H1 (également appelée histone de liaison) qui va enrouler \pm 20 paires de bases supplémentaires provenant de l'ADN de liaison, afin de former une unité nommée chromatosome (ou nucléofilament). Le rôle de l'histone H1 est donc de maintenir en place l'ADN autour du nucléosome et d'aider à la formation d'une fibre encore plus compacte d'ADN via une torsion des chromatosomes en forme de solénoïde afin de former la fibre de 30 nanomètres (252). Cette fibre peut ensuite être compactée davantage en la repliant sur elle-même pour former une fibre de 300nm, puis de 700nm. On pourra finalement observer la forme de compaction ultime en mitose soit la formation d'un chromosome mitotique d'environ 1400nm.

Évidemment, lors de l'interphase, les chromosomes ne se retrouveront pas sous leurs formes les plus condensées, car cela ne serait pas compatible avec de la transcription. En effet, ils vont le plus souvent se retrouver dans un état entre la fibre de 10nm et 30nm. Ainsi, afin de minimiser l'espace occupé par chaque chromosome et afin d'optimiser le processus de transcription, ces derniers vont former différents niveaux de structures intramoléculaires plus ou moins condensées et aller localiser à des endroits précis dans le noyau, selon le niveau requis d'expression des gènes dans ces régions. En effet, malgré l'apparence de désordre dans la structure des chromosomes en interphase qui sont plus ou moins entremêlés tels des spaghettis, ceux-ci vont être compartimentalisés et occuper des régions bien définies du noyau où chaque chromosome va former des structures sphéroïdes d'environ $2\mu\text{m}$ de diamètre nommées territoires chromosomiques (253-255). Ces territoires chromosomiques vont eux même être organisés en domaines chromosomiques modulables nommés domaines topologiquement associés (TADs). Ceux-ci peuvent se retrouver sous forme active d'euchromatine ou sous forme réprimée d'hétérochromatine (facultative ou constitutive) généralement associée soit à la lamina nucléaire (domaines associés à la lamina; LADs) ou aux nucléoles (domaines associés aux nucléoles; NADs). Ainsi, l'emplacement nucléaire de ces TADs dictera le niveau de transcription ayant lieu dans ces derniers. Tel que son nom l'indique, un TAD se définit comme étant une région génomique interagissant avec elle-même plus fréquemment qu'avec des régions en dehors du TAD. Selon différentes analyses, il s'agit généralement de séquences variant d'une longueur de 100k à 5M de paires de bases (256). Une analogie simple serait de comparer un chromosome à un collier de perles, où chaque perle représenterait un TAD. Ces TADs sont en fait d'immenses boucles d'ADN formées elles-mêmes de plusieurs petites boucles d'ADN nommées des *insulated neighborhoods*

(ou sub-TADs) (257). Tel qu'illustré en **Figure 1.5**, ce sont en fait ces petites boucles d'ADN qui vont façonner la structure locale de la chromatine. Il a d'ailleurs été montré que le fait de défaire ces structures mène à une importante dérégulation de l'expression des gènes contenus dans ces boucles (258,259). Cela peut donc mener à une dérégulation d'hétérochromatine facultative lorsque ces boucles agissent comme isolateurs (*insulators*). En effet, les interactions chromatiniennes à l'intérieur d'un *insulated neighborhood* et même entre des *insulated neighborhoods* avoisinants est à la base de la régulation transcriptionnelle, puisque la formation de ces boucles d'ADN permet de rapprocher le promoteur de ses éléments distaux de régulation tels que des amplificateurs (*enhancers*) qui seront discutés un peu plus loin. Les TADs seraient formés par un mécanisme d'extrusion où des facteurs d'extrusion de boucle (LEFs) tels que des cohésines serviraient essentiellement à «tirer / transloquer» une région de chromatine pour agrandir de plus en plus la boucle jusqu'à l'encontre d'éléments de délimitation (*boundary elements*) tels que les protéines CTCF (260,261) aux frontières entre des TADs (*TAD boundaries*). En effet, une des caractéristiques principales des TADs et des *insulated neighborhoods* qui les composent est le fait d'être délimités par des régions liées par des cohésines et des protéines CTCF. De plus, CTCF est requis pour la formation d'interactions chromatiniennes médiées par la liaison de l'ARN pol II. Ainsi, la déplétion de CTCF n'empêche pas la liaison de l'ARN pol II à la chromatine. Toutefois, cela diminue de manière très importante la formation de boucles médiées par la liaison de l'ARN pol II à la chromatine (262). Le facteur de transcription CTCF est donc d'une importance capitale pour l'organisation structurale de la chromatine et pour la régulation de la transcription, puisqu'il définit lui-même les limites des TADs et donc les régions qui seront sous forme d'euchromatine ou d'hétérochromatine (LADs et NADs).

1.4.8.1. La régulation de la transcription : de la structure à la fonction

Ainsi, c'est à l'intérieur des *insulated neighborhoods* dans les TADs actifs que se produit le processus de transcription. Cependant, la compaction de l'ADN et la présence de nucléosomes agissent comme une barrière pour l'accès à cet ADN par les ARN polymérase. Ainsi, il est important de défaire ces fibres et de déplacer les nucléosomes afin de permettre à la machinerie d'avoir accès. Les détails concernant ces mécanismes de régulation de l'accessibilité à la chromatine seront d'ailleurs détaillés prochainement. Pour les besoins de la cause, nous nous attarderons ici uniquement à la régulation de la transcription par l'ARN polymérase II (ARN pol

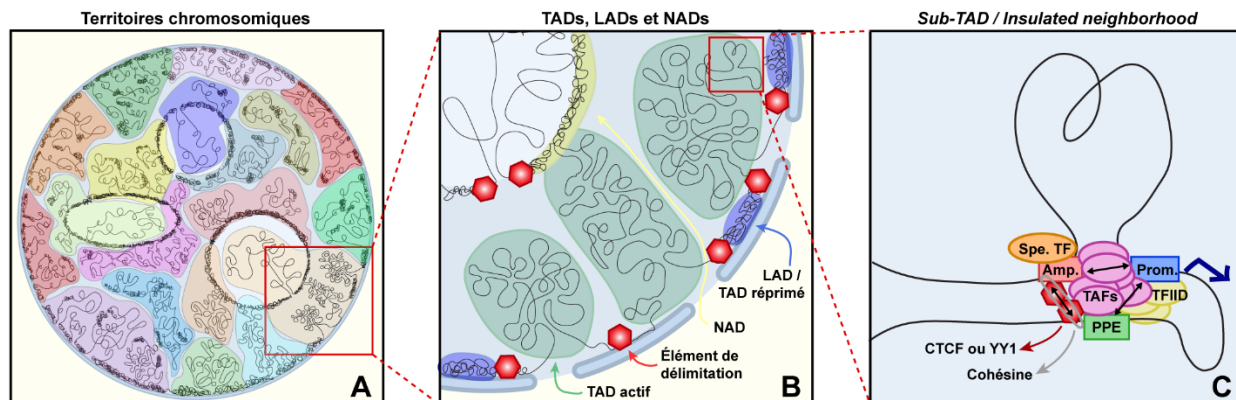


Figure 1.5. Organisation fonctionnelle de la chromatine.

Les chromosomes sont compartimentalisés en régions bien définies dans le noyau. Ces régions nommées territoires chromosomiques sont elles-mêmes organisées en domaines topologiquement associés (TADs) pouvant se trouver sous forme active dans le nucléoplasme ou sous forme réprimée associée à la lamina nucléaire (LADs) ou aux nucléoles (NADs). Les TADs actifs sont associés à une transcription active, alors que les TADs réprimés se retrouvent sous forme d'hétérochromatine constitutive (*e.g.* régions satellites, centromériques, etc.) ou facultative pouvant alterner entre un état permissif et restrictif à la transcription. Les frontières des TADs sont délimitées les unes des autres via des éléments de délimitation tels que les protéines CTCF. Les TADs actifs sont eux-mêmes constitués de plusieurs petites boucles nommées sub-TADs ou *insulated neighborhoods* et c'est à l'intérieur de celles-ci que se produit le processus de transcription. Ainsi, ce sont les interactions chromatiniennes dans ces *insulated neighborhoods* de même que celles entre des *insulated neighborhoods* proximaux qui est à la base de la régulation transcriptionnelle. Ces interactions vont alors permettre de rapprocher le promoteur d'un gène cible de ses éléments de régulation tels que les amplificateurs. La transcription de ce gène sera déterminée par le niveau de stabilisation du complexe de pré-initiation de la transcription qui sera lui-même dépendant de plusieurs interactions identifiées par les flèches double-sens sur le schéma. TAD, Topologically Associating Domain; LAD, Lamina-Associated Domains; NAD, Nucleolus-Associated Domains; Spe. TF, Facteur de transcription spécifique; TAFs, TBP-Associated Factors; TFIID, Transcription factor II D; Amp., Amplificateur; Prom., Promoteur; PPE, Promoter Proximal Elements.

II) et plus particulièrement à l'initiation du processus de transcription.

Tout d'abord, la transcription au niveau du promoteur d'un gène peut être contrôlée via deux principales classes d'éléments de régulation : 1) des amplificateurs (*enhancers*) qui lient des facteurs de transcription spécifiques et agissent sur de plus ou moins grandes distances en cis et 2) des inactivateurs (*silencers*) qui répriment l'expression. De plus, afin d'empêcher l'action indésirée d'amplificateurs ou d'inactivateurs de certains gènes sur d'autres gènes avoisinants, la transcription ou la répression génique peut être confinée via des régions isolatrices (*insulators*) dont le plus important type chez les mammifères est l'isolateur CTCF (263,264). Ainsi, ces isolateurs peuvent agir comme bloqueurs d'amplificateurs lorsque situés entre un amplificateur et le promoteur qu'il régule, ou comme barrières (*barriers*) lorsque situées entre un inactivateur et le promoteur régulé. En ce qui concerne les amplificateurs, ceux-ci contrôlent l'expression génique en formant une boucle d'ADN (*insulated neighborhoods*) afin de se rapprocher du promoteur de leur gène cible

tel que mentionné précédemment. Plusieurs amplificateurs peuvent d'ailleurs agir de façon concertée sur un même promoteur afin de réguler une cible commune. Il existe également des super-amplificateurs (*super-enhancers*; *SEs*) permettant de contrôler l'expression d'une famille de gènes. Il est d'ailleurs suggéré que ceux-ci auraient évolué autour des gènes favorisant l'établissement d'une identité cellulaire afin de rendre la transcription de ces gènes sensible à différents stimuli extrinsèques (265,266). À titre d'exemples, dans le contexte de cellules souches embryonnaires, il a été montré que ces SEs se situent autour de gènes de pluripotence (265); dans le contexte de tumorigénèse, ils se situeraient plutôt autour d'oncogènes (267); puis dans le contexte de sénescence induite par l'oncogène RAS^{G12V}, ils se situeraient autour des gènes codant pour les facteurs du SASP et seraient régulés par BRD4 (268). Il faut toutefois mentionner que selon le type d'inducteur de sénescence, les gènes régulés par ces SEs varient. Ainsi, lors de la sénescence répllicative, ce ne seront pas les gènes de SASP, mais plutôt des gènes codant pour des enzymes dont les sous-produits contribuent à la sénescence qui seront régulés par ces SEs (269). Ainsi, une fois lié par des facteurs de transcription spécifiques sur différents motifs, l'amplificateur forme une boucle et se rapproche du promoteur lui-même lié par les facteurs de transcription généraux afin de stabiliser la formation du complexe de pré-initiation pour favoriser la transcription par l'ARN pol II.

En effet, en parallèle de la liaison des facteurs de transcription spécifiques sur les amplificateurs, le promoteur du gène d'intérêt est lui-même lié par un complexe de facteurs de transcription généraux. Ce complexe est lui-même composé de TBP (*TATA-Binding Protein*) qui va lier la boîte TATA en amont du promoteur, ainsi que de plusieurs autres protéines formant le sous-complexe TFIID (270,271). Plusieurs autres protéines seront ensuite recrutées et l'ensemble de ces facteurs connu sous le nom de TAFs (*TBP-Associated Factors*) formera le début du complexe de pré-initiation de la transcription. Il est à mentionner que tous ces facteurs ne sont liés entre eux que par de faibles interactions hydrogènes, ce qui est également vrai pour les liaisons entre TBP et la boîte TATA. Cela rend donc le complexe instable et on le retrouve donc dans un équilibre dynamique où il s'assemble et se désassemble. Ainsi, si l'ARN pol II arrive sur le promoteur au moment où le complexe s'y retrouve, il y aura transcription et si elle arrive au moment où le complexe est dissocié, il n'y aura pas de transcription. Ainsi, le taux de transcription à un locus donné sera déterminé en grande partie par la stabilité du complexe de pré-initiation qui sera elle-même déterminée par le nombre de points d'ancrage à l'ADN. Conséquemment, il y aura

des facteurs de transcription agissant en *trans* qui iront lier des éléments proximaux du promoteur tels que la boîte GC (liée par SP1) (272) et la boîte CCAAT également appelée *core promoter* (liée par CTF, également connu comme NF-Y) (273). Chacune de ces protéines possédant un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation interagissant avec les TAFs, ceci permettra une première étape de stabilisation du complexe de pré-initiation en l'ancrant à deux points sur l'ADN. De plus, les amplificateurs susmentionnés déjà liés par leurs facteurs de transcriptions spécifiques, se rapprochent de ce complexe de pré-initiation en formant une boucle d'ADN. Ces facteurs de transcription liés aux amplificateurs ayant également un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation capable d'interagir avec des TAFs ou des coactivateurs tels que le complexe Mediator (274), permettront ainsi d'agir comme points d'ancrage supplémentaires, stabilisant davantage le complexe de pré-initiation. Enfin, un niveau additionnel de stabilisation peut avoir lieu grâce au support des protéines YY1 (275) et CTCF (276) qui vont créer un pont entre l'amplificateur et les éléments proximaux du promoteur qu'il régule, permettant ainsi une stabilisation du complexe à l'approche de l'ARN pol II. Il est à mentionner qu'un niveau supplémentaire de stabilisation peut également avoir lieu via l'action d'ARNs non-codants issus d'une transcription dans la région de l'amplificateur (enhancers RNAs; eRNA) (277,278).

1.4.8.2. L'épigénétique au cœur de la régulation transcriptionnelle

Tel que mentionné précédemment, la régulation de la transcription par l'ARN pol II dans les TADs actifs dépend évidemment de l'accessibilité de la machinerie à ces sites. De plus, malgré le fait que l'on s'attarde ici principalement à l'ARN pol II, cet accès à la chromatine est tout aussi primordial qu'il s'agisse de l'ARN pol I transcrivant les ARNr sauf le 5S, l'ARN pol II transcrivant principalement les ARNm, ou l'ARN pol III transcrivant les ARNt, l'ARNr 5S et quelques petits ARNs nucléaires (snARN). Il y a donc deux principales façons par laquelle la chromatine peut se détendre et devenir plus accessible (euchromatine) ou à l'inverse devenir plus compacte et répressive (hétérochromatine): les modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN ou modification des histones) et le déplacement des nucléosomes, via des complexes remodeleurs de la chromatine, qui est lui-même facilité par l'apposition de marques épigénétiques sur les histones. Ainsi, une transcription fonctionnelle requiert l'action concertée de plusieurs acteurs, soit des facteurs de transcription, des coactivateurs ou corépresseurs transcriptionnels, des enzymes modifiant les histones et des complexes remodeleurs de nucléosomes.

En ce qui a trait aux modifications épigénétiques, celles-ci peuvent avoir lieu directement sur l'ADN ou sur les histones dans les nucléosomes. Brièvement, lorsqu'on parle de modification de l'ADN lui-même, on réfère généralement à la méthylation en C5 de cytosines dans les dinucléotides CpG, via l'action d'ADN méthyltransférases (DNMTs). Il est à mentionner qu'environ 50% des îlots de séquences CpG se trouvent dans les régions promotrices des gènes. De plus, la méthylation des dinucléotides CpG est associée à la répression transcriptionnelle. Il peut s'agir de méthylation de maintenance permettant de copier les marques apposées sur le brin fille lors de la réplication de l'ADN (effectuée par DNMT1), ou de méthylation *de novo* (effectuée par DNMT3a et DNMT3b) (279). En ce qui concerne les modifications épigénétiques des histones, celles-ci sont plus complexes et méritent que l'on s'attarde un peu plus dessus. Ainsi, plusieurs types de modifications post-traductionnelles sont possibles sur la queue des histones, tels que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination (mono ou poly) et bien d'autres moins communes. C'est l'ensemble des dynamiques d'apposition et de retrait de ces marques qui déterminera ultimement si un locus sera réprimé ou activé. L'apposition de ces marques est généralement performée par l'action de protéines dites *writers* (écrivaines), soit des histones acétyltransférases (HATs), des histones méthyltransférases (HMTs), des kinases ou des ubiquitine ligases, et le retrait de ces marques est performé par l'action de protéines dites *erasers* (effaces), soit des histones déacétylases (HDACs), des histones lysine déméthylases (KDMs), des phosphatases et des déubiquitinases (280). En ce qui concerne la phosphorylation, cette dernière joue plutôt un rôle de plateforme afin d'établir une cascade de signalisation cellulaire. À titre d'exemple, la phosphorylation en Ser10 de l'histone H3 par Aurora kinase B (281) sert de signal de compaction de l'ADN en début de mitose. De manière semblable, la phosphorylation en Ser139 de l'histone H2AX par les kinases PI3K-like (*e.g.* ATM, ATR, DNA-PK) permet de signaler le recrutement de la machinerie de réparation des dommages à l'ADN (282,283). L'ubiquitination quant à elle sert non seulement à la signalisation tout comme la phosphorylation, mais également à la régulation de la compaction de la chromatine, tout comme les principales marques que nous étudierons ici, soit la méthylation et l'acétylation. À titre d'exemple, la monoubiquitination en Lys13/15 de l'histone H2A joue un rôle dans la voie des dommages à l'ADN en signalisant un bris double brin (284). La monoubiquitination de la Lys119 de l'histone H2A (H2AK119Ub) est quant à elle associée à la répression génique. En effet, le complexe répresseur Polycomb PRC1 non-canonique catalyse tout d'abord la H2AK119Ub via sa sous-unité E3 ligase RING1A/B (285,286),

ce qui va promouvoir le recrutement d'un second complexe répresseur Polycomb nommé PRC2. La liaison de ce dernier à l'H2AK119Ub via ses cofacteurs JARID2 et AEBP2 (287) va lui permettre de trimétyler la Lys27 de l'histone H3 (H3K27me3) via son HMT nommée EZH2 (288). Cette marque de méthylation va à son tour permettre le recrutement d'un complexe canonique PRC1 via le chromodomaine de sa sous-unité CBX (289). Cette liaison va permettre de maintenir cette chromatine sous forme réprimée. Ces complexes Polycomb PRC1 et PRC2 sont notamment responsables de la répression des gènes homéotiques lors du développement et de la répression du locus INK4 codant pour les gènes suppresseurs de tumeurs p16 et p14. À noter, tel que mentionné précédemment, ces loci se retrouvent déréprimés lors de la sénescence cellulaire, ce qui contribue à l'arrêt stable du cycle cellulaire observé durant ce phénotype. Enfin, les modifications épigénétiques les mieux étudiées demeurent tout de même les marques de méthylation et d'acétylation. La méthylation a lieu sur les histones H3 et H4, principalement sur des lysines, quoiqu'il existe certaines arginines méthylées. Selon le résidu lysine dont il est question et selon qu'il s'agisse d'une mono-, di- ou triméthylation, cela peut mener tant à de la répression qu'à de l'activation transcriptionnelle. Ceci peut s'expliquer par le fait que contrairement à l'acétylation, la méthylation ne change pas la charge électrostatique de l'histone modifiée et donc ne change pas son interaction avec l'ADN. Ainsi, cette grande diversité de marques possibles de méthylation permet de nuancer de façon très précise l'expression génique. Le **Tableau 1.1** décrit d'ailleurs certaines de ces marques de méthylation ainsi que leur impact sur la transcription.

Tableau 1.1. Quelques marques de méthylation et d'acétylation communes.

Marque épigénétique	Impact sur la transcription	Élément génétique sur lequel cette marque agit
H3K4me1	Prêt (<i>poised</i>) pour activation	Amplificateurs
H3K4me3	Activation	Promoteurs
H3K9me3	Répression permanente	Régions pauvres en gènes (Satellites, rétrotransposons, péricentromères)
H3K27me3	Répression facultative (réversible)	Promoteurs de régions riches en gènes
H3K9Ac	Activation	Amplificateurs, Promoteurs
H3K27Ac	Activation	Amplificateurs

Enfin, en ce qui concerne l'acétylation, celle-ci a également principalement lieu sur des lysines de la queue N-terminale des histones H3 et H4, via des histones acétyltransférases (HATs).

Il existe différentes familles de HATs ayant chacune plusieurs membres, eux-mêmes faisant partie de différents complexes multiprotéiques ayant une activité acétyltransférase. Cela permet donc un ciblage plus précis de ces complexes à la chromatine selon les facteurs qui les composent. Parmi les familles de HATs les plus étudiées il y a notamment les GNAT (*Gcn5-related N-acetyltransferases*) comprenant les facteurs GCN5 et PCAF, les MYST nommés selon ses membres : MOZ, YBF2, SAS2 et TIP60, puis la famille p300/CBP également nommée selon ses membres. Nous reviendrons d'ailleurs sur certains de ces facteurs ainsi que leur implication dans la sénescence prochainement. La réaction inverse est quant à elle catalysée par des histones déacétylases (HDACs), étant séparées en quatre classes, soit la classe I comprenant HDAC1, 2, 3 et 8, la classe II comprenant HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10, la classe III comprenant les Sirtuines 1 à 7 et la classe IV ayant un seul membre, *i.e.* HDAC11. Encore une fois, nous reviendrons ultérieurement sur l'importance de certains de ces facteurs dans le programme de sénescence cellulaire. La principale différence entre l'acétylation et la méthylation est le fait que l'acétylation des lysines sur les histones mène à une neutralisation de leur charge positive. Puisque cette charge positive des histones est responsable de leur association avec l'ADN qui est lui chargé négativement de par son squelette phosphate, une neutralisation de la charge positive des histones diminue leur interaction avec l'ADN (290). Cela mène donc à un léger relâchement de l'ADN enroulé autour du nucléosome, ce qui libère tout juste assez d'espace entre l'ADN et les histones afin de permettre à des complexes remodelateurs de déplacer des nucléosomes (291), exposant ainsi les divers éléments de régulation génique tels que les promoteurs des gènes. C'est pour cette raison que l'acétylation est généralement positivement associée à l'expression génique. Encore une fois, le **Tableau 1.1** décrit l'impact fonctionnel de certaines de ces marques d'acétylation.

Ce déplacement de nucléosomes peut d'ailleurs être requis pour le recrutement d'autres complexes de remodelage qui vont agir simultanément et de façon indépendante afin d'accéder jusqu'au promoteur. Il existe cinq principales familles de complexes remodelateurs: SWI/SNF, NURD, ISWI, INO80 et SWR1, chacune composée de différents facteurs. Ces complexes remodelateurs vont généralement être recrutés au site d'intérêt via une sous-unité ayant un domaine de ciblage à des histones modifiées, *e.g.* un bromodomaine liant des histones acétylées (292). Un point commun à tous ces complexes remodelateurs est le fait qu'ils contiennent une sous-unité à activité ATPase/translocase qui est requise pour le déplacement des nucléosomes. En effet, ce domaine ATPase va généralement lier une quarantaine de paires de bases parmi les 146 enroulées

autour de l'octamère d'histones et agir comme translocase d'ADN dépendante de l'ATP (293,294). Cela va créer un effet de pompe sur l'ADN, permettant ainsi le mouvement du nucléosome le long de l'ADN afin d'exposer la région d'intérêt à être ciblée par des facteurs de transcription.

Enfin, il est important de mentionner qu'il existe également une classe de facteurs de transcription appelés les facteurs pionniers qui, tout comme leur nom l'indique, peuvent être les premiers à accéder à la chromatine, même sous sa forme condensée. Ceux-ci vont souvent être impliqués dans des processus liés à l'engagement vers un nouveau destin cellulaire; c'est d'ailleurs dans ce contexte qu'ils ont tout d'abord été identifiés (295). Nous reviendrons d'ailleurs sur ce concept dans la discussion concernant l'article 2 de cette thèse. Il existe différents mécanismes par lesquels de tels facteurs sont capables d'activer ou de réprimer la transcription. Tout d'abord, certains d'entre eux comme les facteurs Fork head box (296) et les NF-Y (297) sont non seulement capables de lier la chromatine compacte, mais également d'agir à titre de remodeleurs locaux de nucléosomes. Cela permet donc le recrutement subséquent d'autres facteurs de transcription. D'autres facteurs pionniers vont plutôt accéder à la chromatine condensée et recruter des complexes *writers* tels que des HATs ou des HMTs afin d'initier le processus de transcription. C'est par exemple le cas du facteur pionnier PU.1 qui, dans les cellules souches hématopoïétiques, va lier la chromatine et recruter des HMTs pour apposer des marques H3K4me1 sur des amplificateurs, permettant ainsi le recrutement de différents facteurs de transcription afin de médier la différenciation vers des macrophages ou des lymphocytes B (298). Les facteurs pionniers peuvent aussi agir de manière passive en pré-activant des amplificateurs. Il y a au moins deux façons dont cela est possible. Premièrement, un facteur pionnier activateur peut recruter un facteur pionnier répresseur sur un même amplificateur, menant donc à un statu quo de l'expression du gène ainsi régulé. La régulation à la baisse subséquente d'un des facteurs sera donc l'élément décisif pour l'induction ou la répression de ce gène. Ce genre de régulation est notamment observée lors de la différenciation de cellules souches vers des lignées hépatiques ou pancréatiques, via l'action de l'activateur FOXA1 et du répresseur TLE3/GRG3 (299,300). Enfin, certains facteurs pionniers vont également agir de manière passive, cette fois en pré-activant un amplificateur en s'y liant seul. Ceci va permettre une réponse transcriptionnelle rapide dès que le facteur de transcription spécifique viendra s'y lier. Ce genre de régulation est souvent observé dans des programmes transcriptionnels contrôlés de façon hormonale, notamment avec le récepteur aux œstrogènes (301,302) et le récepteur aux androgènes (302-304).

1.4.8.3. Des dérèglements de l'homéostasie chromatinienne vers la sénescence

Tel que décrit dans les sections ci-dessus, on constate que la transcription est un processus finement régulé à différents niveaux, tant dans l'ultrastructure chromatinienne (3D) qu'au niveau des *insulated neighborhoods* individuels régulant l'expression d'un ou plusieurs gènes (2D). Ainsi, le moindre dérèglement survenant dans l'ensemble de ce processus cause un stress cellulaire et est donc intimement lié à la sénescence. De ce fait, la sénescence est généralement associée à des changements majeurs au niveau de la chromatine.

La sénescence est ainsi caractérisée par une hypométhylation globale de l'ADN accompagnée d'une hyperméthylation focale autour des gènes pro-prolifératifs (305). Cette hypométhylation globale de la chromatine aurait comme conséquence ultime une hypertranscription globale. Ceci mènerait à une distension de certaines régions chromatinienne répétées (SADS; *Senescence-Associated Distension of satellites*) (306) et à la réexpression de plusieurs loci généralement maintenus sous forme d'hétérochromatine dans les LADs ou les NADs (307,308). Parmi ceux-ci, les régions péri-centromériques reconnues pour être riches en séquences satellites et rétrotransposons (305,306). La réexpression de ces loci a été montrée comme jouant un rôle très important dans la régulation du SASP des cellules sénescents. Ainsi, lors de la sénescence, le rétrotransposon LINE-1 est dé-réprimé et active une réponse interféron de type-I qui contribue à la maintenance du SASP (309). Aussi, il a récemment été montré que la diminution des niveaux de CTCF dans la sénescence (310-313) mène à la réexpression du satellite hSATII qui, à son tour, lie CTCF afin de diminuer son affinité avec la chromatine, menant ainsi à l'expression des gènes de SASP (310). De manière intéressante, il a été suggéré que le patron de méthylation des cellules cancéreuses était si similaire à celui des cellules sénescents que cela pourrait représenter un vestige du passage par l'état de sénescence lors du processus de tumorigénèse (305). Ceci serait en accord avec tous les rapports identifiant des cellules sénescents dans des lésions non-prolifératives bénignes tel que mentionné en début d'introduction.

En plus des changements de méthylation au niveau de l'ADN, un patron similaire de modifications épigénétiques est observé au niveau des histones dans divers modèles de sénescence. Parmi les différents effecteurs identifiés comme étant impliqués dans la régulation du statut de méthylation lors de la sénescence, il y a notamment SUV39H1 donc la fonction est locus-dépendant. En effet, il a été montré que les niveaux de cette HMT sont diminués dans la sénescence,

ce qui mène à une diminution globale de la marque répressive H3K9me3 dans les régions répétées tels que les satellites et conséquemment à une augmentation de la transcription de ces séquences satellites (314-316). Il est à mentionner qu'il a également été rapporté que malgré la diminution des niveaux de SUV39H1 dans la sénescence, les niveaux résiduels de cette HMT seraient requis pour une suppression tumorale efficace. En effet, l'ablation de SUV39H1 dans un modèle murin exprimant l'oncogène NRAS^{G12D} dans le compartiment hématopoïétique favoriserait la lymphomagenèse sans induire d'instabilité chromosomique (99). Ceci pourrait néanmoins être explicable par une augmentation de la transcription des régions répétées suivant l'ablation de SUV39H1 (tel que susmentionné), puisque l'expression de ces séquences répétées a été montrée comme étant un important inducteur du SASP (309,310) et que tel qu'expliqué dans la section sur le SASP en introduction, le SASP chronique est plutôt pro-tumorigénique. Un autre régulateur important du statut de méthylation des cellules sénescents est EZH2, une HMT faisant parti du complexe répresseur Polycomb PRC2 responsable de la répression du locus INK4 codant pour les suppresseurs de tumeur p16 et p14. En effet, il a été montré que EZH2 est réprimé lors de la sénescence et que sa diminution d'expression mène à une perte de marques répressives H3K27me3 au niveau du locus INK4, menant ainsi à l'accumulation de p16 (317). De plus, EZH2 est absent dans les nævi qui sont des lésions bénignes sénescents et très exprimé dans les mélanomes métastatiques. Mécanistiquement, il a été montré que la déplétion de EZH2 dans des cellules de mélanome mène à une perte de HDAC1 sur le promoteur du gène codant P21, ainsi qu'à une augmentation de sa transcription de manière indépendante de p53 (318). Ceci pourrait expliquer la répression de P21 observée dans les mélanomes malgré le fait que ceux-ci aient souvent un gène P53 intact. Enfin, plusieurs autres acteurs responsables de la diminution de la méthylation lors de la sénescence ont été identifiés, notamment les lysines déméthylases KDM4 (319) et KDM5A/B (320).

Il a également été rapporté que la sénescence est accompagnée par la dégradation autophagique de la lamine B1 et une diminution concomitante de ses niveaux à la lamina nucléaire (321). Ceci mènerait à une perte d'ancrage de l'hétérochromatine des LADs à la lamina, menant ainsi à une réorganisation spatiale de l'hétérochromatine marquée en H3K9me3 (307,322). Ceci serait à l'origine de la formation des foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHFs) observés dans plusieurs modèles de sénescence (322,323). Ces structures nucléaires se formeraient au niveau des corps de PML avec l'aide de plusieurs facteurs tels que HIRA, ASF1a, HP1, HMGA

et MacroH2A (324-326), puis seraient associées à la répression transcriptionnelle de cibles pro-prolifératives des facteur E2Fs (323).

Dans une même optique d'accessibilité accrue à la chromatine lors de la sénescence, les HATs jouent également un rôle très important. En effet, plusieurs des HATs susmentionnées ont été directement liées au programme de sénescence. Parmi celles-ci, TIP60, une HAT de la famille MYST, a été montrée comme étant essentielle pour la maintenance du phénotype de sénescence induite par RAS (327), puisque sa déplétion mène à un contournement de la sénescence. Il a également été montré pour GCN5, une HAT de la famille GNAT, que sa déplétion ou son inhibition menait à un contournement de la sénescence et permettait de rallonger l'espérance de vie chez la levure dû à l'atténuation du phénotype de sénescence (328). De plus, il existe une très vaste littérature démontrant l'importance des histones acétyltransférases GCN5, TIP60, PCAF et P300 dans la régulation directe de l'activité transcriptionnelle de P53 dans la sénescence. En effet, ces HATs seraient non seulement impliquées dans l'acétylation de P53 ce qui promeut son activation (329-333), mais elles réguleraient également l'accès de P53 à ses gènes cibles (329,331,334,335), notamment P21, un des effecteurs clés de l'arrêt de prolifération, selon le contexte cellulaire. Il est cependant important de mentionner que ce ne sont pas toutes les HATs qui médient l'établissement de la sénescence. En effet, certaines HATs telles que MOZ/KAT6A dans la famille des MYST semblent plutôt antagoniser ce phénotype de suppression tumorale (336,337). Ceci serait probablement dû à un cistrome différent par rapport à d'autres HATs. Ainsi, puisque les cibles classiques de MOZ sont plutôt des gènes pro-prolifératifs comme CDC6, EZH2, E2F2 (336) et que ceux-ci sont des inhibiteurs bien connus de la voie P16-RB, il est normal que l'inhibition de MOZ mène plutôt à la sénescence.

Une des HATs les plus étudiées dans le contexte de la sénescence est P300. En effet, il a été montré que lors de la sénescence répllicative, P300 permet la formation *de novo* de super-amplificateurs (SEs) importants pour le programme de sénescence. Ainsi, la délétion de P300 retarde l'apparition du programme de sénescence tant dans un modèle réplcatif (RS) que lors de la sénescence induite par RAS (RIS) (269). De plus, il a été montré que P300 est requis pour la formation de SEs autour d'une grande partie des sites de liaison pour le facteur de transcription AP-1 dans la RS et la RIS (338). En effet, en présence de l'histone déacétylase HDAC4, cette dernière compétitionne avec P300 pour la liaison aux sites AP-1, ce qui permet le recrutement de

complexes répresseurs à ces sites et mène à un échappement à la sénescence. Ainsi, dans différents modèles de sénescence HDAC4 est dégradé, ce qui permet une dé-répression de ces loci via l'activité de P300, favorisant ainsi la maintenance du programme de sénescence (338). On constate donc que la sénescence est généralement accompagnée d'une réorganisation massive du paysage des amplificateurs (*enhancer landscape*). Dans le cas de la sénescence induite par RAS^{G12V}, ce remodelage serait initié par le facteur de transcription AP-1 qui agirait comme facteur pionnier afin de pré-marquer le paysage d'amplificateurs (339). Ce pré-marquage permettrait ainsi une stratification des amplificateurs en différentes catégories selon les marques épigénétiques qui y seraient apposées. Il a été suggéré que cela permettrait d'établir l'ordre temporel d'activation de chacun des loci via un recrutement subséquent de facteurs de transcription spécifiques pour chaque locus. Il faut toutefois mentionner que la déplétion d'AP-1 ne permet pas un rétablissement de la prolifération des cellules sénescents, mais uniquement une ablation du phénotype sécrétoire pro-inflammatoire (339).

Enfin, le remodelage du paysage d'amplificateurs observé dans la sénescence est également une conséquence indirecte d'une restructuration plus globale de l'ultrastructure du génome affectant les TADs. En effet, tel que mentionné précédemment, la perte de lamine B1 dans la sénescence mène à la formation des SAHF's via une perte d'ancrage des LADs à la lamina nucléaire. De plus, il a été montré que la protéine HMGB2 étant impliquée dans la régulation de la frontière des TADs en liant les isolateurs, diminue dans plusieurs modèles de sénescence (313,340). Dans le cas de la sénescence réplivative, sa perte mène à une agglomération des régions de chromatine liées par CTCF, un phénomène nommé SICC; *senescence-induced CTCF clusters* (313). Dans le cas de la sénescence induite par RAS, sa perte mène à une redistribution des niveaux restants de HMGB2 à travers le génome. Plus précisément, HMGB2 va se relocaliser à la frontière des régions encodant les facteurs du SASP, afin d'empêcher l'hétérochromatine de s'y étendre et permettre l'expression de ces facteurs. De ce fait, la déplétion du peu de HMGB2 restant dans des cellules sénescents mène à une extinction du SASP et à une relocalisation des loci codant pour des gènes de SASP à l'intérieur des SAHF (340).

Les dernières pages ont permis de faire un bref survol des éléments clés qui ont été découverts en lien avec la régulation de la structure de la chromatine et ses impacts sur les programmes transcriptionnels impliqués dans la sénescence. Toutefois, malgré la littérature

incommensurable à ce sujet, plusieurs questions demeurent à ce jour sans réponse. Notamment, est-ce que l'augmentation de l'accessibilité à la chromatine observée dans divers modèles de sénescence a un lien avec la mise en place du programme de sénescence, ou est-ce seulement une conséquence de l'établissement de ce dernier? Aussi, plusieurs facteurs ayant été montrés comme importants pour la restructuration de l'épigénome lors de la sénescence, *e.g.* AP-1, ne semblent pas être les médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire, mais plutôt des régulateurs du SASP. Ainsi, est-ce que l'augmentation d'accessibilité à la chromatine lors de la sénescence a un lien avec l'arrêt de prolifération? De plus, dans le cas de la sénescence par RAS, quels sont les TFs en aval de la voie régulant la reprogrammation transcriptionnelle lors de l'engagement des cellules vers le programme de sénescence? Enfin, comment l'activation d'une même voie de signalisation, *e.g.* RAS, mène à des programmes transcriptionnels différents, soit la sénescence cellulaire *versus* la prolifération cellulaire? Ainsi, l'article 2 qui sera présenté dans cette thèse montrera notre contribution à tenter de répondre aux questions susmentionnées. Nous montrerons la découverte d'un point de restriction agissant sur le statut d'accessibilité à la chromatine et régulant l'engagement des cellules vers la sénescence via un réseau de TFs nouvellement identifié.

1.5. Implications *in vivo* de l'accumulation de cellules sénescentes

Les sections précédentes ont permis de mettre en lumière l'ampleur des dérégulations présentes dans des cellules sénescents. De plus, malgré les effets bénéfiques associés à la sénescence tels que la cicatrisation et la suppression tumorale, il nous a été possible de constater qu'avec le vieillissement, l'accumulation de cellules sénescents devient plutôt néfaste. En effet, ces cellules continuent à sécréter leur SASP pro-inflammatoire normalement responsable de leur élimination par le système immunitaire. Cependant, dû à plusieurs facteurs encore mal compris, ces cellules ne sont pas éliminées correctement, ce qui provoque une inflammation chronique qui serait à l'origine de plusieurs maladies associées au vieillissement. Conséquemment, il a été montré que l'élimination de cellules sénescents via un modèle murin transgénique (INK-ATTAC) permettant l'élimination de cellules P16⁺ retardait l'apparition de plusieurs phénotypes associés au vieillissement en plus d'améliorer la durée de vie en santé (*healthspan*) (134). Depuis, l'emploi de tels modèles transgéniques s'est avéré des plus utiles afin de décortiquer plus précisément le rôle des cellules sénescents dans la pathogénèse de plusieurs maladies. Il a ainsi été possible de

démontrer que les cellules sénescents s'accumulent dans divers tissus pathologiques et que leur élimination permet d'améliorer de manière très importante la sévérité de plusieurs maladies liées au vieillissement telles que l'Alzheimer (341-343), la maladie de Parkinson (344,345), l'athérosclérose (346), la fibrose pulmonaire idiopathique (347), l'ostéoporose (348), l'arthrose (349), le diabète de type 2 (350,351), les rétinopathies (352-354) et le cancer (5,91,99-101).

Dans la majorité de ces cas, les effets délétères associés aux cellules sénescents ont été directement liés à leur sécrétome. En effet, le SASP renforce non seulement la sénescence de manière autocrine, mais également de façon paracrine et juxtacrine, menant à une augmentation de la charge sénescence et à une détérioration des fonctions du tissu atteint. Selon l'âge et le contexte tissulaire, cette détérioration peut être partiellement réversible ou perdurer dans le temps suivant l'élimination des cellules sénescents. Ceci pourrait entre autres être explicable par le fait que le SASP altère l'équilibre délicat dans le microenvironnement des niches qui est essentiel au bon fonctionnement des cellules souches (355). Ce phénomène est d'ailleurs bien étudié dans le contexte des niches de la moelle osseuse contenant des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) et des cellules souches hématopoïétiques (HSCs). En effet, il est bien établi que l'inflammation chronique au niveau de ces niches altère significativement le potentiel de différenciation des MSCs y résidant, menant à une différenciation biaisée vers l'adipogénèse au détriment de l'ostéogénèse (356). Cependant, il demeure incertain si cette inflammation provient directement des MSCs sénescents agissant dans une boucle de rétroaction positive paracrine, ou si elle provient de cellules sénescents voisines d'autres origines. Néanmoins, il semble que la sénescence des MSCs induit une telle différenciation biaisée vers l'adipogénèse (357,358). Ainsi, dans le vieillissement, ceci se traduit par une diminution des trabécules osseux, *i.e.* une augmentation d'incidence d'ostéoporose (359,360) et par une augmentation d'adipocytes montrant plusieurs marqueurs de sénescence dans la moelle osseuse. D'ailleurs, l'élimination de telles cellules sénescents semble restaurer la densité osseuse et prévenir l'ostéoporose dans un modèle murin transgénique (348). De plus, il a été montré que ces adipocytes sénescents régulent négativement la fonction des HSCs en forçant également une différenciation biaisée vers la myélopoïèse au détriment de la lymphopoïèse (361,362). Ceci serait d'ailleurs associé à une augmentation de HSCs exprimant le marqueur de sénescence P16^{INK4A} et la déplétion de ce dernier semblerait corriger les défauts de capacité de repopulation inhérents à ces cellules (363). En effet, le sécrétome des adipocytes sénescents induirait la formation de cellules suppressives dérivées de

myéloïdes (MDSCs) qui inhibent le développement des lymphocytes B. De plus, la présence de ces MDSCs représente l'un des mécanismes par lesquels les tumeurs arrivent à échapper au système immunitaire et à compromettre l'efficacité de l'immunothérapie (364,365). Ainsi, la sénescence des cellules souches au sein de ces niches pourrait en partie expliquer trois phénotypes associés au vieillissement, soit le déclin immunitaire, la diminution d'élimination des cellules sénescentes par le système immunitaire (*i.e.* leur accumulation) et l'augmentation d'incidence de cancers avec l'âge.

De manière intéressante, il a très récemment été montré qu'il était possible d'améliorer considérablement les dysfonctions des HSCs, leur régénération et la détérioration de leur niche en bloquant la signalisation par l'IL-1 β (366), un facteur important du SASP. Ainsi, il serait concevable d'utiliser des inhibiteurs d'IL-1 dans des contextes régénératifs après une chimiothérapie par exemple, ou en combinaison avec des drogues éliminant les cellules sénescentes, afin de limiter la dégradation de la niche et bloquer la boucle de rétroaction positive générant des cellules sénescentes. Nous discuterons d'ailleurs de telles options thérapeutiques dans la prochaine section portant sur les thérapies sénolytiques et sénomorphes.

Les effets délétères du SASP sur la fonction des cellules souches ont d'ailleurs été étudiés dans le contexte de différentes niches, notamment les cellules souches des cryptes intestinales (367), les cellules souches musculaires satellites (368,369) et les cellules souches des follicules pileux (205). Dans tous les cas, bien que les phénotypes et les mécanismes moléculaires impliqués varient beaucoup, toutes les populations de cellules souches semblent subir un déclin de fonction avec l'âge (370). De plus, ce déclin semble généralement lié à une perte de fonction et à un engagement biaisé vers un destin/une lignée spécifique tel qu'exemplifié avec les MSCs et HSCs ci-dessus. Il faut toutefois mentionner que ces défauts ne sont pas uniquement médiés que par des facteurs extrinsèques tels que des altérations au niveau des niches, mais sembleraient également avoir une composante intrinsèque liée au statut de la chromatine (371). Plusieurs expériences de greffes hétérochroniques de HSCs semblent d'ailleurs pointer dans cette même direction (372). Ainsi, les vieilles HSCs semblent exhiber une diminution de la marque répressive H3K9me3 associée à un relâchement de l'hétérochromatine des LADs et la dérégulation de régions répétées contenant notamment des satellites (316). Ceci serait dû à la diminution d'expression de SUV39H1 régulée par miR-125b. De manière intéressante, la simple surexpression de SUV39H1 ou

l'inhibition de miR-125b par une éponge suffit à réaugmenter la lymphopoïèse B déficiente dans les HSCs de vieux donneurs (316). On constate donc que la régulation du statut d'accessibilité à la chromatine semble jouer un rôle important dans le vieillissement des cellules souches et que cela peut mener à une perte de fonction immunitaire dû à un engagement biaisé vers la myélopoïèse plutôt que la lymphopoïèse tel que vu précédemment. Nous reviendrons d'ailleurs sur ce concept de régulation de l'accessibilité à la chromatine comme mécanisme d'engagement vers un destin cellulaire, *i.e.* la sénescence, dans l'article 2 de cette thèse. De plus, la sénescence des cellules souches sera également rediscutée dans l'article 3, où l'on décrit l'établissement d'un modèle murin transgénique d'inhibition conditionnelle du facteur de ribogénèse *Rsl1d1* ayant comme phénotype un vieillissement prématuré et l'accumulation de cellules sénescents dans des compartiments de cellules souches.

1.6. Thérapies sénolytiques et sénomorphes

1.6.1. Sénothérapies : le sujet de l'heure

Comme il a été possible de constater dans la section précédente, des thérapies permettant l'élimination des cellules sénescents (sénolytiques) ou à moins l'ablation de leur phénotype sécrétoire (sénomorphes) pourraient avoir d'immenses applications pour traiter différentes pathologies associées au vieillissement, dont le cancer. En ce qui concerne ce dernier, une des approches qui est actuellement étudiée est la «*one-two-punch therapy*» consistant à faire un premier *punch* en induisant de la mort cellulaire couplée à de la sénescence via une chimio/radiothérapie, puis faire un deuxième *punch* en éliminant les cellules sénescents résiduelles (cancéreuses et normales avoisinantes) avec des sénolytiques afin de les empêcher d'échapper et de récidiver. En ce qui a trait aux maladies liées à l'âge, l'approche couramment employée est plutôt le «*hit and run*», *i.e.* de manière intermittente. Les résultats obtenus jusqu'à présent dans des modèles murins transgéniques d'élimination conditionnelle des cellules sénescents semblent très prometteurs et efficaces (134,341,346,349,373). D'ailleurs, de telles thérapies pourraient même être envisagées afin d'étendre l'espérance de vie (*lifespan*) et améliorer la durée de vie en santé (*healthspan*) (374-376). Il n'est donc pas surprenant d'apprendre que plusieurs *startups* se sont lancées au cours des dernières années dans la course aux drogues sénolytiques, *i.e.* des drogues éliminant spécifiquement des cellules sénescents. Parmi celles-ci, il y a notamment la société américaine *Altos Labs Inc.* ayant attiré beaucoup d'attention récemment avec des investisseurs tels que Jeff

Bezos. Cette compagnie a levé 3 milliards de dollars de financement en janvier 2022 et compte désormais parmi ses chercheurs plusieurs grands noms tels que Dr. Manuel Serrano (découverte du suppresseur de tumeur P16 et de la sénescence induite par les oncogènes), Dr. David Baltimore (Prix Nobel de médecine en 1975 pour sa découverte de la réverse transcriptase utilisée par les virus à ARN), Dr. Shinya Yamanaka (Prix Nobel de médecine en 2012 pour sa découverte des cellules souches pluripotentes induites [*iPS cells*]), Dre. Frances Arnold (Prix Nobel de Chimie en 2018 pour son travail pionnier sur l'évolution dirigée) et Dre. Jennifer Doudna (Prix Nobel de chimie en 2020 pour le co-développement du système CRISPR-Cas9). Ceci démontre l'effervescence actuelle dans la course internationale au développement de drogues sénolytiques et autres thérapies d'extension de la longévité.

De ce fait, malgré des premiers résultats chez l'humain montrant des effets indésirables tels que la thrombocytopenie (377,378), quelques résultats plus récents avec d'autres sénolytiques semblent suggérer une amélioration des paramètres mesurés dans leurs études (379). Ainsi, il y a à l'heure actuelle plus d'une vingtaine d'essais cliniques testant l'utilisation de drogues sénolytiques pour le traitement de divers problèmes tels que la fibrose pulmonaire idiopathique, la maladie rénale chronique, la maladie d'Alzheimer, l'amélioration de la santé squelettique chez les personnes âgées, l'amélioration de la dégénérescence du cartilage articulaire liée à l'arthrose, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et la tempête de cytokines associée à la COVID-19 (380). Il faut toutefois mentionner que ces essais cliniques se focalisent principalement sur l'utilisation des premiers sénolytiques établis, soit le Navitoclax, la fisétine et la combinaison Dasatinib + Quercétine (D+Q) dont nous discuterons sous peu. Cependant, plusieurs nouvelles molécules sénolytiques ont récemment été rapportées et d'autres stratégies sénotherapeutiques basées sur l'immunothérapie ont également été récemment démontrées comme efficaces dans des modèles pré-cliniques; nous en discuterons également dans la prochaine section. Ainsi, les prochaines années promettent d'être remplies de découvertes révolutionnaires.

1.6.2. Stratégies sénotherapeutiques actuelles

D'un point de vue moléculaire, le défi est grand. Malgré les nombreux marqueurs susmentionnés permettant d'identifier les cellules sénescents, aucun d'entre eux ne semble être spécifique à ces cellules, d'où l'utilisation combinée de ces marqueurs pour leur identification. Ainsi, cela pose un défi supplémentaire afin de cibler des vulnérabilités dans ces cellules. De plus,

malgré les dommages à l'ADN, le stress oxydant et la sécrétion de facteurs pro-apoptotiques dans leur SASP, les cellules sénescents sont caractérisées par une résistance accrue à l'apoptose. En effet, elles survivent via une régulation à la hausse des voies pro-survie/anti-apoptotiques telles que PI3K-AKT, les kinases SRC, les HSPs, les serpinines et des facteurs anti-apoptotiques tels que les protéines de la famille BCL-2 et MCL-1. De ce fait, la plupart des thérapies sénolytiques actuelles se basent sur l'inhibition de ces mécanismes de défense (381-384). Conséquemment, la combinaison de Dasatinib + Quercétine cible les kinases SRC et la voie PI3K respectivement. Parallèlement, la fisétine cible également la voie PI3K. Quant au navitoclax (ou ABT-263) et la procyanidine C1, ceux-ci inhibent les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2, notamment, BCL-2, BCL-XL et BCL-W. Enfin, le S63845 quant à lui cible la protéine anti-apoptotique MCL-1 souvent surexprimée lorsque les protéines de la famille BCL-2 ne le sont pas. Il est important de mentionner que malgré la moins grande toxicité *in vivo* associée à certains sénolytiques tels que les flavonoïdes (fisétine, quercétine, etc.), il n'en demeure pas moins que chaque sénolytique a un spectre de couverture plus ou moins grand. Ainsi, certains types cellulaires ou types de sénescence demeurent difficiles à cibler avec les sénolytiques actuels. À titre d'exemple, la fisétine induit l'apoptose dans des cellules endothéliales sénescents (HUVECs), mais pas dans des fibroblastes ou préadipocytes sénescents (385). Conséquemment, il y a place à une grande amélioration afin de diminuer la toxicité et augmenter le spectre de sénescences ciblées par des sénolytiques.

En plus des drogues sénolytiques susmentionnées, d'autres méthodes sont employées pour faire la sénolyse. Parmi celles-ci, il y a les PROTACs (PROteolysis TArgeting Chimera) qui sont des molécules hétéro-bifonctionnelles permettant de détourner le système ubiquitine protéasome (UPS) de la cellule en faisant un pont entre une cible protéique à dégrader et une E3 ubiquitine ligase (386). On couple ainsi une molécule ciblant spécifiquement une E3 ligase (*e.g.* thalidomide qui cible CRL4^{CRBN} (387)) à une molécule ciblant la protéine d'intérêt à dégrader. Ce système permet entre autres de cibler des protéines autrement non-droguables, car il n'a pas besoin d'agir au niveau des poches catalytiques (388). De plus, contrairement aux technologies d'ARNi ou CRISPR dont l'usage *in vivo* dans des animaux adultes est limité, la technologie PROTACs semble bien fonctionner pour dépléter des cibles protéiques de manière systémique chez des animaux adultes (389). Ainsi, plusieurs drogues ont été reformulées en PROTACs afin de les améliorer. Parmi celles-ci, le navitoclax a été converti en PZ15227, un PROTAC ciblant BCL-XL pour la

dégradation par la E3 ligase cereblon (CRBN) (390). Ceci a permis de diminuer de manière significative les problèmes de thrombocytopénie associés à l'usage du navitoclax.

Alternativement, il a été montré qu'il était aussi possible d'éliminer les cellules sénescents via l'utilisation de cellules T à récepteur antigénique chimérique (*CAR-T cells*). En effet, en utilisant des cellules CAR-T spécifiques contre le récepteur uPAR surexprimé à la surface des cellules sénescents, l'équipe du Dr. Scott W Lowe a pu prolonger la survie de souris en éliminant des cellules sénescents selon une stratégie *one-two-punch* dans un contexte d'adénocarcinome pulmonaire (391). Plus récemment, il a été montré qu'*in vivo* les cellules sénescents expriment de façon hétérogène la protéine de point de contrôle immunitaire PD-L1. Il semblerait que les cellules sénescents négatives pour PD-L1 seraient associées à un SASP plus modéré et à une surveillance immunitaire par les cellules T, alors que les cellules sénescents exprimant PD-L1 seraient à l'inverse associées à un SASP plus fort et seraient capable d'éviter la surveillance immunitaire malgré leur SASP. Conséquemment, l'administration d'anticorps anti-PD-1 permettrait de diminuer le nombre total de cellules sénescents *in vivo*, améliorant par le fait même plusieurs phénotypes liés au vieillissement (392).

Enfin, outres les thérapies sénolytiques, une autre classe d'agents ciblant les cellules sénescents a vu le jour dans les dernières années. Il s'agit des agents sénomorphes bloquant plutôt le phénotype sécrétoire des cellules sénescents. Ainsi, ces drogues vont soit cibler des médiateurs du SASP tels que NF- κ B (393,394), BRD4 (268), P38 (395) et cGAS-STING (396,397), cibler des processus mitochondriaux à l'origine du SASP (398-400) ou bloquer directement l'action de molécules du SASP telles que l'IL-6 (401) ou l'IL-1 (366,402). Finalement, il faut dire que l'utilisation de sénomorphes serait une option tout aussi intéressante que la sénolyse, car il a déjà été observé que l'élimination de cellules sénescents à l'échelle systémique pouvait parfois avoir des effets indésirables tels que générer de la fibrose dans certains tissus (98,403).

1.7. Problématique et objectifs de la thèse

Les notions abordées dans les pages précédentes nous ont permis de mettre en lumière les rôles paradoxaux associés à la sénescence. Autant celle-ci protège contre l'émergence de cellules ayant un caractère pro-tumorigénique en arrêtant stablement leur prolifération, autant de manière chronique, de par leur sécrétome pro-inflammatoire, les cellules sénescents sont responsables de

plusieurs maladies associées au vieillissement dont le cancer lui-même. Ainsi, dans le microenvironnement tumoral, les cellules sénescents vont sécréter des cytokines qui vont promouvoir la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et antagoniser la réponse immunitaire antitumorale en médiant le recrutement de cellules immunitaires suppressives (404). De plus, il est bien établi que l'acquisition de mutations oncogéniques dans RAS rend le SASP de ces cellules sénescents particulièrement pro-malin (192). C'est pour cette même raison que l'approche actuelle dans le domaine de la sénescence est d'utiliser une stratégie thérapeutique de type *one-two punch* qui consiste en l'induction de sénescence dans des cellules cancéreuses, puis l'élimination de ces cellules cancéreuses sénescents via l'emploi de sénolytiques. Il est donc important de comprendre la biologie du SASP de ces cellules afin de comprendre l'évolution du cancer en général. C'est dans cette optique que je vous présenterai dans l'article 1 de cette thèse une revue de la littérature sur la régulation du SASP et ses impacts sur la plasticité cellulaire et la tumorigénèse. Nous discuterons d'ailleurs de l'implication de ce dernier dans la discussion de l'article 3.

De plus, nous avons également vu que l'activation de la voie RAS/MAPK classiquement considérée comme pro-tumorigénique en favorisant la prolifération cellulaire, pouvait aussi mener à un destin cellulaire antagoniste, soit la sénescence cellulaire. Il a été suggéré que le niveau différent d'activation de la voie serait en partie responsable de ces réponses contradictoires (57,108). Ainsi, une forte activation soutenue de cette voie induirait un arrêt de prolifération et la sénescence, alors qu'une signalisation plus modérée mènerait plutôt à de la prolifération. Néanmoins, à ce jour, les événements moléculaires permettant aux cellules d'intégrer le signal oncogénique et de faire pencher la balance vers la prolifération ou la sénescence cellulaire demeurent inconnus. Ainsi, dans l'article 2 de cette thèse représentant mon projet principal mené durant mon doctorat, il sera question de caractériser plus précisément ces mécanismes impliqués dans l'engagement des cellules vers la sénescence induite par l'oncogène RAS, avant même l'induction du phénotype de sénescence. Ultimement, une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait de concevoir des stratégies anticancéreuses permettant de faire pencher la balance vers la sénescence dans un contexte de cancers mutés en RAS, afin d'éliminer subséquemment ces cellules par une thérapie *one two punch* tel que mentionné ci-dessus. Nous verrons entre autres que ces mécanismes d'intégration du signal semblent reposer sur une augmentation de l'accessibilité à la chromatine qui serait décisive pour l'entrée en sénescence. De

plus, nous verrons en discussion de cette thèse comment nous pensons que cette ouverture de chromatine médie l'entrée en sénescence, notamment en induisant le SASP et en causant les défauts de ribogénèse présents chez les cellules sénescents.

Enfin, puisque l'approche *one two punch* se présente comme une stratégie thérapeutique prometteuse pour le traitement des cancers, il convient de trouver de nouvelles façons d'induire la sénescence dans les cellules cancéreuses *in vivo* (premier punch), de façon sécuritaire pour les patients, c'est-à-dire sans effets secondaires majeurs sur les autres systèmes et organes. Au sein de notre laboratoire, nous avons justement démontré que l'induction de défauts de ribogénèse était suffisante pour induire la sénescence en culture cellulaire (219). De plus, un second projet a également montré l'importance de ces défauts de ribogénèse dans la maintenance ou la profondeur du phénotype sénescents dans les cellules cancéreuses (en révision). Ainsi, dans l'article 3 présenté dans cette thèse, nous verrons la première étude à ce jour de sénescence induite par les défauts de ribogénèse dans un modèle murin, soit un projet que j'ai mené en parallèle durant mon doctorat. En effet, dans cet article, nous générons un modèle transgénique de déplétion conditionnelle du gène *Rsl1d1*, un facteur associé à la ribogénèse, où sa déplétion induite dans la majorité des organes de la souris permet une caractérisation des effets secondaires anticipés si l'on devait utiliser un médicament à effet systémique permettant l'induction de sénescence par une diminution de la maturation des ARNr. La validation de l'innocuité de ce premier punch au niveau des systèmes et organes, combinée à de nombreuses études antérieures démontrant la dépendance des cellules cancéreuses face à ce processus cellulaire, constitue donc la première étape pour l'établissement d'une stratégie *one-two punch* efficace pour le traitement des cancers chez l'humain.

2. Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence et sa régulation.

2.1. Mise en contexte de l'article 1

Les éléments mentionnés en introduction nous permettent de constater que la sénescence cellulaire est un parfait exemple de pléiotropie antagoniste. En effet, de par son effet suppresseur de tumeur agissant comme une barrière à la transformation cellulaire, la sénescence se veut un mécanisme intrinsèquement bénéfique. Cependant, avec l'âge, l'accumulation de cellules sénescents n'étant pas éliminées par le système immunitaire est associée à une inflammation chronique ayant des effets pro-tumorigéniques. Les principaux effets néfastes associés aux cellules sénescents étant dus à leur sécrétome pro-inflammatoire, une meilleure compréhension de ce processus permettrait de concevoir des thérapies basées sur l'utilisation de sénomorphes en combinaison avec des inducteurs de sénescence. En effet, de telles thérapies qu'on pourrait qualifier de «*triple-punch therapy*» pourraient être intéressantes afin de stabiliser le phénotype de sénescence. De ce fait, un traitement par chimiothérapie induirait un mélange de mort cellulaire et de sénescence (premier *punch*), puis un traitement sénomorphe empêcherait le SASP des cellules cancéreuses sénescents de stimuler la prolifération de cellules faiblement sénescents (deuxième *punch*). Enfin, un agent sénolytique permettrait l'élimination de ces cellules (troisième *punch*). Bref, cet article de révision se veut un complément à la courte section sur le SASP en introduction afin de mettre en perspective non seulement les effecteurs moléculaires du SASP mais également les conséquences fonctionnelles de ce phénotype sécrétoire.

2.2. Contribution à l'article 1

L'article 1 de cette thèse est en fait un article de révision portant sur la régulation du phénotype sécrétoire des cellules sénescents (SASP). Il s'agit d'un article corédigé par chacun des auteurs. Ainsi, pour ma part, j'ai rédigé les sections 2.3.8 Secreted proteases as modulators of SASP, 2.3.11 SASP factors as intracrine signalling molecules et 2.3.14 SASP, reprogramming and cellular plasticity. J'ai également généré les Figure 2.1 et Figure 2.3 de cet article de révision. Emmanuelle Saint-Germain a quant à elle rédigé les sections 2.3.2 Introduction, 2.3.3 A brief overview of the SASP et 2.3.4 C/EBP controls the SASP, puis généré la Figure 2.2. Marie-Camille Rowell a rédigé les sections 2.3.9 HMGB1 and the DAMPs, 2.3.12 Therapy-induced senescence and tumor-promoting properties of the SASP et 2.3.13 The SASP in senescence induced by lamin A defects. Ana Fernández Ruiz a rédigé la section 2.3.10 Lipids in the SASP. Gerardo Ferbeyre a rédigé les sections 2.3.5 NF- κ B controls the SASP, 2.3.6 P53 controls the SASP: N-SASP and P-SASP et 2.3.7 Epigenetic control of the SASP. La conclusion ainsi que la révision de l'article est un travail collectif de tous les auteurs.

2.3. Article 1

The senescence-associated secretory phenotype and its regulation

Stéphane Lopes-Paciencia, Emmanuelle Saint-Germain, Marie-Camille Rowell, Ana Fernández Ruiz, Paloma Kalegari, and Gerardo Ferbeyre.

Cytokine, 2019 May; 117, pages 15-22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.01.013>

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

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

Correspondence to: Gerardo Ferbeyre

2.3.1. Abstract

The senescence-associated secretory phenotype (SASP) defines the ability of senescent cells to express and secrete a variety of extracellular modulators that includes cytokines, chemokines, proteases, growth factors and bioactive lipids. The role of the SASP depends on the context. The SASP reinforces the senescent cell cycle arrest, stimulates the immune-mediated clearance of potentially tumorigenic cells, limits fibrosis and promotes wound healing and tissue regeneration. On the other hand, the SASP can mediate chronic inflammation and stimulate the growth and survival of tumor cells. The regulation of the SASP occurs at multiple levels including chromatin remodelling, activation of specific transcription factors such as C/EBP and NF- κ B, control of mRNA translation and intracellular trafficking. Several SASP modulators have already been identified setting the stage for future research on their clinical applications.

2.3.2. Introduction

Senescence is a cell fate triggered by stressors or developmental signals and is characterized by a stable growth arrest, active metabolism, resistance to cell death and secretion of extracellular factors. The abundance of senescent cells increases with chronological aging in multiple tissues (405,406). The number of senescent cells in very old primates was estimated in the range of 5-20% (406-408). Since the human body contains 37 trillion cells, senescent cells in aging organisms easily outnumber professional secretory cells. For example, the pituitary gland has around 1 million-cells for their major secretory cell types (409). Therefore, the senescence-associated secretory phenotype (SASP) can have a major effect in the physiology of old organisms and can be responsible for chronic inflammation and age-linked diseases including cancer (410,411). In younger organisms, senescence have positive effects linked to tumor suppression (97,194,195,204), limiting fibrosis (97), promoting wound healing (98,412) and tissue regeneration (413).

Specialized secretory cell types secrete most extracellular mediators. However, senescence reactivates the expression of multiple pro-inflammatory genes in many different cell types. Here we review our current understanding of this remarkable gene reprogramming process that turns any cell type into a secretory cell.

2.3.3. A brief overview of the SASP

The SASP defines the secretion of diverse cytokines, chemokines, growth factors, proteases and lipids by senescent cells. The composition of this special secretome is variable and depends on the senescence trigger. The SASP acts as a double-edged sword: it has some beneficial effects such as allowing the recruitment of the immune system to premalignant lesions (101,204,414) and promoting the repair of damaged tissues (98,412,415). However, the secretion of many pro-inflammatory factors such as IL-6, IL-8, membrane cofactor proteins (MCPs) and (macrophage inflammatory proteins (MIPs) (416) can lead to deleterious effects such as promoting proliferation (417,418), angiogenesis (419) and inflammation (416), both in autocrine and paracrine manners. The SASP has been linked to a persistent DNA damage signaling (420). In tumor cells, cytotoxic chemotherapy can induce a SASP response sometimes without a full development of a senescent phenotype. This therapy-induced SASP has been linked to chemoresistance (421,422). Multiple components of the SASP can transmit senescence to neighbouring non-senescent cells, a phenomenon known as paracrine senescence (423). The SASP is initially regulated at the transcriptional level. Two main transcription factors allow the activation of the SASP in response to senescence inducers: C/EBP and NF- κ B.

2.3.4. C/EBP controls the SASP

The CCAT/Enhancer Binding Protein family comprises transcription factors that are part of the basic leucine zipper (bZIP) superfamily (424). Six isoforms were characterized: C/EBP α , β , δ , ϵ , γ and ζ and they can either homodimerize or heterodimerize. It is important to note that C/EBP ζ does not possess a functional DNA Binding Domain (DBD) which enacts it to function as a dominant negative of transcriptional activation when complexed with other members of the family (424). C/EBP β has been shown to regulate many cytokines and factors known to constitute the SASP such as IL-1 β , IL-8, IL-6, GRO α and NAP2. Furthermore, several studies have shown that this transcription factor is necessary for senescence and also sufficient to induce the process when overexpressed (194,195,425). Indeed, it was shown that C/EBP β is upregulated during oncogene-induced senescence and that it binds to the IL-6 promoter in this context (195).

Transformed cells harbouring *RAS* or *BRAF* oncogenes often express high levels of the C/EBP β mRNA and protein. However, in these tumor cells C/EBP β cannot exert an anti-

proliferative effect because the 3'UTR of the C/EBP β mRNA excludes translation from the perinuclear compartment where the protein is phosphorylated and activated (426). Finally, the C/EBP γ isoform was shown to suppress senescence by forming heterodimers with C/EBP β and suppressing the transcription of SASP genes (427).

2.3.5. NF- κ B controls the SASP

Many but not all pro-inflammatory genes expressed in senescent cells required the master transcription factor NF- κ B (194,195,394,414,428). However, non-canonical NF- κ B activation can bypass senescence in melanoma (429) indicating a complex context-dependent function of this transcription factor. The activation of NF- κ B during senescence has been linked to p38MAPK (395), GATA4 (430), the ROS-PKC δ -PRKD1 pathway (431), mitochondria (394,432) and the multi-ligand scavenger receptor CD36 (433) (Figure 2.1). P38 increases DNA binding and activity of NF- κ B (395) while GATA4 induces the expression and secretion of IL1A, which is a well-known activator of NF- κ B (196,430). GATA4 accumulates in senescent cells due to a decrease in its degradation via autophagy (430). IL1A is also regulated at the translational level by mTOR (211) and at a post-translational level by the inflammasome (423). SASP activation through NF- κ B is linked to the DNA damage response (DDR) (420) and in agreement, the methyl transferase MLL1 controls the SASP by inducing cell proliferation genes, replication stress and DNA damage (434). The cytosolic DNA sensor cGAS, links DNA damage to activation of the SASP. cGAS catalyses the production of the second messenger cGMP which activates the adaptor protein STING, an activator of both IRF3 and NF- κ B (435,436). STING can be also activated via a non-canonical pathway triggered by DNA damage that does not depend on cGAS, involves p53 and the ubiquitin E3 ligase TRAF6 and preferentially activates NF- κ B over IRF3 (437). Since senescence involves DNA damage signaling (438), it is likely that this pathway is activated in senescent cells. Finally, CD36 is induced in multiple senescence contexts playing a critical role in the initiation of the SASP in response to ligands such as β -amyloid and oxidized LDL (oxLDL) (433,439) which could also play a role as senescence inducers (440,441). The antidiabetic drug metformin inhibits NF- κ B activation in senescent cells and selectively represses SASP genes that require this transcription factor (394,432). Metformin inhibits the expression of most pro-inflammatory cytokines in cells that experienced oncogene-induced senescence (OIS) (Figure 2.2).

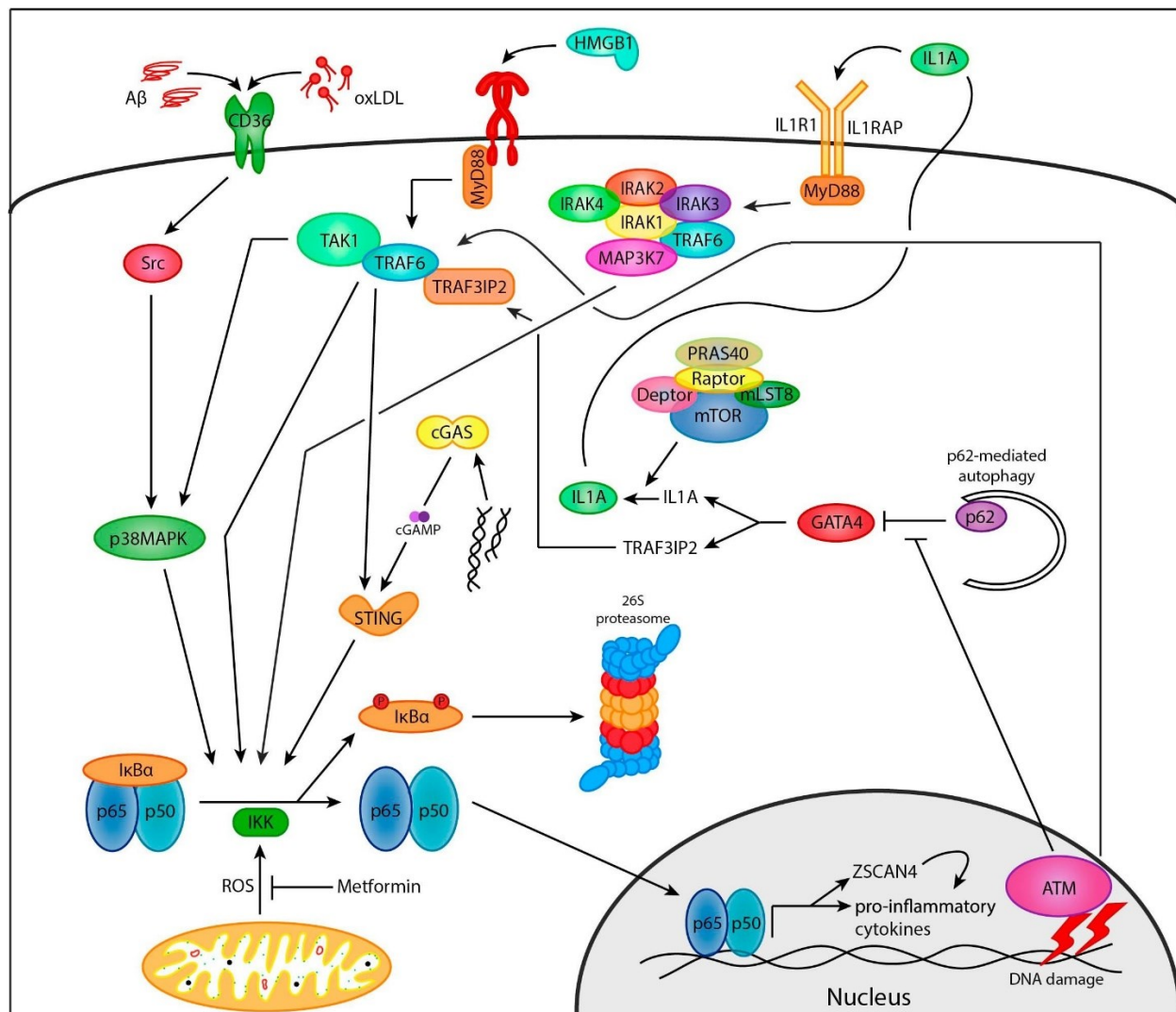


Figure 2.1. Regulation of NF-κB in senescent cells.

Multiple pathways converge to activate NF-κB in senescent cells. The initial triggers can originate inside the cells (cytosolic DNA, cytosolic chromatin fragments, DNA damage) or act on membrane receptors (Aβ peptides, oxLDL, IL1A, HMGB1). The signals converge into the IKK complex that phosphorylates and disables the inhibitor IκBα that sequesters NF-κB in the cytosol. After nuclear translocation, NF-κB induces the SASP genes but also ZSCAN4 which further amplify cytokine gene expression.

Metformin does not inhibit the growth arrest program of senescent cells (394,432) indicating that the SASP and the cell cycle arrest in senescence are independently controlled. Consistent with this idea, expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI) p21, p16INK4A or RPS14 induces a SASP-free senescent cell cycle arrest (192,219,420,442). Intriguingly, metformin acts in mitochondria to suppress the SASP and a similar effect was reported after eliminating mitochondria in senescent cells (443). Hence, mitochondria are critical to regulate the senescence phenotype, but precise molecular mechanisms are unknown.

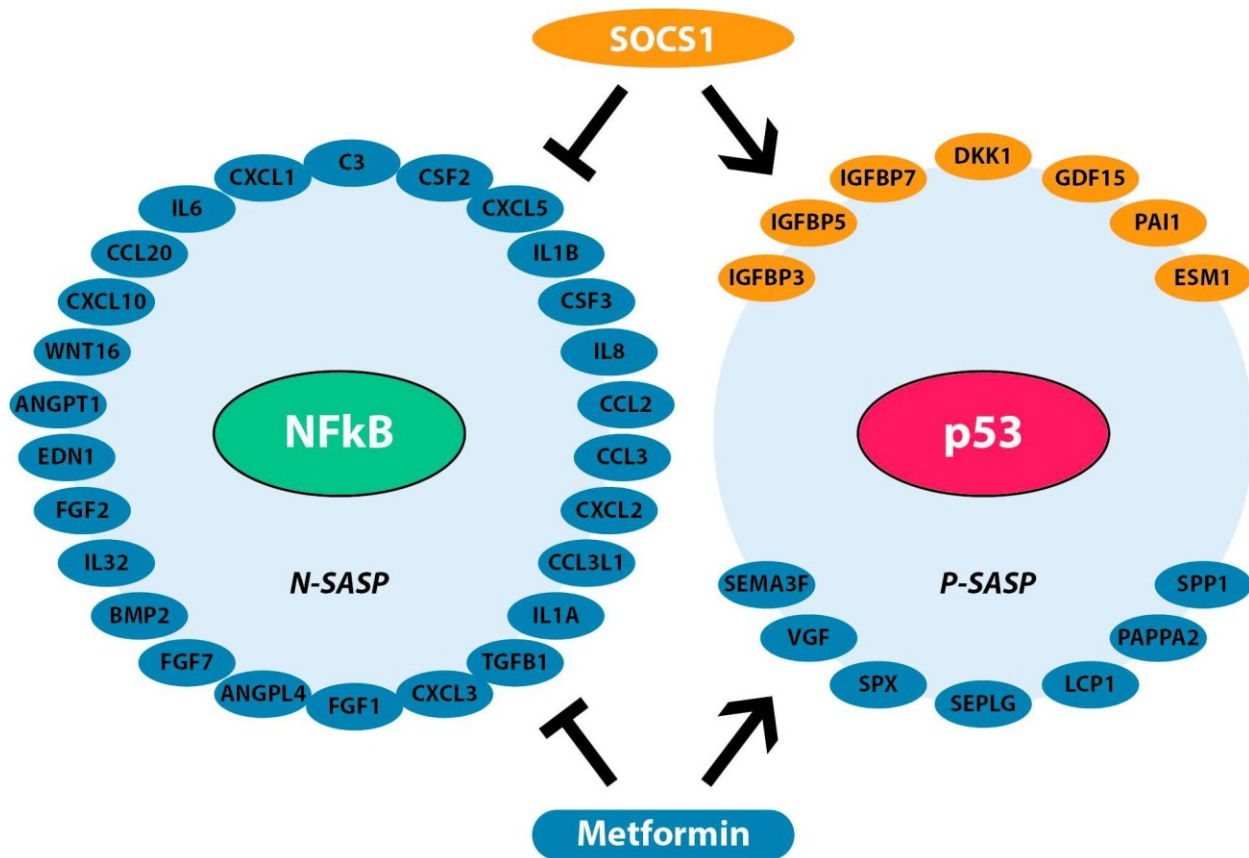


Figure 2.2. Classification of the SASP according to the major transcription factors regulating its components.

The N-SASP is driven by NF- κ B and is inhibited by p53, SOCS1 and metformin. The P-SASP depends on p53 and its modulator SOCS1 and has been so far understudied. Data in the figure comes from microarray data sets GSE98216 (SOCS1) and GSE33612 (metformin).

2.3.6. P53 controls the SASP: N-SASP and P-SASP

The SASP suppresses or promotes tumorigenicity depending on the status of p53. In the liver, senescent stellate cells secrete factors that promote macrophage differentiation towards tumor-inhibiting M1 state. In contrast, p53 null stellate cells secrete factors that promote M2 pro-tumorigenic macrophages (193). In the colon, deletion of p53 changes the characteristics of the SASP, increasing the expression of TNF α and its ability to induce invasion and proliferation of tumor cells (444). In metformin treated OIS cells, only a few secretion products are highly expressed. One of these genes is SEMA3F, a p53 target gene involved in antiangiogenesis (445,446). Hence, the secretome of senescent cells is driven by NF- κ B (the N-SASP) and inhibiting this transcription factor dramatically changes the pattern of secreted proteins allowing a relative

enrichment of p53-dependent secretory factors (the P-SASP). Although p53 promotes the upregulation of some secreted factors, it is also considered a negative regulator of the SASP, since its absence promotes an enhanced SASP that is associated with pro-malignant functions (192). p53 acts in part by suppressing p38MAPK signalling to NF- κ B. Inactivation of p53 leads to a faster and stronger activation of p38MAPK by DNA damage, amplifying the SASP (395). Treating senescent cells with the MDM2 inhibitor nutlin, increased p53 activity and reduced the expression of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1A (447).

One important SASP modulator is the tumor suppressor SOCS1. Although SOCS1 is sufficient to activate p53 and trigger senescence (448) it is also an inhibitor of NF- κ B (449). SOCS1 triggers a unique pattern of p53 target gene expression including several secretory products with potential tumor suppression activity (Figure 2.2) (450). SOCS1 also activates p53 to induce DDIT-3 (also known as C/EBP ζ), a dominant negative inhibitor of C/EBP family of transcription factors (451). SOCS1-induced senescence is devoid of the induction of classical SASP factors although it shows sustained DNA damage signalling (450).

2.3.7. Epigenetic control of the SASP

The reactivation of pro-inflammatory gene expression in multiple senescent non-immune cell types suggests that chromatin remodelling underlies this genetic reprogramming. Senescent cells exhibit large-scale changes in chromatin organization including loss of the repressive H3K27me3 modification that affects up to 65% of SASP genes (452). These chromatin changes were linked to the downregulation of lamin B1 expression in senescent cells (321,452). In addition, SASP genes show an enrichment for H4K16ac, the histone chaperone HIRA, the histone variant H3.3 (453) and a global remodelling of the enhancer landscape (268). The latter includes the recruitment of BRD4 to superenhancers close to SASP genes (268).

DNA damage may trigger the chromatin changes required to prime SASP genes for activation. One mechanism involves the ATM-dependent protein degradation of the histone methyltransferases G9a and GLP (454). Activation of ATM also triggers the removal of the histone variant macroH2A.1 from the chromatin of SASP genes (455). This removal is related to the BRCA1-dependent ubiquitination of macroH2A.1(456).

SASP genes display an enrichment for HMGB2 during oncogene-induced senescence (OIS) and the loss of this factor inhibits the SASP without altering the cell cycle arrest of senescent cells (340). However, in contrast to this study, low expression of HMGB2 was reported to be an early event during replicative senescence entry that correlated with high expression of IL-6 and IL-8, increased nuclear size, changes in heterochromatin markers and chromatin folding (313). Notably, upon entry into senescence, cells exhibited stronger intrachromosomal long-range interactions. In addition, HMGB2 did not associate to SASP genes in replicative senescence (313). The reasons for these differences remain to be investigated. However, it is clear that HMGB2 loss is not the only factor implementing the senescence decision because its inactivation failed to recapitulate the senescence phenotype (313).

Chromosomes are organized into topologically associated domains (TADs) whose organization is linked to the regulation of gene expression. This organization has been revealed using chromosome conformation capture methods and is affected by the repressor CTCF, cohesin and cohesion-associated proteins (457). HMGB2 binds to positions of chromatin insulation and its loss in replicative senescent cells is associated to changes in TAD boundaries and altered expression of genes within those TADs (313). Taken together, these studies support a role of HMGB2 in reorganizing chromatin in replicative senescence cells and raise questions about the mechanism responsible for controlling the same process in OIS.

2.3.8. Secreted proteases as modulators of the SASP

It is well known that SASP factors not only include pro-inflammatory cytokines, but also a myriad of proteins and enzymes implicated in reorganization of the extracellular matrix (ECM). Among those enzymes are Matrix Metalloproteinases (MMPs), Serine/cysteine Proteinase Inhibitors (SERPINs), Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs) and Cathepsins (CTSs) (458). MMPs (1/2/3/7/8/9/13) not only help to reorganize the ECM, but also play an important role in modulating immune and inflammatory responses through the processing of chemokines and subsequent generation of antagonists with anti-inflammatory properties (459). Therefore, secretion of these proteases by senescent cells might decrease their immune clearance and contribute to deleterious/pro-tumorigenic features of the SASP due to subsequent reduced immune surveillance. Likewise, it was shown in a xenograft model that senescent fibroblasts increased growth of co-transplanted breast cancer cells in an MMP-dependent manner (460). The SASP can recruit other

inflammatory cells such as neutrophils and mast cells, which secrete extracellular proteases that can activate precursors of the IL-1 family (461-463). This process generates a local feed-forward amplification of the SASP. The final outcome of the interplay between extracellular proteases and cytokines may depend on the context and further studies are required to identify factors that tilt the balance towards positive or negative interactions (Figure 2.3).

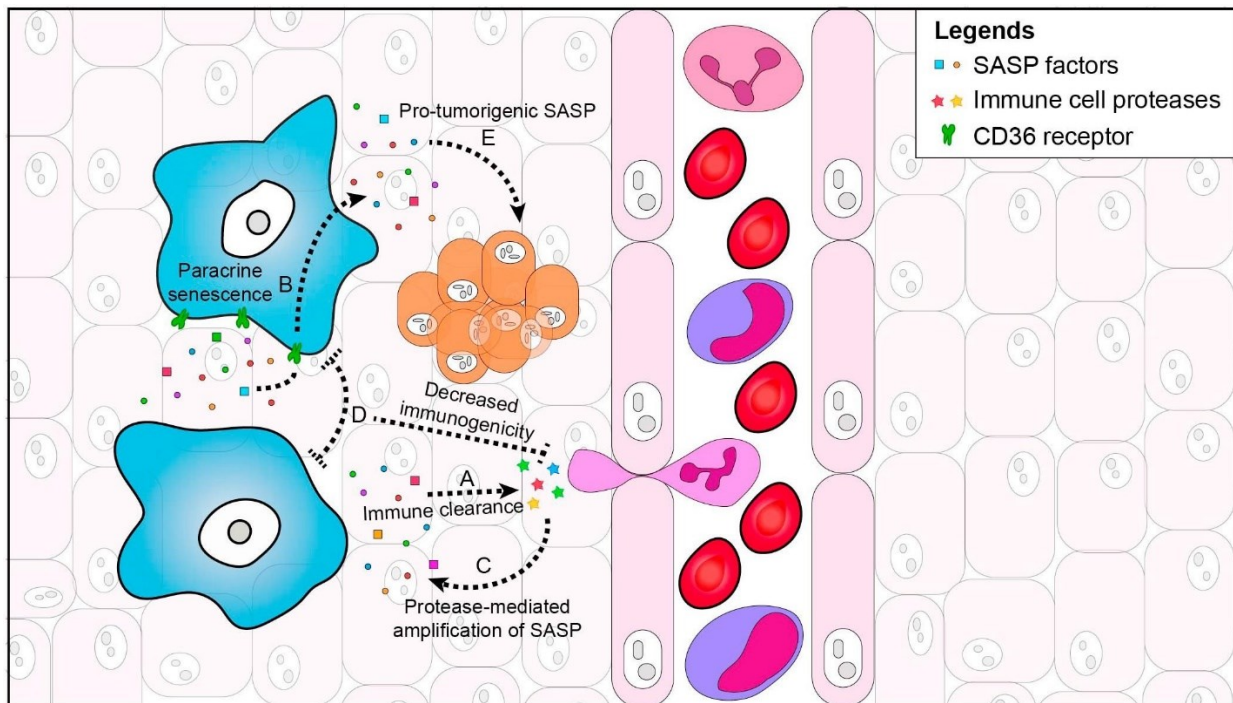


Figure 2.3. Model proposed for positive and negative modulation of SASP through secreted proteases.

(A) Secretion of pro-inflammatory cytokines by senescent cells (blue) leads to recruitment of immune cells (purple and pink) for further clearance. (B) CD36 is bound by SASP components from cells in the vicinity, leading to establishment of paracrine senescence and SASP. (C) In a context of acute inflammation, following extravasation of immune cells, the latter secrete proteases with the potential of amplifying the SASP through processing of secreted precursors from IL-1 family. (D) The inter-senescent cells paracrine effect of SASP leads to MMPs-mediated degradation of pro-inflammatory cytokines. (E) In the context of carcinogenesis (orange), subsequent reduction of pro-inflammatory cytokines in the extracellular compartment leads to decreased recruitment of immune cells and increased tumor growth.

2.3.9. HMGB1 and the DAMPs

The SASP includes Damage-associated molecular patterns (DAMPs), also called Alarmins (464). As opposed to PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns), DAMPs are endogenous molecules of nuclear or cytoplasmic origin that can be secreted upon stress induction (464). DAMPs can induce paracrine senescence and mediate pro-inflammatory response in an autocrine

or paracrine manner (465). Consequently, they can stimulate immune cells recruitment, wound healing and tissue repair (466). The HMGB1 protein (High mobility group protein B1) is the most studied example, but DAMPs also include histones, S100s proteins, heat shock proteins, mitochondrial and nuclear DNA, RNA, nucleotides (464) and oxidized lipids (467). In senescence, secretion of HMGB1 is an early event, occurring 24h to 48h post-irradiation (465). HMGB1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and its subsequent secretion have been shown to depend on CRM1-dependent nuclear export, followed by loading in secretory lysosomes (468). This process can be regulated by multiple post-translational modifications, such as acetylation (468) and oxidation (469). Deacetylation of HMGB1 by the NAD-dependent deacetylase SIRT1, an enzyme implicated in senescence and ageing (470), also blocks its nuclear-to-cytoplasmic shuttling and secretion (471). HMGB1 controls mitochondrial fitness through regulation of HSPB1 and mitophagy (472), suggesting that secretion of HMGB1 in senescent cells may contribute to their mitochondrial dysfunction. Extracellular HMGB1 was shown to induce a sterile inflammation through TLR receptors binding and induction of IL-6. *In vivo*, old mice showed decreased nuclear HMGB1 in comparison to young mice, and also increased HMGB1 in their serum (465). Loss of nuclear and gain of extracellular HMGB1 both contribute to the senescence phenotype, notably by increasing genomic instability and telomere dysfunction (473) and extracellularly by TLR/NF- κ B stimulation of SASP respectively (465). Consequently, overexpression or knock-down of HMGB1 can induce senescence in a p53-dependent manner (465). Overall, secretion of DAMPs including HMGB1 has been linked to chronic inflammation and several age-related diseases such as atherosclerosis and arthritis (474), thereby underscoring their relevance in the senescence field as unique SASP factors.

2.3.10. Lipids in the SASP

Senescent cells also have the ability to secrete bio-active lipids, including eicosanoids derived enzymatically from arachidonic acid (475). The production of eicosanoids is mediated by two major enzymes: Prostaglandin-endoperoxide synthase (PTGS), better known as cyclooxygenase (COX), that is responsible for formation of prostanoids, and arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5), that converts arachidonic acid into leukotrienes. These lipid compounds act as autocrine or paracrine factors that mediate a diversity of physiological functions, such as inflammation, vasodilation, immune responses and smooth muscle contraction (475).

Several studies have focused on the role of cyclooxygenases in senescence. COX2 is overexpressed in replicative and stress-induced senescence (195,394,476,477), and at least one selective COX2 inhibitor prevents senescence (478). However, not all COX2 inhibitors can block senescence, suggesting that COX2 regulates the process by a non-catalytic mechanism (479). Interestingly, COX2 expression is also increased in old cells (480-482) and post-natal transgenic expression of COX2 induces aging-related phenotypes in mice (483). The major product of COX2 activity is prostaglandin E2 (PGE2) whose levels are increased in both replicative and premature senescence (484). Also, senescent fibroblasts express very low levels of prostaglandin-D-synthase, explaining why PGE2 is the most important prostaglandin in senescence (485). Furthermore, PGE2 treatment induces senescence in human fibroblasts (486-488) and in CD8 T cells (489). Several studies have identified that COX2-mediated prostaglandin E2 (PGE2) production promotes a tumor-promoting environment in melanoma, breast, colorectal and hepatocellular carcinoma (490,491). PGE2 expression is also increased in fibroblasts from patients of chronic obstructive pulmonary disease, which has been associated with lung fibroblasts senescence (492).

Leukotrienes and ROS are generated from arachidonic acid by 5-lipoxygenase, which has been reported to be a senescence-mediator through the p53 pathway (476). Leukotriene C4 is a major mediator of oxidative DNA damage acting in an intracrine manner via nuclear translocation of the ROS producing enzyme NOX4 (493), which is required for RAS-induced senescence (169). Leukotriene D4 can also induce cellular senescence dependent on cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLTR1) in osteoblasts (494), a receptor that also has a role in chondrocyte senescence (495).

2.3.11. SASP factors as intracrine signalling molecules

Several SASP components not only get secreted in the extracellular milieu, but also accumulate at very high levels in cells undergoing cellular senescence. Among these components, IL-6, PGE2, leukotriene C4, SERPINB2 (PAI-2) and SERPINB4 have been shown to be essential for senescence induction and maintenance acting via intracrine signaling, rather than outside of the cell (192,200,487,493,496). Concerning PAI-2, it has been shown to be a direct target of p53 and to co-immunoprecipitate with p21, leading to its stabilization. Indeed, knockdown of p21 reverts PAI-2-induced senescence, whereas knockdown of p53 fails to revert the phenotype (200). As for SERPINB4, it has recently been shown to act on IMMP2L-mediated mitochondrial reprogramming to favor senescence over apoptosis upon oxidative stress (496). Even though these proteins get

secreted as part of the SASP, B subtype of SERPINs also accumulate inside cells due to lack of signal peptide (497). Importantly, whereas several SASP factors are usually amplified in cancers (e.g. CXCL1/2/5, CCL2/3, etc.), according to cBioPortal, PAI-2 and SERPINB4 are both deleted in several cancers, especially in pancreatic cancer where it can be deleted in up to 24% of samples, confirming their tumor suppressor function.

2.3.12. Therapy-induced senescence and tumor-promoting properties of the SASP

Studies to better understand the molecular mechanisms regulating the SASP are becoming more and more clinically relevant. Cancer chemotherapy induces DNA damage both in tumor cells and in the surrounding stromal cells, such as fibroblasts, which subsequently enter senescence. The secreted products of the senescent stroma can then confer resistance to cancer chemotherapy (421). It was recently reported that therapy-induced DNA damage in fibroblasts induced senescence and stimulated expression of multiple SASP factors such as AREG, SPINK1, MMP3, and expression of the transcription factor ZSCAN4 (104). This transcription factor is induced in a DNA-damage dependent manner, through the ATM-TRAF6-TAK1-NF- κ B axis in the surrounding stroma of tumors from NSCLC and breast cancer patients having received chemotherapy (104). ZSCAN4 expression is associated to poor survival and cell culture models suggest a role for ZSCAN4 in a loop of amplification of the SASP (104). It is known that the SASP can stimulate tumorigenesis and drug resistance by inducing a pro-inflammatory microenvironment (103). A combination of TAK1 inhibition with chemotherapy blocks drug resistance by suppressing the SASP of senescent stromal cells in prostate and breast cancer xenografts, inducing tumor regression (104). Altogether, this opens a promising field of research on how SASP modulation can benefit cancer patients undergoing DNA-damaging chemotherapy.

2.3.13. The SASP in senescence induced by Lamin A defects

Cellular senescence is also triggered by defects in nuclear lamina assembly. In the Hutchinson-Gilford progeria syndrome, a disease characterized by a premature aging, a truncated form of lamin A, called progerin, has a defective turnover (498) and thus accumulates, causing a disturbed nuclear lamina, DNA damage and consequently cellular senescence (499). Loss of the enzyme ZMPSTE24, which processes prelamin A into mature lamin A also leads to accumulation

of prelamin A and senescence (500). The SASP in this specific senescence model can trigger paracrine senescence through the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its binding to its receptor CCR2 on target cells (501). Both progerin overexpression and ZMPSTE24 depletion in human mesenchymal stem cells induce an ATM/ATR-dependent DNA damage response that mediates the stabilisation of the transcription factor GATA4 that was shown to be necessary for NF- κ B-dependent induction of MCP-1 and its subsequent secretion (501).

2.3.14. SASP, reprogramming and cellular plasticity

The SASP plays a role in embryonic development (94-96) and the reprogramming of cells towards a stem-like phenotype (205,502). However, the SASP can either stimulate or inhibit reprogramming depending on the context. In a mouse model of induced pluripotent stem cells (iPSCs) elimination of senescent cells with the senolytic ABT-263, pharmacological inhibition of NF- κ B or inhibition of IL-6 using an anti-IL-6 antibody, inhibited reprogramming and stem cell generation (502). This senescence-driven reprogramming of cells was shown to be dependent on tissue injury. Consequently, bleomycin-treated cells have increased DNA damage (502) and secrete pro-inflammatory cytokines among which IL-6 is a major driver of cell reprogramming (502). On the other hand, during aging, NF- κ B hyperactivation leads to upregulation of the reprogramming repressor DOT1L, which downregulates genes associated to pluripotency, thereby impairing iPSCs production (503). Moreover, *in vivo* inhibition of DOT1L increases lifespan and ameliorates age-associated features in progeroid mice. Therefore, the precise action of SASP on reprogramming of cells is still poorly understood. Interestingly, it was recently shown that transient exposure to SASP leads to increased regenerative capacity *in vivo* and upregulation of stem cell markers, whereas prolonged exposure to the SASP leads to paracrine senescence and impairment of regenerative capacities (205). This might reflect the dynamic properties of the SASP which at least is divided in two phases: Notch-high, followed by Notch-low phase (504). The first is associated to a TGF- β -dependent SASP with immunosuppressive, fibrogenic and tissue regeneration properties, whereas the latter is associated to a NF- κ B and C/EBP β -dependent SASP with pro-inflammatory, fibrolytic and immune clearance properties. However, in situations where clearance is not achieved, further evolution of the SASP is likely a situation that can stimulate preneoplastic lesions to bypass senescence and acquire stem cell properties, thereby potentiating their transformation (505). Finally, it is also likely that the heterogeneity of SASP composition across different cell

types (506) could impact on the establishment of a micro-environment favourable for cell reprogramming.

2.3.15. Conclusions

The SASP is regulated at multiple levels. First, chromatin remodelling and changes in chromatin folding prime pro-inflammatory genes for activation. Although many histone modifications and non-histone chromosomal proteins have been linked to senescence, it is not yet understood how these processes are initiated. Second, specific transcription factors cooperate to dynamically establish the composition of the SASP. NF- κ B, p53, C/EBP and GATA4 have been identified as key SASP regulators but it is likely that additional players will be identified. Third, the translation of several SASP factors is regulated by TOR signaling in senescent cells (211). Fourth, the trans Golgi network, its components: PRKD1, ARF1 and PI4KIII β and the carrier membrane protein SCAMP4 are upregulated in senescent cells and required for the secretion of several SASP factors (507,508). Finally, genes involved in intracellular trafficking undergo alternative splicing in senescent cells and PTBP1, a regulator of alternative splicing, is required for the pro-inflammatory SASP in senescent cells (509). Further understanding of the molecular mechanism that control the SASP will help to design therapies for its modulation.

Pharmacological agents that decrease the SASP include the antidiabetic drug metformin (352,394), glucocorticoids (393), JAK inhibitors (510), TAK1 inhibitors (104), rapamycin (211), nutlin (447) and trabectedin, an alkaloid isolated from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata* (511). The effects of these drugs have not been systematically studied in all situations associated to senescence. Also, when these drugs are effective, there is little data to support that they acted by suppressing the SASP. On another matter, the ability of senescent cells to act as factories for secretion of biological mediators could eventually be engineered for medical applications.

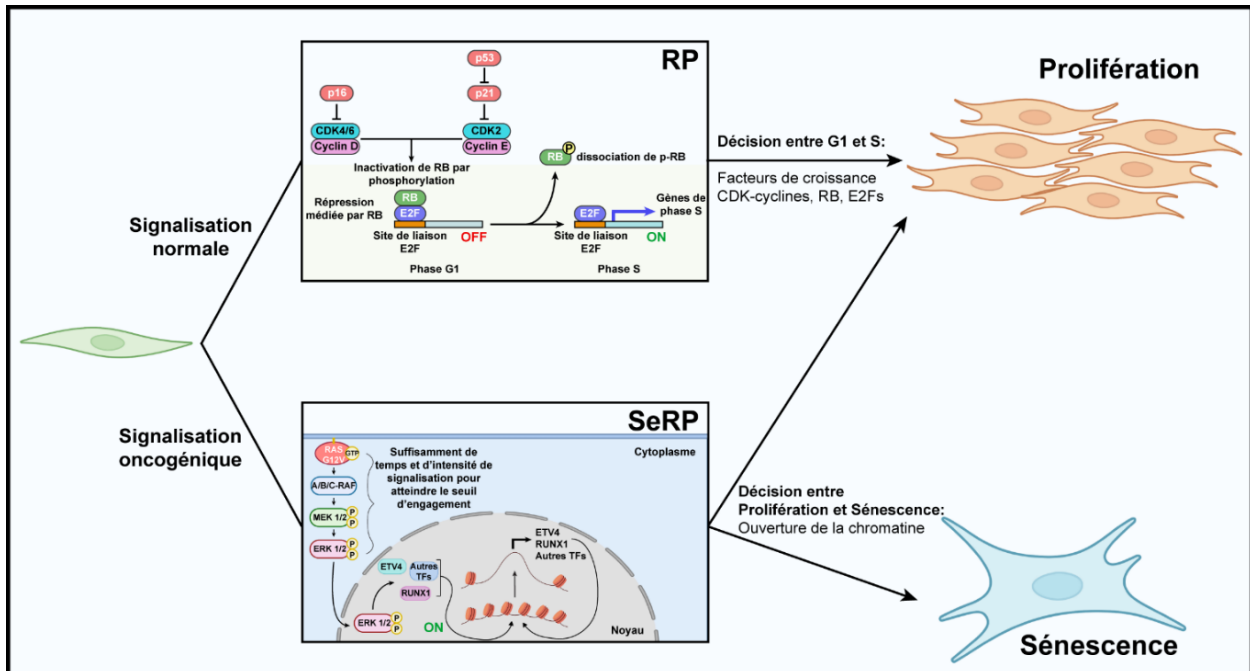
2.3.16. Acknowledgments

This work was funded by grants from the CIHR (Canadian Institute of Health and Research: CIHR MOP11151) and the CCSRI (Canadian Cancer Society Research Institute: 704223) to G.F. G.F. is supported by the CIBC chair for breast cancer research at the CR-CHUM. P.K is supported by a grant from the International Development Research Centre: 108593).

3. Un point de restriction pour l'entrée en sénescence agit sur la chromatine et intègre des signaux oncogéniques

3.1. Mise en contexte de l'article 2

Dans ce deuxième article, nous rapportons la découverte d'un point de restriction vers la sénescence (SeRP), permettant aux cellules de distinguer entre une signalisation normale ou oncogénique par RAS afin de les engager vers la sénescence plutôt que la prolifération cellulaire; un phénomène demeuré inexpliqué depuis la découverte de la sénescence induite par les oncogènes en 1997. Ce SeRP intègre à la fois l'intensité et la durée de la signalisation RAS/MAPK pour compromettre les cellules vers la sénescence selon une dynamique de système bistable semblable à celle observée lors du point de restriction du cycle cellulaire (RP) contrôlant la décision entre progresser en phase S ou demeurer en G1. D'un point de vue moléculaire, ce SeRP est enclenché par l'action des kinases ERK2 en aval de RAS qui vont activer un réseau auto-régulé de facteurs de transcription (TFs) relayant la signalisation RAS/MAPK même en absence du signal initial. Ce réseau de TFs comprenant entre autres ETV4 et RUNX1 va alors induire une augmentation d'accessibilité à la chromatine décisive pour l'engagement vers la sénescence (Résumé graphique 3.1). L'atteinte du SeRP sera ainsi définie par un seuil d'accessibilité à la chromatine. Ces résultats suggèrent que, dans un contexte de tumeurs mutées en RAS, l'utilisation d'inhibiteurs de HDACs en thérapie néoadjuvante avec une chimiothérapie adaptée au cancer d'intérêt, pourrait permettre d'augmenter la pénétrance du phénotype de sénescence dans la tumeur après chimiothérapie.



Résumé graphique 3.1.

3.2. Contribution à l'article 2

L'article 2 de cette thèse représente mon projet principal de doctorat. Ainsi, j'ai conçu toutes les expériences présentées dans cet article et effectué la majorité des expériences incluant la culture cellulaire, les essais de croissance, western-blots, RT-qPCR, immunofluorescences, essais MNase, SA- β -gal et fractionnements cellulaires. J'ai également procédé à l'analyse de tous les résultats et généré tous les graphiques, sauf ceux en Figure 3.1M-N qui ont été réalisés par Arnab Barua. Véronique Bourdeau a effectué les expériences présentées en Figure 3.1I-L et Figure 3.7G, ainsi que des répliques biologiques additionnels pour les Figure 3.2G-H et Figure 3.9. C'est également elle qui a cloné les facteurs de transcription utilisés en Figure 3.4. Marie-Camille Rowell a effectué diverses expériences qui n'ont pas été incluses dans la version finale de l'article et a aidé dans la conceptualisation de certaines expériences. Elle a également apporté de l'aide technique lors d'expériences impliquant le plaquage de multiples conditions. Jordan Guillon a effectué les western-blots en Figure 3.7C,F et Figure 3.12H,I à partir des échantillons que j'avais généré. Paloma Kalegari a répété des western-blots effectués par Jordan avec d'autres répliques biologiques. Arnab Barua et Adrian Serohijos ont effectué les analyses mathématiques afin de trouver une formule décrivant le phénomène de bistabilité observé lors du point de restriction. Vincent Quoc-Huy Trinh et Feryel Azzi étant des pathologistes certifiés, ils ont analysé et effectué la notation (*scoring*) des lames d'immunohistochimie pour ETV4 et RUNX1. Les marquages de ces lames ont quant à eux été effectués par Liliane Meunier et Véronique Barrès de la plateforme de pathologie du CRCHUM. Le manuscrit a été rédigé par Gerardo Ferbeyre et moi, puis révisé par chacun des auteurs.

3.3. Article 2

A senescence restriction point acting on chromatin integrates oncogenic signals

Stéphane Lopes-Paciencia¹, Véronique Bourdeau*², Marie-Camille Rowell*¹, Jordan Guillon¹, Paloma Kalegari¹, Arnab Barua², Vincent Quoc-Huy Trinh^{1,3}, Feryel Azzi¹, Adrian Serohijos², Gerardo Ferbeyre^{1,2}

*These authors contributed equally to this work

In revision in Cell reports

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

²Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

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

Corresponding author: g.ferbeyre@umontreal.ca

3.3.1. Abstract

We identify a senescence restriction point (SeRP) as a critical event for cells to commit to senescence and distinguish normal from oncogenic signaling. Passage through the SeRP shows the hallmarks of a bistable system including positive feedback and hysteresis. The SeRP integrates the intensity and duration of oncogenic stress, keeps a memory of previous stresses and combines oncogenic signals acting on different pathways by modulating chromatin accessibility. Once committed to senescence, cells no longer depend on the initial stress signal and exhibit a characteristic transcriptome regulated by a transcription factor network that includes ETV4, RUNX1, OCT1 and MAFB. Consistent with a tumor suppressor role for this network, the levels of ETV4 and RUNX1 are very high in benign lesions of the pancreas but decrease dramatically in pancreatic ductal adenocarcinomas. The discovery of senescence commitment and its regulation suggest new targets to restore tumor suppression in human cancers.

Keywords: Senescence, Restriction point, Commitment, Oncogenic memory, Chromatin, ERK, ETV4, RUNX1, Pancreatic cancer

3.3.2. Introduction

Cells number is controlled by cell fate decisions between proliferation, quiescence, cell death and senescence. The mechanisms that underpin these decisions are important for normal development, adult physiology and the diseases that involve excessive cell proliferation such as cancer or accumulation of senescent cells as seen in aging. Several extracellular factors have been identified to control cell fate decisions by acting on mitogenic signaling pathways including the well-studied RAS-MAPK signaling pathway. The control of the proliferation-quiescence choice by mitogens is thought to depend on a point of commitment called the restriction point (R) beyond which mitogens are no longer required for proliferation because an endogenous self-sustained mitogenic signal drives cells to the proliferative state (512). Cells that do not accumulate this signal remain in cell cycle stages G1 or G0. The molecular mechanism that explains the actions at the restriction point involves the activation of the cyclin dependent kinases (CDKs) that inhibit the retinoblastoma protein leading to expression of proliferation genes mediated to a large extent by the E2F transcription factor family (513). These discoveries lead to the development of CDK inhibitors as therapeutic agents against cancer (513).

In addition to proliferation, activation of the mitogenic ERK pathway can lead to senescence, cell death or differentiation. However, little is known about the cell intrinsic ERK decoding mechanisms that regulate different cell fate decisions. Previous work established that moderate ERK signaling stimulates proliferation whereas excessive signaling triggers a senescence response (57,108). Here, we took advantage of conditional expression of oncogenic RAS to discover that the proliferation-senescence decision is controlled by a senescence restriction point (SeRP) beyond which RAS-ERK signals are no longer required to maintain senescence engagement. At the molecular level, sustained and high ERK signaling engages a transcription factor network that leads to chromatin opening and expression of pro-inflammatory genes. This chromatin opening seems to act as a memory print of oncogenic stresses that facilitates oncogene-induced senescence (OIS) in primary cells. As different oncogenes stimulate chromatin opening via dissimilar mechanisms, this model predicts that oncogenes can collaborate to induce senescence, changing the current paradigm on oncogene cooperation in malignant transformation. Consistent with a key role for transcription factors in mediating senescence commitment, inactivation of certain TFs identified in this study reverted key senescence-associated gene

expression changes, while their overexpression was sufficient to drive senescence. Accordingly, two of these transcription factors, ETV4 and RUNX1, were highly expressed in benign lesions of the pancreas which are known to contain senescent cells (23,25) and strikingly downregulated in pancreatic adenocarcinomas. This suggests that the SeRP could be important for the tumor suppressor program occurring in early pancreatic carcinogenesis *in vivo*. We thus propose a new paradigm to look at senescence as an epigenetically controlled response that integrates signals from different oncogenes by increasing chromatin opening.

3.3.3. Results

3.3.3.1. The Senescence Restriction point (SeRP) depends on duration and intensity of oncogenic signaling

In order to investigate how the dynamics of ERK signaling controls the entry into senescence, we expressed the ligand binding domain of the estrogen receptor (ER) alone or fused to an oncogenic allele (G12V) of HRAS (ER-RAS) in normal human diploid fibroblasts (NHDF) IMR90. The ER-RAS allele renders RAS-MAPK signaling conditional to treatment with 4-hydroxytamoxifen (4OHT), allowing modulation of intensity and duration of signaling. Thus, we first varied the time of ERK stimulation to determine for how long ERK signaling is required to commit cells to senescence (Figure 3.1A). We found that stimulation of RAS-MAPK signaling with 4OHT for 3 days or more engaged the cells to a stable proliferation arrest while shorter stimulation did not (Fig 1B). Of note, after 3 days of stimulation, cells were negative for senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining (Figure 3.1C), had a moderate induction of p21, a slight reduction of the E2F target MCM6 (Figure 3.1D) and no signs of DNA damage response (DDR) higher than control cells (Figure 3.1E). However, cells induced for 3 days or more were SA- β -Gal positive six days after ending ERK stimulation while cells induced for 1, 1.5 or 2 days were not (Figure 3.1F). These cells also had a strong induction of p21 and reduction of MCM6 (Figure 3.1G) indicating that they are fully senescent. Put together, these results define a precise time window where cells are still negative for senescence markers but already engaged towards senescence and suggest that DDR activation occurs downstream of this commitment point. Similar results were reproduced in MRC5, another NHDF cell line (Figure 3.7).

In addition to duration of signaling, the strength of signaling can control cell fate decisions after ERK stimulation (107,514). To investigate the interplay between duration and intensity of

signaling, we varied the strength of ERK signaling through the ER-RAS system by using different concentrations of 4OHT. We found that the commitment to senescence required concentrations above 32 nM of 4OHT for 3 days (Figure 3.1H-J). However, upon longer time of stimulation, weaker signals also induced senescence (Figure 3.1K-L). Therefore, cells integrate both duration and intensity of ERK signaling to commit to cellular senescence (Figure 3.1M-N). The dynamics of commitment as a function of the duration and amplitude of the initial input fits a model of a bistable system controlled by both signaling intensity (Hill coefficient $n=4.57$) and signaling time (Hill coefficient $m=7.06$) (Figure 3.1N). Bistable switch-like responses were previously described for the commitment to maturation in frog oocytes after a transient activation of the ERK pathway (515) and implies that the system becomes ultrasensitive to small changes in the regulatory signal when a certain threshold is attained. A hallmark of this behaviour is an increase in the variance during the transition point between the two states (516) as seen in the inserts of Figure 3.1J and L.

To confirm the essential role of ERK kinases during the commitment window following ER-RAS activation with 4OHT, we used the ERK inhibitor SCH772984 (ERKi) or the MEK inhibitor AZD6244 (MEKi). As expected, both drugs prevented the commitment to senescence after ER-RAS activation when co-treated with 4OHT for 3 days (Figure 3.8A-C). However, cells committed to senescence after 3-4 days of ERK activation remained committed even if ERK signaling was brought back to basal levels (ERKi or MEKi) thereafter (Figure 3.8D-G). Thus, we concluded that oncogenic ERK signaling needs to be maintained long enough to trigger the senescence commitment checkpoint beyond which ERK activation is no longer essential to induce senescence. Together, these results define a senescence restriction point (SeRP) that can help to distinguish between signals that are physiological and transient from those potentially pro-cancer coming from mutant oncoproteins.

3.3.3.2. Memory and integration of aberrant signaling

Bistable systems respond to stimuli depending on their history, a phenomenon known as hysteresis (517). For this reason, we next investigated if cells retain a trace of aberrantly high RAS-MAPK activation. We induced ER-RAS in short pulses of 24h separated by 3 days of release that included replating the cells. Senescence was induced by 3 days of consecutive RAS activation as before or by 3 days of cumulative RAS activation (3 pulses of 24h), but not by 2 pulses of 24h, indicating that cells remember aberrant ERK signaling for several days after the initial stimulation

(Figure 3.2A-C). Since RAS-induced senescence is a tumor suppressor response (4), a memory of aberrant signaling is important to trigger senescence even when negative feedbacks are activated to tune down the pathway (106). More importantly, this memory implies a molecular trace of aberrant signaling and therefore the opportunity to integrate different oncogenic signals to induce senescence.

To investigate whether aberrant ERK signaling combines with additional oncogenic stimuli to induce senescence, we activated ERK using ER-RAS in MYC-expressing cells (Figure 3.9A). As before, 3 days of RAS activation triggered growth arrest and senescence in control cells that do not express MYC. Importantly, activating ER-RAS for only one or two days in MYC-expressing cells also induced a lasting growth arrest accompanied by a characteristic hypertrophic morphology of senescent cells, an increase in p21 and a concomitant decrease in phospho-H3 levels (Figure 3.9B-D), indicating that ERK and MYC oncogenic signaling can add up to trigger the SeRP. Of note, MYC overexpression initially induced a mix of proliferation, cell death (visually assessed but not quantified) and senescence, as cells became sensitive to the senolytic agent ABT-263 (Figure 3.9B). Also, ABT-263 had no effect on ER-RAS Vector cells even after 3 days of 4OHT treatment, confirming that committed cells are not yet senescent (Figure 3.9B). Intriguingly, RAS and MYC cooperation for senescence induction was not dependant on an increased intensity of ERK activation (Figure 3.9C). Instead, MYC overexpression importantly reduced basal ERK signaling. Interestingly, bringing back ERK activation to only half of its normally basal levels by addition of 4OHT in MYC cells was sufficient to trigger and hasten the SeRP. This result suggests that integration of oncogenic signals occurs downstream of ERK, probably at the chromatin level.

Since both MYC and ERK signals converge at the chromatin to activate transcription (518,519), we next looked at the relationship between chromatin opening and senescence commitment. Using MNase assays, we found a sudden increase in chromatin opening just before the time of commitment (Figure 3.2D-E). Interestingly, treating cells with the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate (NaBu) shortened the commitment window of ER-RAS cells (Figure 3.2F-H) from 3 days to 1 day of signaling without affecting the expression of the transgene (Figure 3.2I). Moreover, this was associated with an earlier opening of the chromatin (Figure 3.2J-K). This suggested an active role of chromatin opening in mediating commitment to senescence. We previously showed that inactivating ERK2 bypassed RAS-induced senescence allowing malignant

transformation (108). Interestingly, addition of NaBu during the transformation of primary cells by RAS activation and ERK depletion (shERK2) restored senescence and inhibited transformation. NaBu alone did not induce senescence in control vector cells, neither in cells transformed by E1A and RAS (Figure 3.2L-O) and therefore is not acting as a non-specific senescence inducer. Thus, we conclude that the tumor suppressor role of ERK2 in RAS-induced senescence depends, at least in part, on its ability to mediate chromatin opening. In other words, chromatin opening can substitute for excessive ERK signals to suppress RAS-dependent transformation.

To further support a role for chromatin opening in the commitment at the senescence restriction point, we looked at the chromatin in cells that committed earlier to senescence due to combined expression of MYC and RAS. We found that cells expressing both RAS and MYC have a more open chromatin than cells expressing each oncogene alone (Figure 3.9E-F). Initial studies in murine fibroblasts concluded that Ras and Myc cooperate to transform primary cells (520). However, this cooperation was later shown to be dependent on p53 inactivation to avoid Myc-induced apoptosis (521). We next interrogated 90,354 samples from 87,240 cancer patients in the cBioPortal for KRAS and MYC mutations. The data shows that KRAS and MYC alterations (mutations and amplifications) preferentially exclude each other as is expected by signals that cooperate to trigger a senescence tumor suppressor response (Figure 3.9G). Taken together, the data suggest that commitment to senescence depends on the integration of intensity and duration of oncogenic signals, *e.g.* RAS \pm MYC at the chromatin (Figure 3.2P).

3.3.3.3. The transcriptome of senescence-committed cells reveals a transcription factor network that regulates senescence

Since the commitment to senescence was linked to the state of the chromatin, we next sought to identify the transcription factors acting downstream of ERK signaling that regulate the process. Thus, we compared the transcriptome of cells where the RAS-ERK pathway was stimulated for 30 hours (uncommitted; 1.5 days) with the one from cells stimulated for 72 hours (committed; 3 days). Clustering of gene expression using the top 100 most significant genes revealed a clear distinction between cells where RAS-ERK signaling was activated for 1.5 days vs cells stimulated for 3 days (Figure 3.3A). Inter- and intragroup variability was assessed both by calculating Pearson's correlation coefficients (Figure 3.10A) and by principal component analysis (PCA) (Figure 3.10B), showing that the gene expression pattern clearly differs between

uncommitted and committed cells. The most significant differentially expressed genes are summarized in Figure 3.3B. Functional annotation of gene expression changes using GSEA and DAVID revealed that the major differences between committed and uncommitted cells concerned factors related to the pro-inflammatory secretome associated to senescence (SASP) (Figure 3.3C,F and Figure 3.10C-E). Intriguingly, this SASP wave seemed to be temporally centered around the time of commitment (Figure 3.10F-G). Furthermore, among the main signatures for downregulated genes in committed cells was centromere/condensed chromosome (Figure 3.3E), suggesting decondensation and increased chromatin accessibility as observed in Figure 3.2. Also, committed cells have a reduced expression of genes involved in cell division (Figure 3.3E) and high expression of genes in cytokine signaling and metabolism (Figure 3.3D,F).

GSEA revealed that uncommitted cells seemed to rely on an SRF-dependent transcription known to induce immediate early genes such as FOS, whereas committed cells seemed to rely on an AP1-dependent transcription (Figure 3.3G-H). Multiple transcription factors likely controlling these gene expression changes were identified using the bioinformatics platform DIRE (Figure 3.3I-J). Among them, NF κ B (414), C/EBP (194,425), AP1 (339) and ETS (130) were already linked to senescence. We validated the activation of NF κ B using immunoblots for phosphorylated p65 (Figure 3.3K) and the expression of several cytokine genes by RT-qPCR (Figure 3.3L). To study the role of the transcription factors linked to commitment, we next interrogated the effects of their overexpression or inactivation on the senescence program. The overexpression of four of these transcription factors, namely ETV4, RUNX1, OCT1A and MAFB, induced a growth arrest (Figure 3.4A) and multiple senescence biomarkers such as increased SA- β -Gal, p53, RB activation, PML bodies and SASP, without DNA damage accumulation (Figure 3.4B-G) in normal human fibroblasts IMR90. Interestingly, these factors were all individually sufficient to promote chromatin opening 3 days after their enforced expression in primary fibroblasts (Figure 3.4H-J), suggesting they could play an active role in chromatin opening during the SeRP. Of note, chromatin alterations are known to activate ATM and therefore the p53 pathway in the absence of DNA damage (522-524). It is worth mentioning that the failure to induce senescence by some transcription factors when overexpressed alone may be due to the lack of partners or post-translational modifications. Nevertheless, the data is consistent with the activation of a core regulatory network of TFs including but probably not limited to ETV4, RUNX1, OCT1A and MAFB, that initiate senescence (Figure 3.10H-I). Genes coding for inflammatory cytokines have

promoter binding sites for many of these transcription factors (Figure 3.10H, J-K) explaining why they dominate the differential gene expression profile between committed and non-committed cells. Individual knockdown of these transcription factors reduced the expression of many cytokine genes (Figure 3.10L) but did not totally prevent growth arrest (not shown), suggesting that they act as a network.

3.3.3.4. Commitment correlates with chromatin enrichment of transcription factors regulating senescence

The dynamics of cells transitioning to a commitment point is consistent with bistable switch mechanisms previously described for oocyte maturation (515) and the mammalian cell cycle restriction point (525). The latter depends on positive feedback regulation of the E2F family of transcription factors. Thus, we next sought to find evidence of sustained expression of the transcription factors we found regulating the commitment to senescence. At the mRNA level, only MAFB expression increased by the time of commitment (Figure 3.5A). On the other hand, protein levels of ETV4, RUNX1, OCT1 and MAFB increased in chromatin fractions at the time of commitment and remained so, up to 11 days after, when cells were fully senescent (Figure 3.5B). The levels of ETV4 and RUNX1 in whole cell lysates did not change at the time of commitment indicating that increased binding to chromatin of senescence-regulating transcription factors links ERK signaling to senescence commitment (Figure 3.5C). Moreover, the levels of both ETV4 and RUNX1 increased at post-commitment times both at the protein and mRNA levels (Figure 3.5C-E), suggesting that self-sustaining regulatory loops like those described for the E2F factors maintain cells committed to senescence. We also looked at the localization of ETV4 and RUNX1 in cells that entered RAS-induced senescence and found an increase in their nuclear localization in comparison with control growing cells (Figure 3.5F-G). In cultures of senescent cells, 35 days post-induction of oncogenic RAS expression, some cells spontaneously escape from senescence and regrow. Interestingly, these cells lost the ability to sustain both ETV4 and RUNX1 levels (Figure 3.5C) suggesting that combined loss of the expression of senescence regulatory transcription factors may underpin the escape from senescence and malignant transformation.

In multiple cancers ETV4 and RUNX1 are upregulated (526,527) raising the question about how senescence is avoided in those tumors. To get insights into the mechanisms that bypass senescence in cells expressing core senescence transcription factors, we used the oncoproteins E6

and E7 from human papilloma virus to disable the p53 and the RB tumor suppressor pathways (219). Both in IMR90 and MRC5 fibroblasts, either E6 or E7 was sufficient to revert the senescent phenotype. However, E6 had a stronger effect than E7 to inhibit the growth arrest induced by ETV4 (Figure 3.11A-D), suggesting a more important role of p53 activation in maintaining ETV4-induced growth arrest. Also, E6 or E7 alone were less efficient than the combination to revert the senescent phenotype (Figure 3.11A-H), highlighting ETV4 capability to activate both pathways.

3.3.3.5. ETV4 restores senescence in cells that escape from therapy-induced senescence

Although senescence is disabled in cancer cells, the process can be restored by anticancer chemotherapy. This therapy-induced senescence (TIS) is a double edge sword because in some cases it fuels the emergence of malignant clones that are resistant to chemotherapy (528). We next asked whether ETV4, acting as a core senescence transcription factor, can restore senescence in cells that escaped from it. Thus, we first induced senescence in the pancreatic cancer cell line KP4 using the drug combination known as Folfirinox (5-FU + Sn38 + Oxaliplatin). Then, we observed cells that circumvented FIS (Folfirinox-induced senescence) 16 days after cessation of treatment (Figure 3.12A). Active FIS was characterized by increased SA- β -Gal, p21, phospho-ERK, ETV4, RUNX1 and DNA damage (Figure 3.12B-D). Interestingly, the expression levels of ETV4, RUNX1 and phospho-ERK were increased during the senescent phenotype and returned to basal levels in cells that escaped from FIS (Figure 3.12C). We then increased ETV4 expression in escapers cells and control cells and re-challenged them with Folfirinox (Figure 3.12E). As before, Folfirinox induced senescence in control cells but less so in escapers, which became resistant to it. However, upon expression of ETV4 in escapers cells, the response to Folfirinox was partially restored, since many cells re-entered senescence and fewer cells escaped from it (Figure 3.12F-I).

3.3.3.6. ETV4 and RUNX1 are highly expressed in premalignant lesions of the pancreas and downregulated in pancreatic adenocarcinomas

In order to study whether the transcription factor network that mediates commitment to RAS-induced senescence in human fibroblasts plays a role *in vivo* in human cancers, we chose to study pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). PDAC are initiated by KRAS mutations, and the process of OIS acts as an initial barrier for the progression of these tumors. Low grade dysplasia of these tumors, known as pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN 1-2) or low-grade intraductal

papillary mucinous neoplasm (IPMN), contain senescent cells that disappear when they progress to higher grade dysplasia such as PanIN 3, high-grade IPMN and PDAC (25,26,529,530). Consistent with the presence of senescent cells in low grade precursors, we found that both ETV4 (Figure 3.6A-C) and RUNX1 (Figure 3.6D-F) were highly expressed in the nucleus of low grade IPMN and PanIN cells. Interestingly, for ETV4, similar cytoplasm-to-nucleus translocation was observed from normal to low grade dysplasia, as found in vitro from vector to RAS cells. As lesions progressed into high grade dysplasia, both ETV4 and RUNX1 levels were attenuated. Finally, PDAC samples had almost a complete loss of signal of both TFs. Of note, loss of ETV4 and RUNX1 was even more pronounced in poorly differentiated (PD) PDAC, which are more aggressive lesions, compared to well-differentiated (WD) PDAC. In addition, ETV4 nuclear localization was lost upon progression to PDAC. These results are consistent with the model that senescence and its regulators act as a barrier for cancer progression which is counterselected during tumor progression.

3.3.4. Discussion

Cells must distinguish normal signaling from aberrant signaling in order to decide their fate. Senescence is a lasting cell proliferation arrest accompanied with the expression of many signaling molecules that activate the immune system for the elimination of stressed and potentially oncogenic cells. We show here that cells possess a built-in mechanism that we called the senescence restriction point (SeRP) to integrate signals that can potentially trigger a malignant transformation. Once cells pass this restriction point, they are committed to enter senescence. The transition through the SeRP is a switch-like response implemented by integrating both intensity and duration of oncogenic signaling. This double control over the SeRP allows cells to better distinguish normal signaling from oncogenic signaling.

The transition through the SeRP has several hallmarks of ultrasensitivity. Several cellular decision mechanisms are also governed by ultrasensitive bistable switches including oocyte maturation in frogs (515) and the cell cycle restriction point (525). At the molecular level, bistable switches are characterized by positive feedback loops that ensure a self-sustaining response once a threshold is attained (525). The cell cycle restriction point is based on positive feedback loops regulating the activity of the E2F transcription factors. We discovered here that RAS-induced senescence occurs in response to sustained activation of a network of TFs including ETV4,

RUNX1, OCT1 and MAFB which are each individually sufficient to trigger senescence and are required for the expression of several senescence associated genes. Another transcription factor, AP1, was proposed to organize the enhancer landscape of senescent cells and therefore the transcription factor network that regulates the process (339). We also found AP1 as a key regulator of genes expressed at the time of commitment but failed to induce senescence by overexpressing either FOS or JUN, likely because both factors need to be overexpressed simultaneously. Studies on the commitment of cells for differentiation often identify so called master regulator transcription factors such as GATA-1, which determines the erythroid cell fate (531). However, by analyzing the expression dynamics of GATA-1 and PU.1 in erythroid and granulocytes progenitors, it was clear that these transcription factors could not initiate lineage commitment and that they were acting by stabilizing a choice made before (532). Similarly, the transcription factors p53 and RB are often considered master regulators of senescence since loss of genes acting on their signaling pathways prevents the process (533,534). However, this genetic evidence is also consistent with a model where p53 and RB pathways act by stabilizing a cell fate already specified by other transcription factors. By defining a SeRP point and analyzing the transcriptome of cells that just passed this point, we inferred the transcription factor network acting upstream of p53 and RB to regulate senescence. The individual inactivation of these transcription factors did not totally inhibit the process likely because the lack of a single factor can be compensated by others in the network. A similar model was proposed to explain myeloid differentiation by a network of TFs identified by transcriptome analysis after the observation that their individual knockdown was not sufficient to prevent differentiation (535).

One intriguing observation in our studies is that cells can remember previous events of aberrant ERK signaling or integrate oncogenic signals from RAS and MYC oncogenes. These signals did not converge at the level of ERK activation but downstream of it and they cooperate to increase chromatin accessibility. Without a mechanism for integrating oncogenic signals, cells may fail to trigger senescence when combinations of mutations activate moderately signaling pathways that together can mediate transformation but individually are not strong enough to trigger senescence. The memory of oncogenic threats also allows the senescence commitment point to still be effective even if these threats do not act simultaneously.

We identified transcription factors that are sufficient to trigger senescence, indicating that they are critical to commit aberrantly stressed cells to senescence. The core transcription factors for senescence commitment in response to oncogenic RAS we identified here (ETV4, RUNX1, OCT1 and MAFB) and others identified in other laboratories, AP1 (339), NFκB (414,428), ETS (130) and STAT5 (536) are often upregulated in human cancers. We propose that their pro-senescence role is linked to their action in recruiting chromatin openers which disrupt the functions of the heterochromatin (310,537) and activate the expression of tumor suppressors that execute senescence, that is, p53 (522-524) and RB (452,538,539). Cancers may avoid the pro-senescence activity of the transcription factor network by reducing their expression as shown here, disabling tumor suppressors acting downstream or by counteracting chromatin opening. Consistent with our proposed role for chromatin opening controlling the SeRP, several histone acetyl transferases (269,327,328) and histone demethylases are required for senescence (319,539). On the other hand, several transcriptional repressors can inhibit senescence and are among the most powerful oncogenes found in human cancers (317,538,540,541). This raises the question whether cancer cells avoid triggering the SeRP by disabling their ability to keep a memory of oncogenic threats through modulation of chromatin opening. Our work suggests that epigenetic therapies leading to chromatin opening could restore the senescence tumor suppressor mechanism in human cancers.

3.3.5. Acknowledgements

We thank Jennifer Huber from the IRIC Genomics Platform and Patrick Gendron from the IRIC Bio-informatics platform for RNA-Seq and downstream processing of data. We also thank Liliane Meunier and Véronique Barrès from the Pathology platform at the CRCHUM for immunohistology staining of ETV4 and RUNX1. Sample and data banking activities were carried out in collaboration with the Cancer Research Network (Fonds de la Recherche du Québec-Santé affiliated with the Canadian Tissue Bank Network (CTRNet)). S.L.P. is supported by FRQS (Fonds de Recherche du Québec-Santé) and the CIHR (Canadian Institutes of Health Research). SLP, MCR, JG and PK were supported by funds from the Institut du cancer de Montréal and the Défi Canderel. G.F. is supported by the CIBC chair for breast cancer research.

Funding: Work was supported by CIHR MCC 419348.

3.3.6. Contributions

S.L.P. designed the experiments and performed most of the experiments, including: cell culture experiments, growth assays, western blots, RT-qPCR, immunofluorescence, MNase assays, SA- β -gal, chromatin fractionation and data analysis. V.B. performed experiments in Figure 3.1I-L and Figure 3.7G, additional biological replicates for Figure 3.2G,H and Figure 3.9, and cloned TFs used in Figure 3.4. M.C.R. performed experiments which were not included in the final version of this article and helped design and perform cell culture experiments. J.G. performed western-blots with samples generated by S.L.P. for Figure 3.7C,F and Figure 3.12H,I. P.K. repeated western-blots performed by J.G. with other biological replicates. A.B. and A.S. did the mathematical analysis of bistability. V.Q.H.T. and F.A. (pathologists) analyzed and scored IHC in Figure 3.6. S.L.P. and G.F. wrote the manuscript. All authors revised the final manuscript.

3.3.7. Material and methods

Reagents

4-Hydroxytamoxifen (4OHT) was purchased from Sigma. SCH772984 (specific ERK1/2 inhibitor), AZD6244 (Selumetinib - selective MEK inhibitor), Oxaliplatin, 5-FU and Sn38 were all purchased from Selleckchem (via Cedarlane, Burlington, ON). Sodium butyrate was purchased from Alfa Aesar Fisher Scientific.

Plasmids

Retroviruses pBABE, pBABE-H-RasV12, pBABE-ER, pBABE-ER-RAS, pLXSN, pLXSN-E6, pLXSN-E7, pLXSN-E6/E7 were described previously (219). MLPXneo backbone used to clone the following shRNAs (NTC, ETV4, RUNX1, OCT1A, MAFB, ERK2) was generated by subcloning the Neo/Kan resistance cassette from MSCVneo into AgeI/ClaI restrictions sites in MLPpuro. These shRNAs were cloned following (542) protocol and using XhoI/EcoRI restrictions sites. Retroviral pWZL and pWZL-MYC plasmids were a gift from S. W Lowe. Plasmids for overexpression of TFs were either cloned from cDNA originating from IMR90 ER-RAS at Day3 of 4OHT treatment or from vectors acquired from Addgene into the MSCVhygro backbone. Thus, MAFB (NM_005461), EHF (NM_012153), cFOS (NM_005252), THRB (NM_000461) and OCT1A (NM_002697) were cloned from above mentioned cDNA into the following restriction sites in the MSCVhygro backbone: BamHI/NotI (MAFB), NotI/XhoI (EHF),

BamHI/XhoI (cFOS), NotI/XhoI (THRB) and XhoI/HpaI (OCT1A). As for the others, RUNX1 was subcloned from Addgene's EF1a_RUNX1_P2A_Hygro_Barcode (Plasmid #120475) into BsaA1/NotI restrictions sites. ETV4 was subcloned from Addgene's ETV4_pet28a (Plasmid #131645) into BamHI/NotI restrictions sites. cJUN was subcloned from Addgene's pMIEG3-c-Jun (Plasmid #40348) into BamHI/XhoI restrictions sites. Finally, GATA1 was subcloned from Addgene's hGATA-1 WT (Plasmid #118352) into NotI/XhoI restrictions sites. For PCR primers used for cloning see Supplementary Table 3.1.

Cells and viral gene transfer

Phoenix amphi packaging cells were a gift from S. W Lowe. HEK-293T cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). KP4 were a gift from N. Bardeesy. IMR90 were obtained from Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ). MRC5 were a gift from F. Rodier. All cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM #319-015-CL; Wisent) and supplemented with 10% FBS (FBS, Cat.no. 12483020 Gibco for Phoenix, HEK293T and KP4; or FBS Premium, Cat.no. 091-150 Wisent for IMR90 and MRC5), 1% penicillin/streptomycin sulfate (Cat.no. 450-201-EL, Wisent) and 2 mM L-glutamine (Cat.no. 609-065-EL, Wisent).

Retroviral-mediated gene transfer was done as previously described (108), but doing only one round of infection with either half a viral-soup or a quarter of a viral-soup. The viral soups were then filtered with a 0.45 μm filter, supplemented with 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of polybrene (Sigma) and poured on target cells. Twenty-four hours after infection, media was changed and thirty hours after infections, cells were selected using the following Wisent-purchased antibiotics: puromycin dihydrochloride (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in IMR90/MRC5 and 2.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in KP4) and/or hygromycin (37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in IMR90/MRC5 and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in KP4) and/or G418 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in IMR90/MRC5).

Chromatin fractionation

Chromatin-bound proteins were obtained using the protocol in (543). For each condition in IMR90 cells, 2x 10cm plates at 80% confluency were used. Briefly, cells were washed once in PBS and then harvested by scraping in 1mL of ice-cold PBS. Cells were next spined down at 130 x g for 3 minutes at 4°C and supernatant was discarded. Cell pellet was resuspended by pipetting up and down 5 times with 5 volumes of ice-cold E1 buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM

NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 10% glycerol, 0.5% NP-40, 0.25% Triton X-100, 1 mM DTT and 1x protease inhibitor cocktail) for 1 volume of cell pellet. Cells were spined down at 1100 x g for 2 minutes at 4°C and supernatant (cytoplasmic fraction) was transferred into a separate tube. Cell pellet was resuspended once again in the same volume of E1 buffer and spined down at 1100 x g for 2 minutes at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended for a last time in the same volume of E1 buffer prior to a 10 minutes incubation on ice. Cells were once again spined down at 1100 x g for 2 minutes at 4°C and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 2 volumes of ice-cold E2 buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.5 mM EGTA pH 8.0 and 1x protease inhibitor cocktail). Cells were spined down at 1100 x g for 2 minutes at 4°C and the supernatant (nucleoplasmic fraction) was transferred into a separate tube. As with the E1 buffer, the cell pellet was washed once again with 2 volumes of E2 buffer, spined down and then re-incubated a last time for 10 minutes on ice with the E2 buffer prior to centrifugation at 1100 x g for 2 minutes at 4°C. Supernatant was discarded once again. The pellet (chromatin fraction) was carefully resuspended with 5 volumes of ice-cold E3 buffer (500 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and 1x protease inhibitor cocktail) per cell pellet volume (enough for a sonication probe), making sure not to lose the pellet as it is sticky. Cells were sonicated for 5 minutes, 15 sec ON / 15 sec OFF at 20% of maximum power using a FB120 sonicator (Fisher Scientific) with a CL-18 probe. All cellular fractions for each condition were next spined down at 16,000 x g for 10 minutes at 4°C and supernatant was transferred into new tubes. Protein concentration was assessed using Pierce BCA Protein Assay kit and plates were read with a spectrophotometer at 562nm.

Western-blot

Western-blot were performed as previously described (219). For antibodies see Supplementary Table 3.2.

MNase assays

For each condition, 2-10x10⁶ cells (for IMR90: 1x 10cm plate at ±90% confluency with or without hyperproliferation) were pelleted at 500 x g for 5 minutes at room temperature. It is important to know the exact number of cells at this step, in order to adjust the quantity of enzyme later to ensure the same ratio of enzyme unit per cell between each condition for this assay. Cells were then washed once in PBS and pelleted once again at 500 x g for 5 minutes at room

temperature. For each condition, cells were crosslinked by resuspending the cell pellet in 10mL of 1% formaldehyde in PBS and tumbled end over end for 10 minutes at room temperature. Crosslinking reaction was stopped by adding 30mL of 1M Tris-HCl pH 8.0 to a final concentration of 750mM agitating by tumbling for 2 minutes at room temperature. Cells were next pelleted at 750 x g for 5 minutes at room temperature, resuspended in PBS to wash and re-pelleted once again at 750 x g for 5 minutes at room temperature. Cells were next resuspended in 1mL PBS and transferred in an eppendorf before centrifugating at 750 x g for 5 minutes. The supernatant was then discarded before flash freezing the cell pellet in liquid nitrogen. Pellets were kept at -80°C until ready to proceed further. For MNase digestion, the cell pellet was resuspended in PBS + 0.1% Triton X-100 + 1mM CaCl₂ in order to get 1x10⁶ cells per 200µL and incubated for 2 mins at room temperature. Then, 0.5U of Micrococcal nuclease (Cat.no.88216, Thermo Scientific) was added per million cells in the resuspended cells and digestion tube was incubated at 37°C. After 5 minutes, 200µL of the digestion tube was transferred in new eppendorfs tubes containing final concentrations of 10mM EDTA and 5mM EGTA, and these tubes were kept on ice while processing next conditions in order to halt the reaction. The samples were then adjusted to 0.5% SDS and 10 mM Tris-HCl pH 8.0. Samples were then incubated with RNase 1X (Roche) for 30 minutes at 37 °C, then with 400µg/mL of Proteinase K (NEB) for 120 minutes at 55 °C, and then incubated at 65 °C for 60 minutes to reverse crosslinks. DNA was then recovered by phenol-chloroform extraction followed by ethanol/sodium acetate precipitation. Briefly, one volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (Sigma) was added to each sample and the tubes were inverted thoroughly by hand for ± 20 seconds. Samples were centrifuged for 5 minutes at 16,000 × g at room temperature. The upper phase was carefully pipetted and transferred to a fresh tube. Then, 0.1 volume of 3M Sodium Acetate pH 5, 2 volumes of 100% Ethanol and 10µg of glycogen (ThermoFisher Scientific, Cat.no. R0551) were added to each tube and quickly vortexed. Samples were chilled at -20°C for 30 minutes and then spined at 4°C at 16,000 x g for 10 minutes. Supernatant was discarded and pellet was washed with 750µL of cold 70% EtOH prior to centrifugation at 4°C at 16,000 x g for 5 minutes. Supernatant was again discarded and the pellet was air dried for ±10 minutes before dissolving it with a 1 mM Tris-HCl pH 8.0 and 0.1 mM EDTA solution. Samples were resolved on a 1.5% agarose gel and visualized with ImageJ software to quantify mononucleosomes (band at ±146 bp), heterochromatin (>1500bp smear) and total DNA

intensity for each lane. Percentage of net chromatin opening was obtained by normalizing the intensity (I) of the mononucleosome band on heterochromatin band for each lane.

$$\% \text{ net chromatin opening} = \frac{\text{Opening}}{\text{Closure}} = \frac{\frac{I_{mono}}{I_{total}} \times \frac{1}{U_{enz}/I_{tot}}}{\frac{I_{1.5kb+}}{I_{total}} \times \frac{1}{U_{enz}/I_{tot}}} = \frac{I_{mono}/U_{enz}}{I_{1.5kb+}/U_{enz}} = \frac{I_{mono}}{I_{1.5kb+}}$$

Cell proliferation assay

Proliferation and colony assay (assessed by a crystal violet retention assay) were performed as previously described (219). Briefly, cells (10,000-15,000 cells for IMR90 / MRC5 and 20,000 cells for KP4) were plated in several 12-well plates with 3 technical replicates for each of the 3 biological replicates. One plate of each condition was fixed by a 10 minutes incubation at room temperature with a 1% glutaraldehyde solution in PBS 1X and then washed in PBS the day following first plating to serve as a normalizer Day 0. Other plates were then fixed at indicated time-points according to each experimental design. During growth assays, media was replaced every 2-3 days. After fixation of all time points, cells were stained with 0.1% crystal violet in PBS for 30 mins at room temperature under agitation. Crystal violet solution was then removed and plates were washed in tap water 15 times, until no more crystal violet could dissolve in water. Plates were then dried at room temperature for at least 24h. To assess growth, crystal violet was dissolved in 10% acetic acid in water for 20 mins under agitation. Dissolved crystal violet solution was then transferred in 96-wells plates and OD was measured at 590nm. In order to avoid saturation of dissolved crystal violet, twice or thrice the volume of 10% acetic acid was used for very confluent wells; and OD values were multiplied with according factor. OD values were finally normalized on values at Day 0 for each condition, before normalizing on experimental internal control.

SA-β-gal assay

For IMR90 and MRC5, cells were washed with PBS and then fixed in 0.5% glutaraldehyde in PBS for 15 mins at room temperature 4-5 days after plating. Cells were then rinsed twice with PBS and incubated twice for 10 mins in PBS at pH 6.0 with 1mM MgCl₂. This solution was then replaced by the pre-warmed and pre-filtered (0.45μm) staining solution (PBS pH 6.0, 1mM MgCl₂,

1mg/mL X-Gal, 5mM potassium ferricyanide and 5mM potassium ferrocyanide) and cells were incubated for 1-6 hours at 37°C protected from the light. For KP4, we used the same protocol except for the staining solution which is prepared in milli-Q water rather than PBS and contains 40mM citric acid, 40mM Sodium Phosphate Monobasic pH 6.0, 150mM NaCl, 200mM MgCl₂, 1mg/mL X-Gal, 5mM potassium ferricyanide and 5mM potassium ferrocyanide. For all SA-β-gal assays, reactions were stopped by replacing the staining solution with 100mM Tris-HCl pH 8.0. Pictures were taken with an Evos XL Core light microscope (AMEX1000 from Invitrogen).

Immunohistochemistry

Tissues were cut into 4μm slides. After normal deparaffinization, tissues were stained using the Benchmark XT automated stainer (Ventana Medical Systems, Roche). Antigen retrieval was then performed using Tris-EDTA buffer, pH 7.8 (Cell Conditioning #1 solution from Ventana Medical System Inc.) for 60 mins at 95°C. Slides were then incubated at 37 °C with anti-ETV4 antibody (1:350, PA5-99226, Invitrogen) or anti-RUNX1 antibody (1:250, ab23980, Abcam) for 60 mins. Revelation was performed using the DAB Detection Kit (Ventana Medical System Inc.). Finally, tissue sections were counterstained with hematoxylin and bluing reagent (Ventana Medical System Inc.). Slides were scanned using the Aperio Verso 200 slide scanner microscope with a 20×0.8 NA objective with a 0.275MPP resolution (Leica Biosystems). Scoring of IHC staining was performed by two pathologists, among which a GI specialist, using the Image Scope software (Leica Biosystems) for visualization of slides.

Immunofluorescence

Immunofluorescence experiments were done as previously described (108). For antibodies, see Supplementary Table 3.2. Images were acquired with a Zeiss Axio Imager Z2 upright microscope using 63X or 100X objectives with a sCMOS 16-bit Prime camera (Photometrics) and/or CCD 12-bit AxioCam MRm3 camera (Zeiss) and ZEN 2 Imager (2.0.14283.302). Images were processed with the ZEN Black Software.

RT-qPCR

Total RNA was extracted from samples using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and then reverse transcribed using All-In-One 5X RT MasterMix (ABM, Cat.no. G592). Gene expression was determined with a LightCycler 96 (software version

1.1) Real-Time PCR System (Roche Applied Science) or with a CFX384 (software CFX Maestro version 1.1) Real-Time system (Bio-Rad), using SYBR Green technologies as described previously (544). Used qPCR primers are presented in Supplementary Table 3.3.

Library preparation for RNA-Sequencing

RNA was extracted as above mentioned in RT-qPCR section until the precipitation step. However, once at the RNA precipitation step, isopropanol-containing RNA samples were loaded on a RNeasy column (Qiagen Mini Kit #74106). RNA was obtained following the protocol in the kit and then solubilized in 50 μ L of RNase-free water. RNA quality was assessed on a BioAnalyzer (RNA Nano for >100K cells) and concentration was determined using Qubit BR. All samples had a RIN above 9.5. Then, 1000 ng of total RNA was used for library preparation using the KAPA mRNAseq Hyperprep kit (KAPA, Cat no. KK8581). Ligation was made with 64 nM final concentration of Illumina index and 9 PCR cycles was required to amplify cDNA libraries. Libraries were quantified by QuBit and BioAnalyzer DNA1000. All libraries were diluted to 10 nM and normalized by qPCR using the KAPA library quantification kit (KAPA; Cat no. KK4973). Libraries were pooled to equimolar concentration. Sequencing was performed with the Illumina Nextseq500 using the Nextseq High Output Kit (86 cycles) using 2.2 pM of the pooled libraries. Around 20 M single-end PF reads were generated per sample. Library preparation and sequencing was made at the Institute for Research in Immunology and Cancer's Genomics Platform (IRIC).

Mapping protocol and gene expression analysis of data from RNA-Seq

Sequences were trimmed for sequencing adapters and low quality 3' bases using Trimmomatic version 0.35 (545) and aligned to the reference human genome version GRCh38 (gene annotation from Gencode version 26, based on Ensembl 88) using STAR version 2.5.1b (546). Gene expressions were then obtained both as readcount directly from STAR as well as computed using RSEM (547) in order to obtain gene and transcript level expression, either in TPM or FPKM values, for these stranded RNA libraries. DESeq2 version 1.18.1(548) was then used to normalize gene readcounts.

Analysis of the dynamics of commitment

To understand the transition through the SeRP, we mapped the expression the senescent phenotype (S) as a function of the changes of RAS-MAPK signals induced by 4OHT over different

days. The percent of senescence cells increases and saturates to a particular value which can be seen through a 3D Hill function fit i.e.,

$$S = \alpha \frac{x^n}{(K_1^n + x^n)} \frac{t^m}{(K_2^m + t^m)} \quad (1)$$

where, α is the maximum value for senescent cells induction, n and m are the Hill's coefficients corresponding to RAS-MAPK signal intensity and time. The value of n is 4.57 and m is 7.06. Furthermore, we fit the equation using Python's *curve_fit* function in the raw dataset to estimate the parameters of this 3d Hill function as shown in Figure 3.1M-N.

Statistics and reproducibility

Statistical analysis (two-tailed Student's t-test) was performed using GraphPad Prism 8 and One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD Test using Astatsa website. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Experiments were repeated at least three times, except for those in Figure 3.7, Figure 3.8D-G, Figure 3.2I, Figure 3.9E and Figure 3.5B-C, which were repeated twice, and Figure 3.8C and Figure 3.10L which were repeated once. Experiments that were performed less than three times include technical triplicates.

3.3.8. Main figures and legends

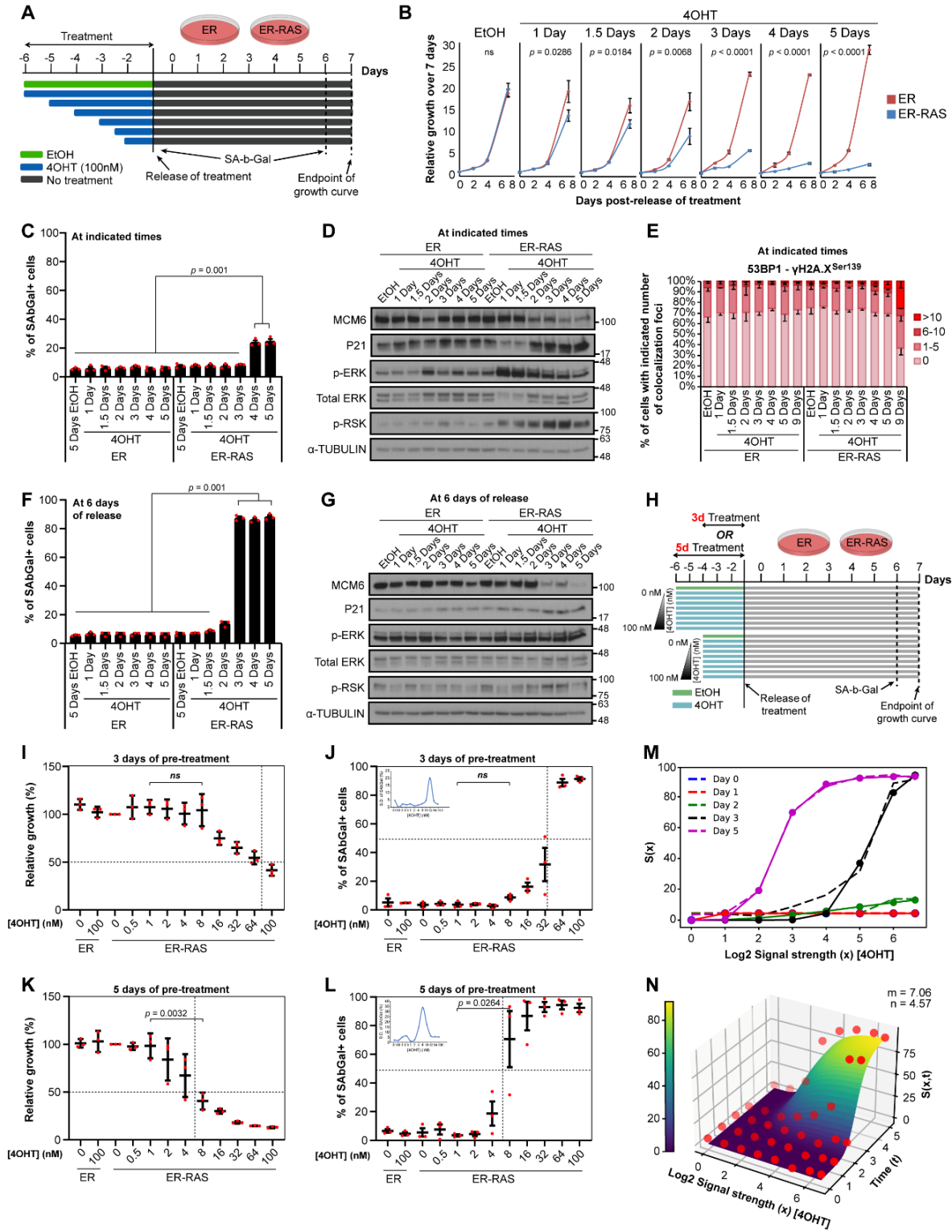


Figure 3.1. Commitment to RAS-Induced Senescence integrates both duration and intensity of MAPK signaling.

(A) Schematic representation of the release experiments for the identification of the senescence restriction point: SeRP.

(B) Representative growth curves of IMR90 cells infected with ER or ER-RAS, pre-treated with Veh (EtOH) or 100nM of 4OHT for the indicated time and then released, (n=4). Unpaired t-test with two-tailed *p*-value is indicated for each treatment, comparing ER (ctrl) to ER-RAS.

(C) Percentage of SA β Gal positive cells at indicated time-points of treatment for ER and ER-RAS-infected cells. Mean of three biological replicates is shown with each replicate value indicated as a red dot. Error bars represent S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed. At least 3 x 100 cells were counted per condition per biological replicate.

(D) Representative western-blot analysis of cells as in C at indicated times of treatment, (n=3).

(E) Quantification of DNA damage foci represented by colocalization of 53BP1 and γ H2A.X^{Ser139} by immunofluorescence performed on cells as in C; Mean of two biological replicates is shown with S.D. as error bars; \pm 200 cells counted per condition, (n=2).

(F) Percentage of SA β Gal positive cells in cells pre-treated for the indicated time and then released for 6 days. Mean of three biological replicates is shown with each replicate value indicated as a red dot. Error bars represent S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed. At least 3 x 100 cells counted per condition per biological replicate.

(G) Representative western-blot as in D but 6 days post-release of treatment, (n=3).

(H) Schematic representation of the release experiments for the identification of the senescence engaging threshold point dependent on intensity of ERK signaling.

(I) Percentage of relative growth after 7 days of ER and ER-RAS cells pretreated for 3 days with a gradient of 4OHT. Mean of three biological replicates is shown with each replicate value indicated as a red dot. Error bars represent S.D, n=3.

(J) Same as in I but with cells pretreated for 5 days.

(K) Percentage of SA β Gal positive cells at 6 days post-release of treatment, in cells from H pretreated for 3 days with a gradient of 4OHT. Mean of three biological replicates is shown with each replicate value indicated as a red dot. Error bars represent SEM, n=3. Closeup shows increased variance in % of bGal at the commitment restriction point as depicted by the bell curve.

(L) Same as in K but with cells pretreated for 5 days. For panels I, J, K and L, *p*-value was calculated by performing an unpaired t-test between 1nM and 8nM conditions in ER-RAS expressing cells.

(M) 2D Hill function of data presented in panels C, F, K and L showing the on-off mechanism of this bistable system around 3 days of 4OHT; *S*(*x*) defines the senescent phenotype (% of SA β Gal positive cells) as a function of intensity of signaling (*x*).

(N) 3D Hill function fit of data presented in panels C, F, K and L using Python's *curve_fit* function to estimate the parameters of this 3D Hill function. Passage through the SeRP represents a bistable mechanism; *S*(*x*,*t*) defines the senescent phenotype (% of SA β Gal positive cells) as a function of intensity (*x*) and time (*t*) of signaling.

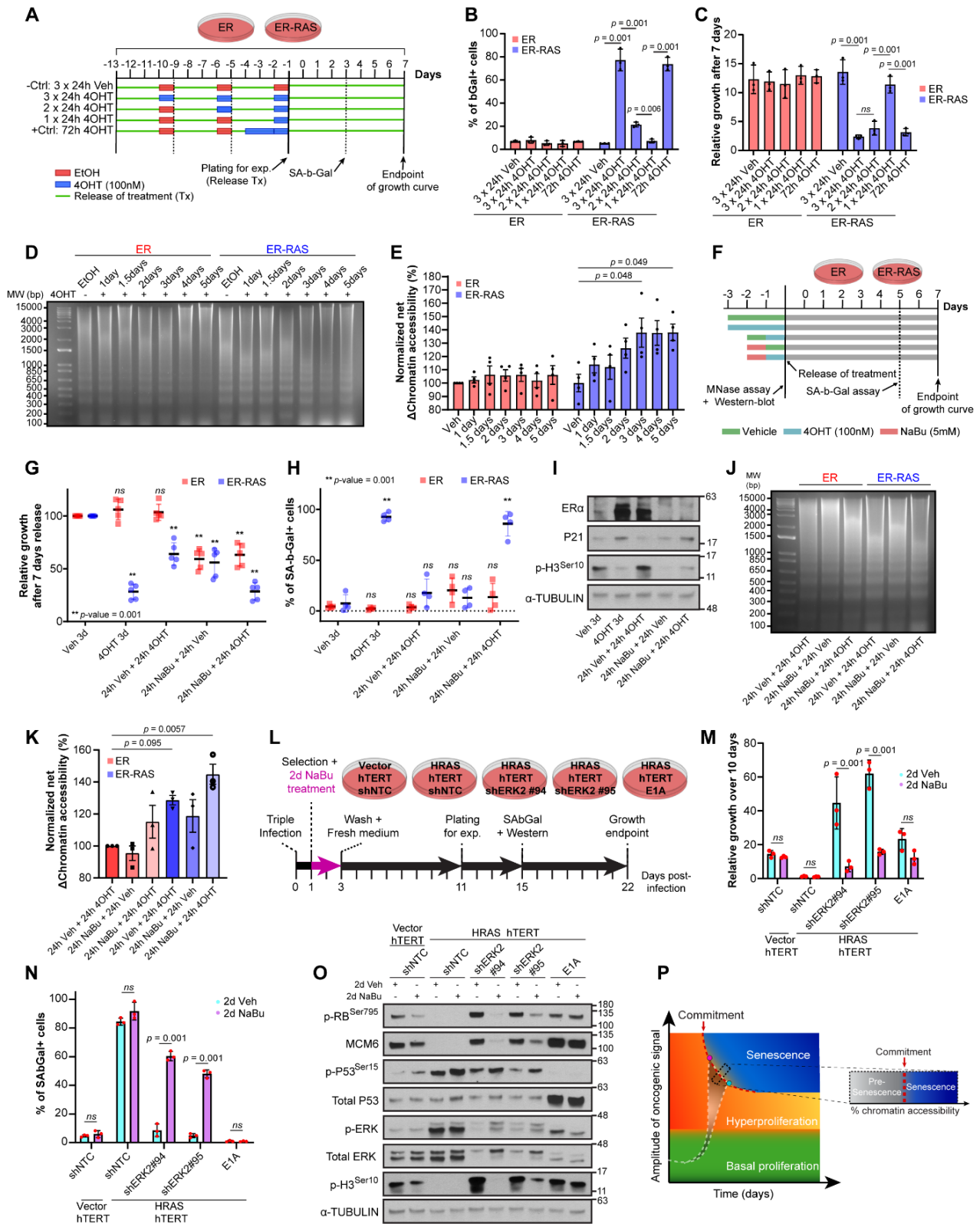


Figure 3.2. Commitment to RAS-Induced Senescence is ERK2-dependent and integrated at the chromatin.

- (A) Schematic representation of the experiment performed in panels B and C. IMR90 cells expressing either ER or ER-RAS were treated with 100nM 4OHT by pulses of 24h, each separated by 3 days.
- (B) Percentage of SA β Gal positive cells for cells described in A. Mean of 3 biological replicates is shown with each biological value represented as a black dot. Error bars represent S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.
- (C) Relative growth over 7 days of cells described in A. Mean of 3 biological replicates is shown with each biological value represented as a black dot. Error bars represent S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.
- (D) Representative MNase assay performed on IMR90 cells expressing ER or ER-RAS and treated with vehicle or 100nM 4OHT for indicated times, n=3.
- (E) Quantification of MNase assays performed in D indicating the net percentage of chromatin opening. Mean of 4 biological replicates is shown with each biological value represented as a black dot. Error bars represent S.E.M. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.
- (F) Schematic representation of experiments in panels G-K. ER and ER-RAS cells were treated for 24h with 5mM of HDAC inhibitor NaBu followed or not by 24h of 100nM 4OHT to assess the possibility of shifting the SeRP window.
- (G) Percentage of relative growth after 7 days of release of cells from panel F. Mean of 5 biological replicates is shown with each biological replicate's mean represented as a dot. Error bars represent S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed, comparing Veh 3d condition to all other treatment regimens within ER or ER-RAS conditions.
- (H) Percentage of SA β Gal positive cells for cells depicted in panel F. Mean of 4 biological replicates is shown with each biological replicate's mean represented as a dot. Error bars represent S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed, comparing Veh 3d condition to all other treatment regimens within ER or ER-RAS conditions.
- (I) Representative western-blot performed on whole cell lysates from ER-RAS cells depicted in F, n=2.
- (J) Representative MNase assay performed on cells shown in F, n=3.
- (K) Quantification of MNase assays performed in J indicating the net percentage of chromatin opening. Mean of 3 biological replicates is shown with each biological value represented as a dot. Error bars represent S.E.M.
- (L) Schematic representation of experiments for panels M-O. IMR90 cells infected with hTERT and Vector or HRAS and shNTC or shERK2 (#94 or #95) were treated for 2 days with 5mM NaBu starting at Day 1 post-infection to pre-open chromatin before displaying hyperproliferation phenotype due to overexpression of HRAS.
- (M) Relative growth over 10 days of cells from panel L. Mean of 3 biological replicates is shown with each biological replicate's mean represented as a dot. Error bars represent S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.
- (N) Percentage of SA β Gal positive cells in cells depicted in L. Mean of 3 biological replicates is shown with each biological replicate's mean represented as a dot. Error bars represent S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.
- (O) Representative western-blot performed on whole cell lysates from cells depicted in L, n=2.
- (P) Model integrating amplitude (intensity), time (duration) and chromatin accessibility for commitment to senescence. Magenta dot: point of commitment at 100 mM 4OHT. Cyan dot: delayed commitment when 4OHT concentration is reduced.

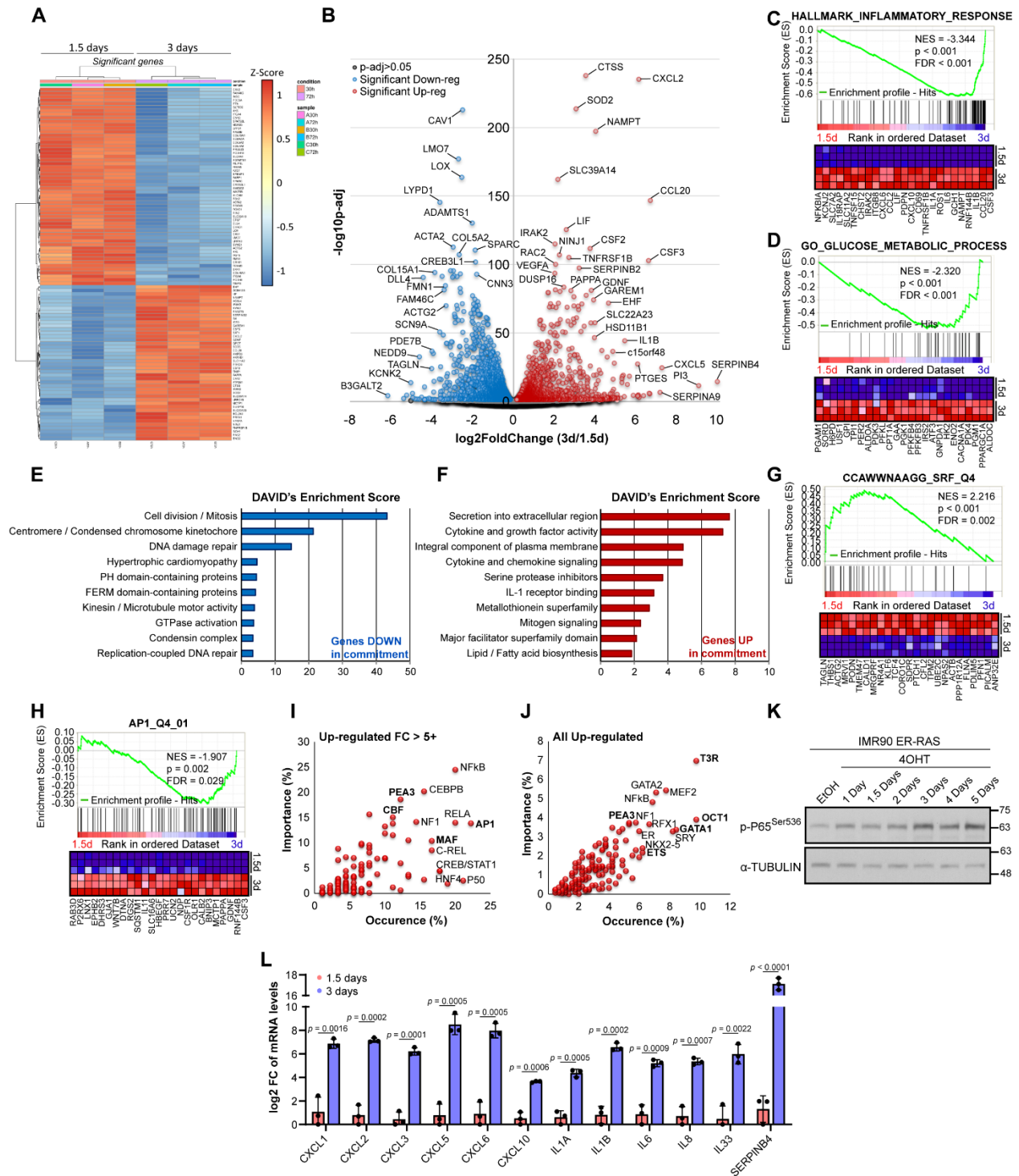


Figure 3.3. The transcriptome of cells committed to senescence.

(A) Heat map clustering of the top 100 most significant genes based on a *padj* ranking at 30h (1.5 day) or 72h (3 days) of ER-RAS activation in IMR90.

(B) Volcano-plot of all genes in the RNA-Seq data. Blue & Red = significant genes with adjusted *p*-value < 0.01; Gray = non-significant genes with adjusted *p*-value > 0.01; Genes in blue are decreased at 3 days and genes in red are increased at 3 days.

- (C-D) GeneSet Enrichment Analysis using 1000 gene sets permutations on all genes with an adjusted p -value < 0.05 .
- (E) Functional Annotation Clustering using DAVID 6.8 for all significantly down-regulated genes at 3 days.
- (F) Same as in E but for up-regulated genes with a FoldChange ≥ 2 .
- (G-H) GSEA analysis with same parameters as in C-D.
- (I) DiRE analysis for identification of distant regulatory elements of co-regulated genes performed on up-regulated genes with at least 5 Foldchange and 100 sequencing reads.
- (J) Same as in I for all up-regulated genes with at least 100 reads. DiRE analyses were performed for genes with an adjusted p -value ≤ 0.05 .
- (K) Representative western-blot of whole cell lysates from IMR90 cells expressing ER-RAS and treated with Veh (EtOH) or 100nM 4OHT for indicated period of time, $n=3$.
- (L) RT-qPCR validation showing an increase of cytokines in IMR90 ER-RAS treated for 3 days versus 1.5 day with 100nM 4OHT.
- Graphs represent the \log_2 of mean Fold-Change (FC) and S.D. of three biological replicates analyzed. The mean of each biological replicate is depicted by a black dot, $n=3$. Unpaired t-test with two-tailed p -value is indicated.

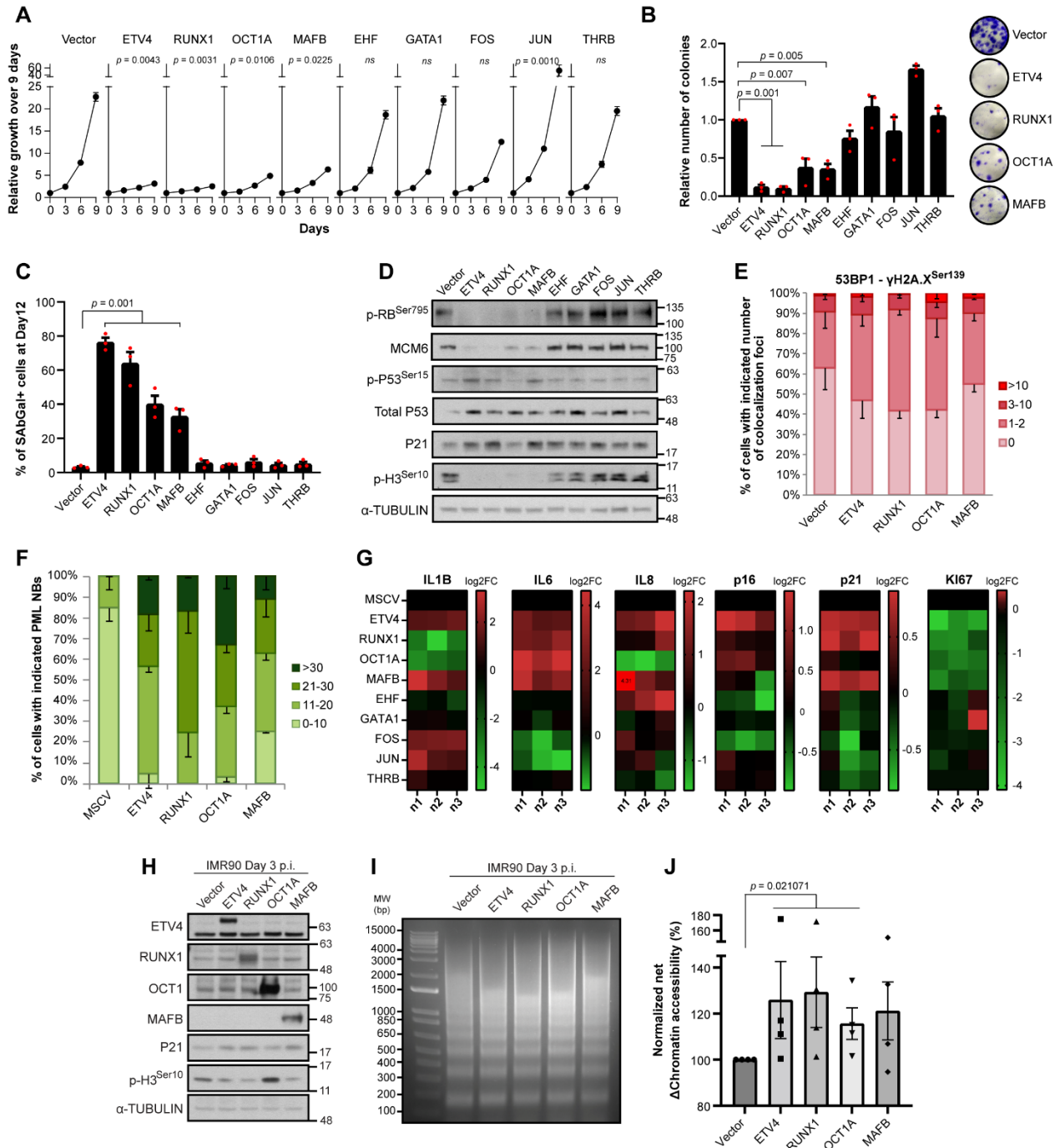


Figure 3.4. Overexpression of TFs whose signature is enriched during commitment recapitulates the senescence program.

(A) Representative growth curve of IMR90 cells infected with constructs for overexpression of indicated TFs and plated for experiment at day 7 post-infection. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed, comparing each condition to Vector control, $n=3$.

(B) Colony assay performed on cells as in A. Growth was normalized on Day 0 from the growth curve plated in parallel. Mean of 3 biological replicates is shown, with each biological replicate's mean indicated by a red dot. Error bars represent SEM. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.

(C) Percentage of SA β Gal positive cells for conditions as in A and B. Mean of 3 biological replicates is shown, with each biological replicate's mean indicated by a red dot. Error bars represent SEM. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.

(D) Representative western-blot performed on whole cell lysates from the same cells as precedent panels, n=3.

(E) Quantification of DNA damage foci represented by colocalization of 53BP1 and γ H2A.X^{Ser139} in IMR90 cells overexpressing ETV4, RUNX1, OCT1A or MAFB compared to control vector (MSCV) at day 12 post-infection. Mean of two biological replicates is shown with S.D. as error bars; error bar only shown in one direction but same in the opposite direction, n=2.

(F) Quantification of PML NBs in cells as in E. Mean of two biological replicates is shown with S.D. as error bars, n=2.

(G) RT-qPCR performed on the same cells as in E. Each column represents the mean of a different biological replicate, n=3.

(H) Representative western-blot of whole cell lysates from IMR90 cells overexpressing ETV4, RUNX1, OCT1A or MAFB compared to control vector (MSCV) at day 3 post-infections (still under hygromycin selection), n=2.

(I) Representative MNase assay performed on cells as in H, n=4 (J) Quantification of MNase assays performed in I. Mean of 4 biological replicates is shown with each biological replicate's mean identified by a black dot. Error bars represent SEM; n=4. Mann Whitney (Wilcoxon rank sum) test with continuity correction with a 95% confidence interval using null hypothesis $\mu_0 = 0.0$ was performed.

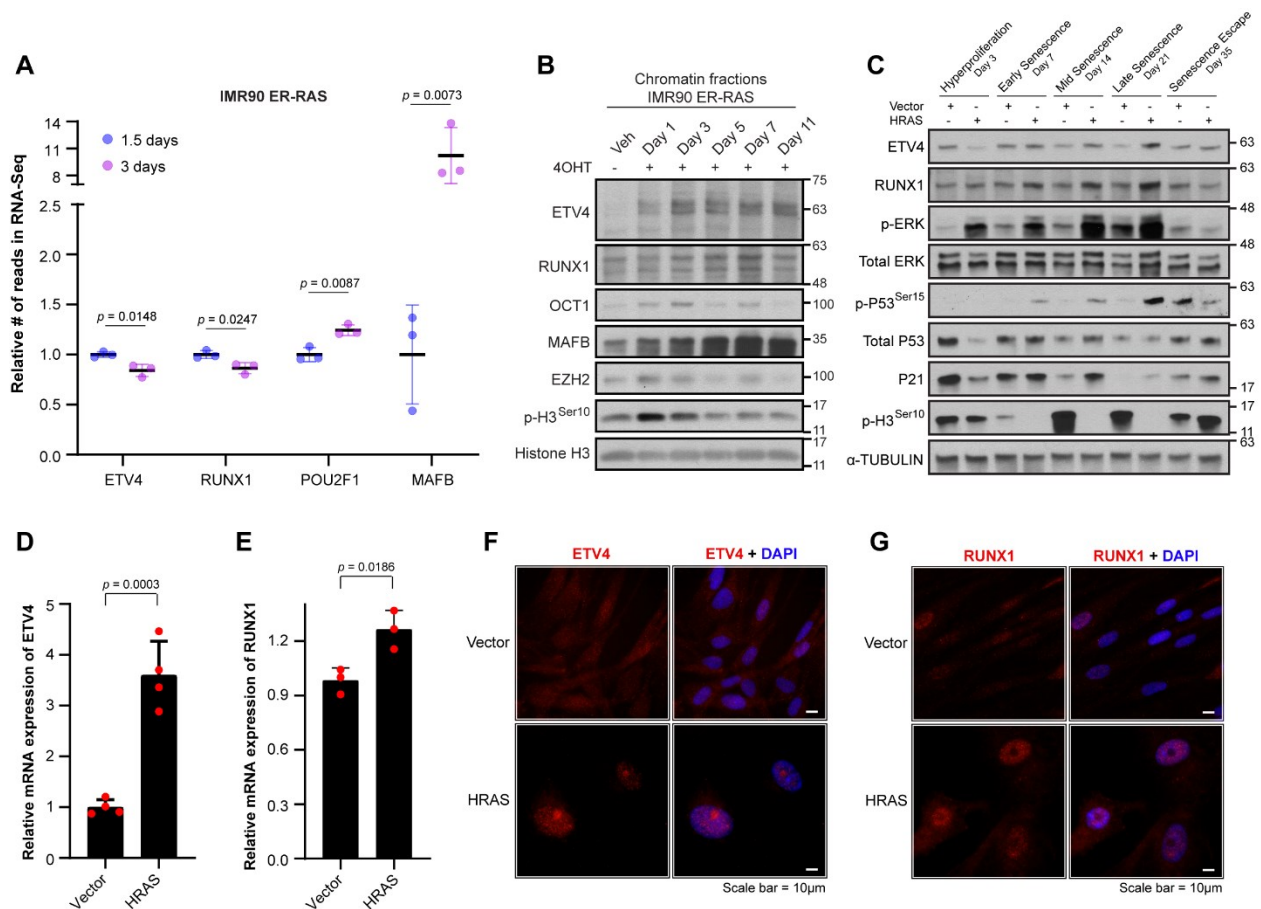


Figure 3.5. ETV4 and RUNX1 binding to chromatin increases during commitment to senescence, leading to nuclear accumulation and increase in their levels.

(A) Relative number of reads for each of the identified committing TFs in the RNA-Seq data. Mean of the 3 biological replicates is shown with each replicate's mean as a dot and S.D. as error bars. Unpaired t-test with two-tailed p -value is indicated.

(B) Representative western-blot of purified chromatin fractions from IMR90 cells expressing ER-RAS and treated with Veh for 11 days or with 100nM 4OHT for 1, 3, 5, 7 or 11 days, $n=2$.

(C) Representative western-blot with whole cell lysates from a time-course experiment in IMR90 cells expressing constitutive HRAS-G12V or empty control vector, $n=2$.

(D) ETV4 and (E) RUNX1 mRNA levels measured by RT-qPCR in IMR90 infected with empty control vector or HRAS-G12V. Results shown at Day 12 post-infection. Mean of 4 biological replicates is shown for ETV4 and mean of 3 biological replicates is shown for RUNX1 with S.D. as error bars for both. Unpaired t-test with two-tailed p -value is indicated.

(F) Representative image of immunofluorescence staining for ETV4 and

(G) RUNX1 in IMR90 cells expressing control empty vector or constitutive HRAS-G12V for 12 days, $n=3$.

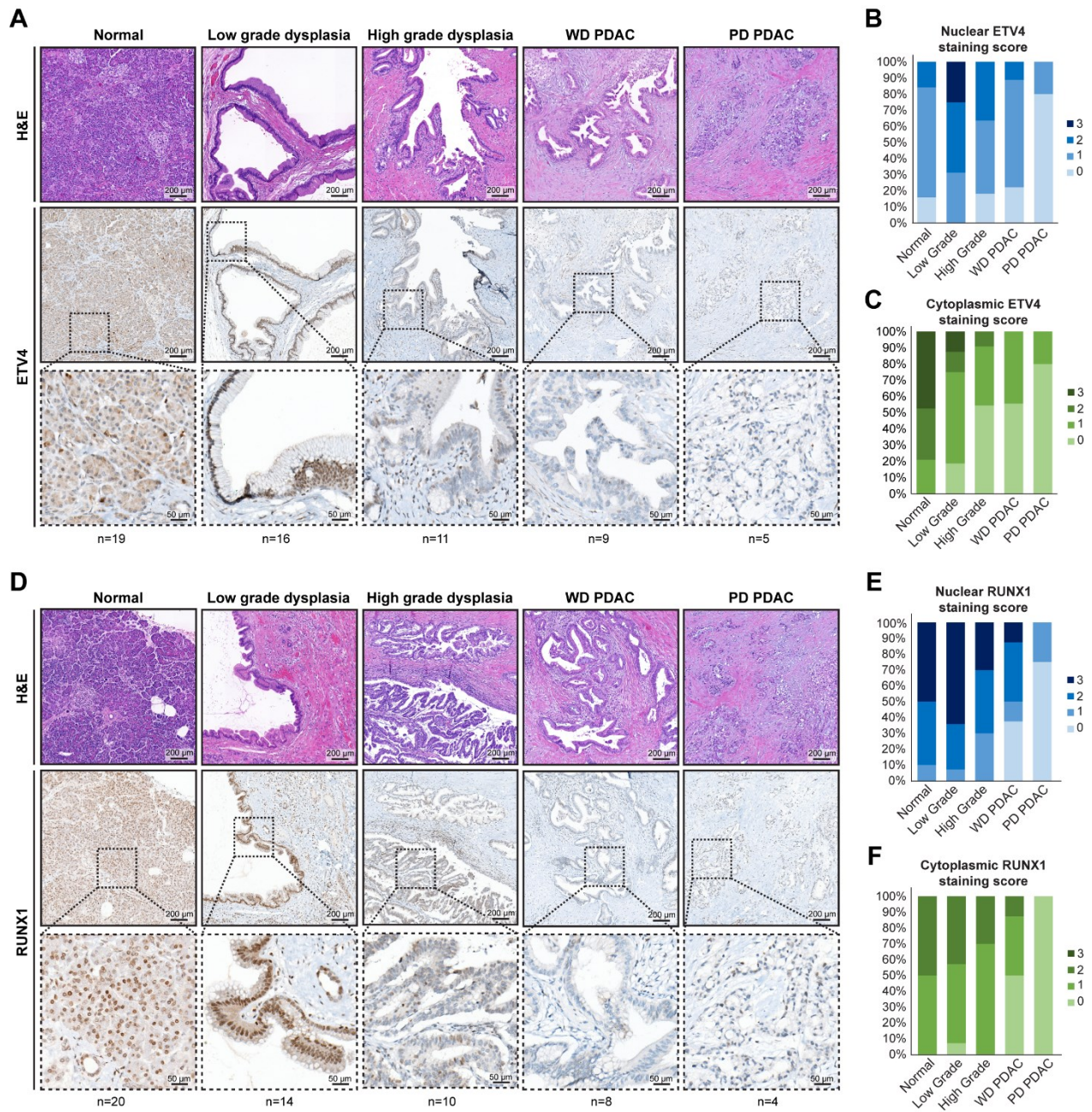


Figure 3.6. ETV4 and RUNX1 levels are high in human pancreatic benign lesions and decrease in pancreatic ductal adenocarcinoma.

(A) Immunohistochemical staining of human pancreatic tissues with anti-ETV4 antibody. Normal pancreas and different grades of pancreatic cancer lesions are shown. Insets: zoom on representative regions.

(B) Scoring of nuclear ETV4 staining in epithelial cells from the different patients considered in A. Four intensities of staining have been considered (0: none; 1: low; 2: moderate; 3: high). The mean percentage of cells for each category of staining intensity is shown in the histogram.

(C) Same as in B, but for cytoplasmic ETV4 staining.

(D) Staining as in A but for RUNX1.

(E) Nuclear staining scoring as in B, but for RUNX1 with patients from D.

(F) Same as in E, but for cytoplasmic RUNX1 staining. In low grade dysplasia, both pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN) and pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) showed strong signals for ETV4 and

RUNX1. Levels of both TFs were strongly reduced in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) in a manner proportional to the aggressiveness of the tumor, with poorly differentiated tumors (PD) showing stronger decrease than well differentiated tumors (WD). Number of patients used for analysis of each grade are indicated below inset.

3.3.9. Supplemental Material

3.3.9.1. List of supplemental material

Supplemental Figure 3.7

Supplemental Figure 3.8

Supplemental Figure 3.9

Supplemental Figure 3.10

Supplemental Figure 3.11

Supplemental Figure 3.12

Supplemental Table 3.1

Supplemental Table 3.2

Supplemental Table 3.3

3.3.9.2. Supplemental figures and legends

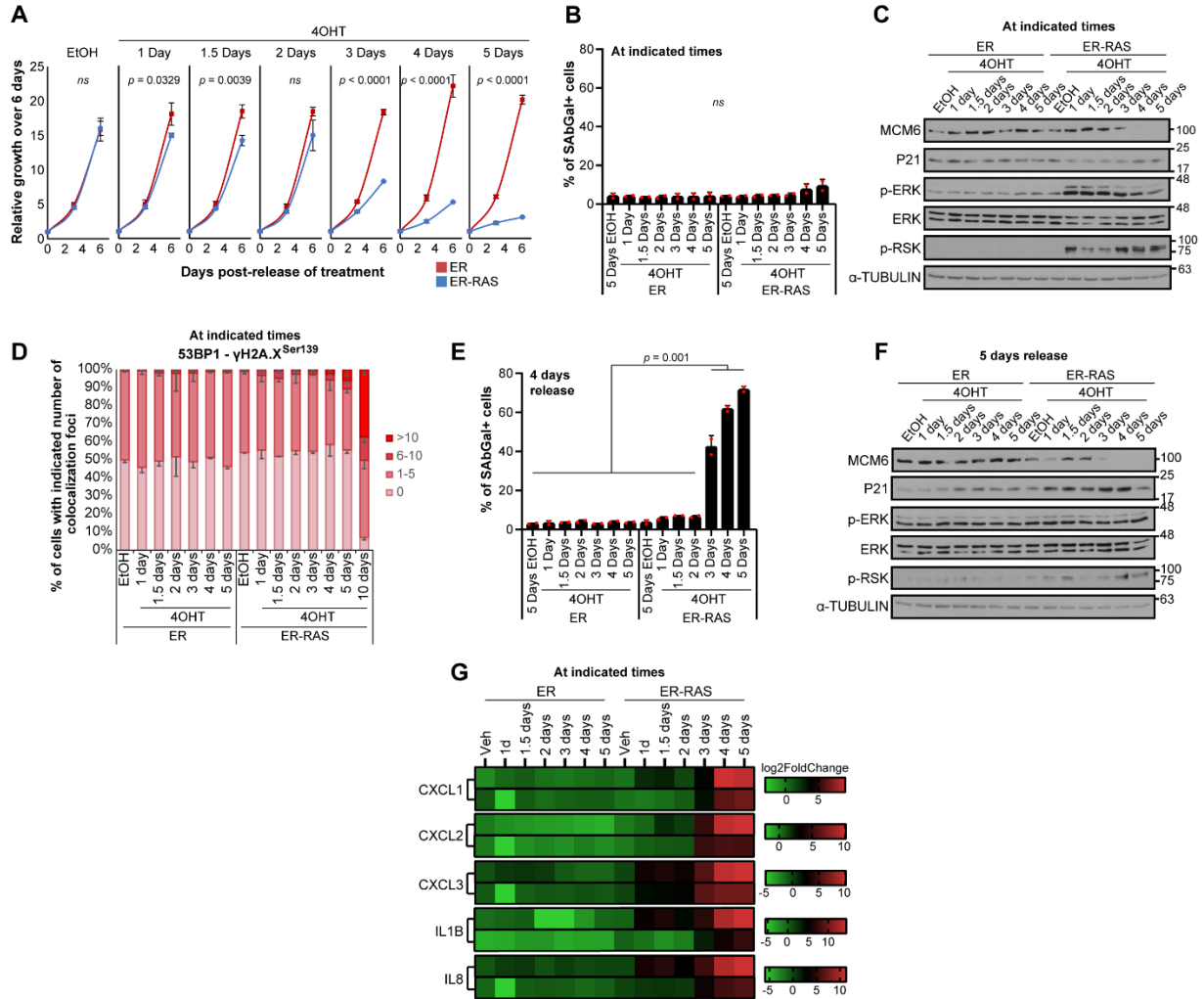


Figure 3.7. (Fig. S1) Senescence Restriction Point in normal human fibroblasts MRC5.

(A) Representative growth curves of MRC5 cells infected with control vector ER or ER-RAS, pre-treated with EtOH (Veh) or 100nM 4OHT for the indicated time and then released, (n=2). Unpaired t-test with two-tailed *p*-value is indicated for each treatment, comparing ER (ctrl) to ER-RAS.

(B) Percentage of SAβGal positive cells at indicated time-points of treatment in ER and ER-RAS-infected cells. Mean of two biological replicates is shown with S.D. as error bars. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed. At least 3 x 100 cells were counted per condition per biological replicate.

(C) Representative western-blot analysis of cells as in B, n=2.

(D) Quantification of DNA damage foci represented by colocalization of 53BP1 and γH2A.X Ser139 in cells as in B; ± 100 cells counted per condition per biological replicate, n=2. Error bars represent S.D.

(E) Percentage of SAβGal positive cells at 4 days post-release of indicated pre-treatments. Mean of two biological replicates is shown with S.D. as error bars. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed. At least 3 x 100 cells were counted per condition per biological replicate.

(F) Representative western-blot as in C but 5 days post-release of treatment, n=2.

(G) RT-qPCR performed on cells as in B-D. Each row represents the mean of a different biological replicate for indicated conditions, n=2.

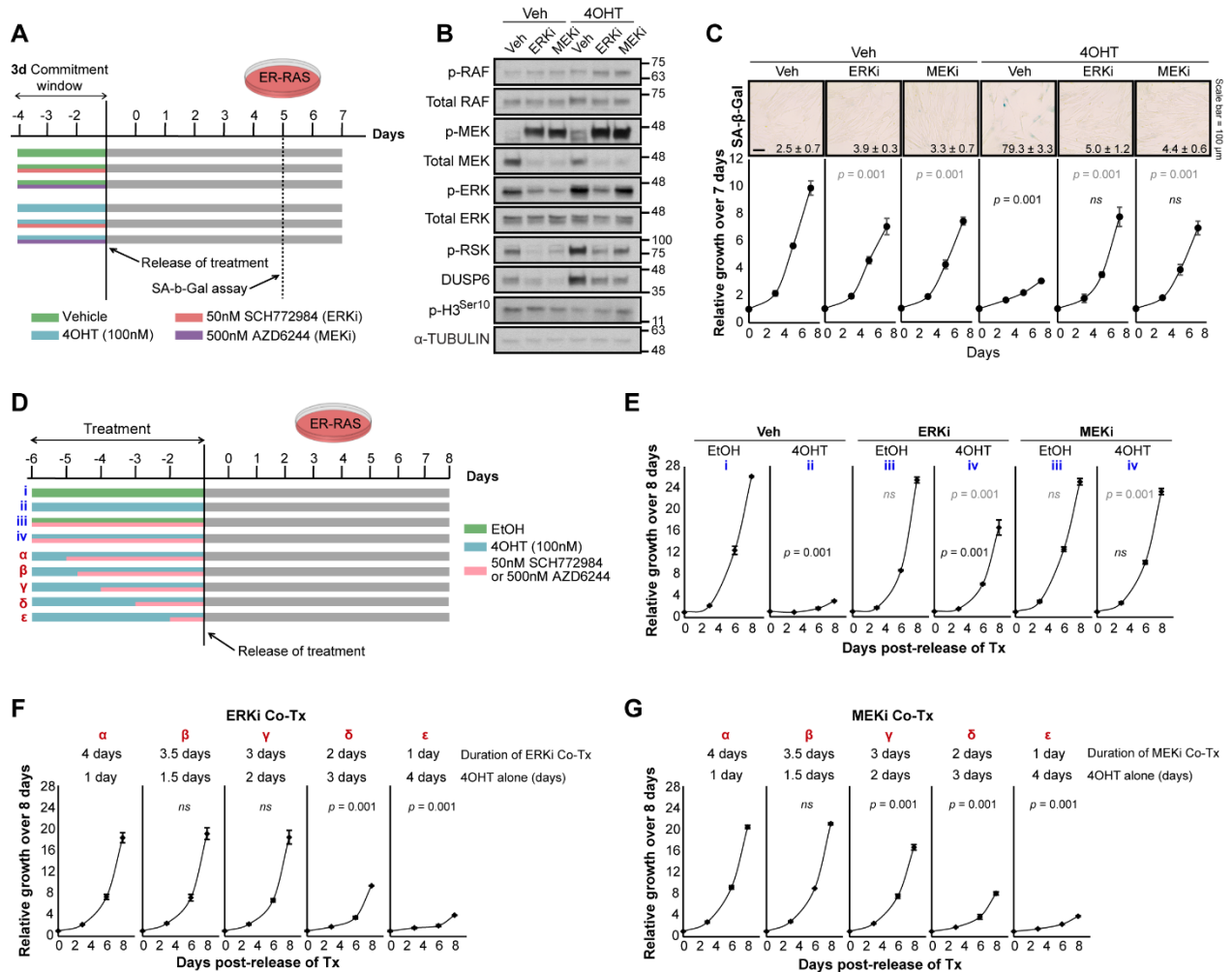


Figure 3.8. (Fig. S2) Sustained ERK activation is required for commitment towards senescence but is dispensable after commitment window.

(A) Schematic representation of the treatment regimen for panels B and C. IMR90 cells expressing ER-RAS were co-treated for 3 days with indicated drugs and then either harvested for protein extracts or plated for experiments.

(B) Representative western-blot from whole cell lysates of cells treated for 3 days with regimen indicated in A, n=3.

(C) Growth curve and percentage of SAβGal positive cells in experiment depicted in A; n=1. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed comparing each co-treatment in 4OHT-treated cells to its relative in Veh-treated cells (p-value in black) or ERKi and MEKi to Veh in both Veh-treated cells and 4OHT-treated cells (p-value in gray).

(D) Schematic representation of the treatment regimen for panels E-G.

(E-G) Representative growth curve of experiment depicted in D in which IMR90 cells expressing ER-RAS were either

(E) co-treated for 5 days with EtOH or 4OHT and Veh, ERKi (50nM SCH772984) or MEKi (500nM AZD6244), or (F) treated with Veh or 4OHT followed by co-treatment of 4OHT±ERKi, or (G) treated with Veh or 4OHT followed by co-treatment of 4OHT±MEKi, n=2. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed comparing EtOH and 4OHT-treated cells for the 3 conditions (Veh, ERKi, MEKi) of 5 days co-treatment (p-values in black in panel e) or comparing ERKi and MEKi effect compared to Veh in both EtOH and 4OHT-treated cells for the same 5 days of co-treatment (p-values in gray in panel (E)). Each combination of co-treatment (α, β, γ, δ and ε in left margin of panel (D)) was also compared to the 1 day 4OHT alone treatment in the ERKi and MEKi conditions (panels F and G).

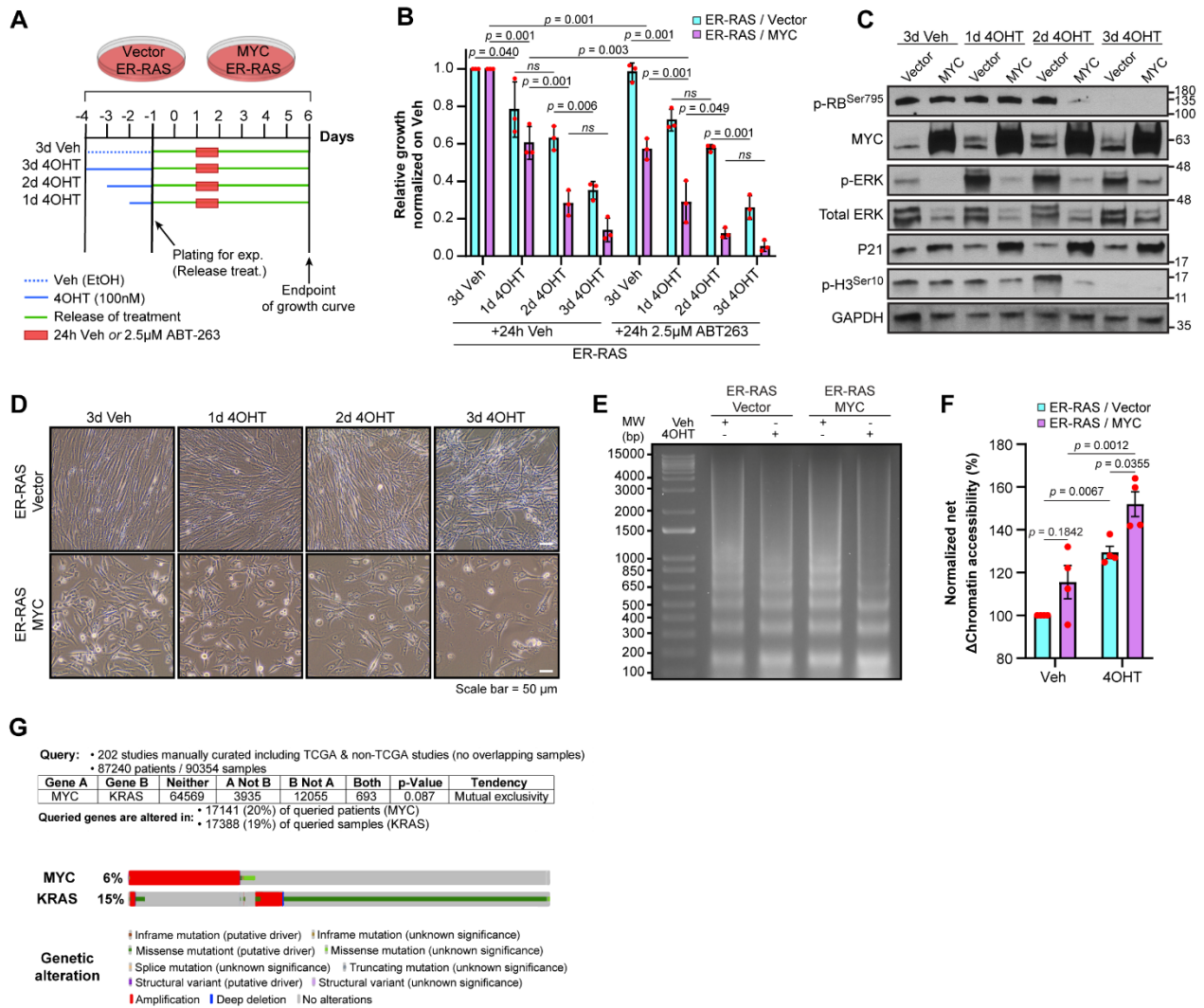


Figure 3.9. (Fig. S3) MYC and RAS cooperate at the chromatin level to induce senescence.

(A) Schematic representation of the experiment performed in panels B to F. IMR90 cells were co-infected with either control ER vector or ER-RAS, with either control vector or MYC. Around 12 days post-infection, cells were treated with Veh (EtOH) or 100nM 4OHT for 1, 2 or 3 days before plating cells for evaluation of the senescence-induction cooperation phenotype.

(B) Normalized relative growth over 6 days of MYC-expressing cells versus vector control cells for indicated conditions, with or without 24h treatment of ABT-263 (2.5µM) from day1 to day2 of growth assay. For each background (vector or MYC), growth was normalized on Veh-treated cells. Mean of three biological replicates is shown with each biological mean represented as a red dot. Error bars represent S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.

(C) Representative western-blot performed on whole cell lysates from cells depicted in A, at the end of treatment, n=2.

(D) Representative micrographs showing increased size of cells and senescent-like morphology upon co-activation of ER-RAS and MYC.

(E) Representative MNase assay performed on cells depicted in A treated for 3 days with Veh or 4OHT, n=4.

(F) Quantification of MNase assays performed in E indicating the net percentage of chromatin opening. Mean of 4 biological replicates is shown with each biological replicate's mean represented as a red dot. Error bars represent S.E.M. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.

(G) cBioPortal-generated genomic analysis of alterations in MYC and KRAS genes across human cancers in 202 studies manually curated including TCGA and non-TCGA studies with no overlapping samples (87240 patients / 90354 samples), showing a tendency to mutual exclusivity in their Gain-Of-Function alterations.

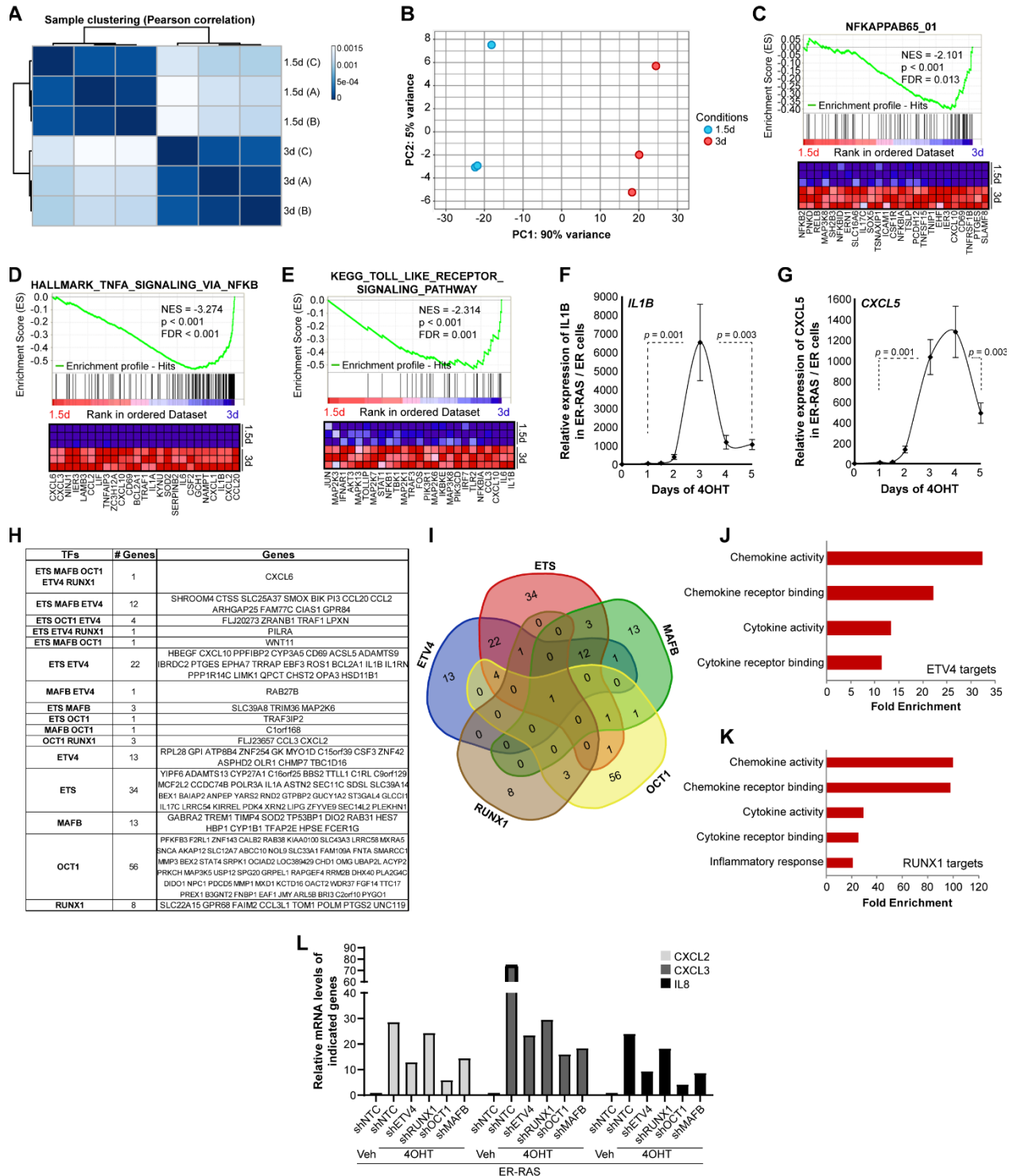


Figure 3.10. (Fig. S4) Supplementary GSEA analyses and validation of RNA-Seq.

(A) Sample hierarchy produced by sample clustering based on normalized log readcounts.

(B) Principal component analysis of the top 5000 varying genes between 30h and 72h in RNA-Seq data.

(C-E) Supplementary GSEA signatures enriched in committed cells.

(F-G) Temporal dynamics of cytokines expression by RT-qPCR. Data shows relative expression in ER-RAS cells normalized on ER control cells for each time-point. Each time-point represents the mean of 3 biological replicates with error bars as S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed comparing 1 day to 3 days & 3 days to 5 days for each gene.

(H) List of PEA3/ETV4, ETS factors, MAFB, OCT1 and RUNX1 putative targets based on co-regulated genes from DiRE transcriptional signatures for genes up-regulated in IMR90 ER-RAS treated for 3 days with 4OHT.

(I) Venn diagram corresponding to the list shown in H.

(J) GO-Terms from Panther DataBase associated to genes identified as putative targets of ETV4. (K) Same as in J but for RUNX1.

(L) RT-qPCR performed on IMR90 cells infected with hTERT, ER-RAS and a pool of 2-3 shRNAs against indicated TFs, (n=1), and treated with Veh or 100nM 4OHT for 3 days.

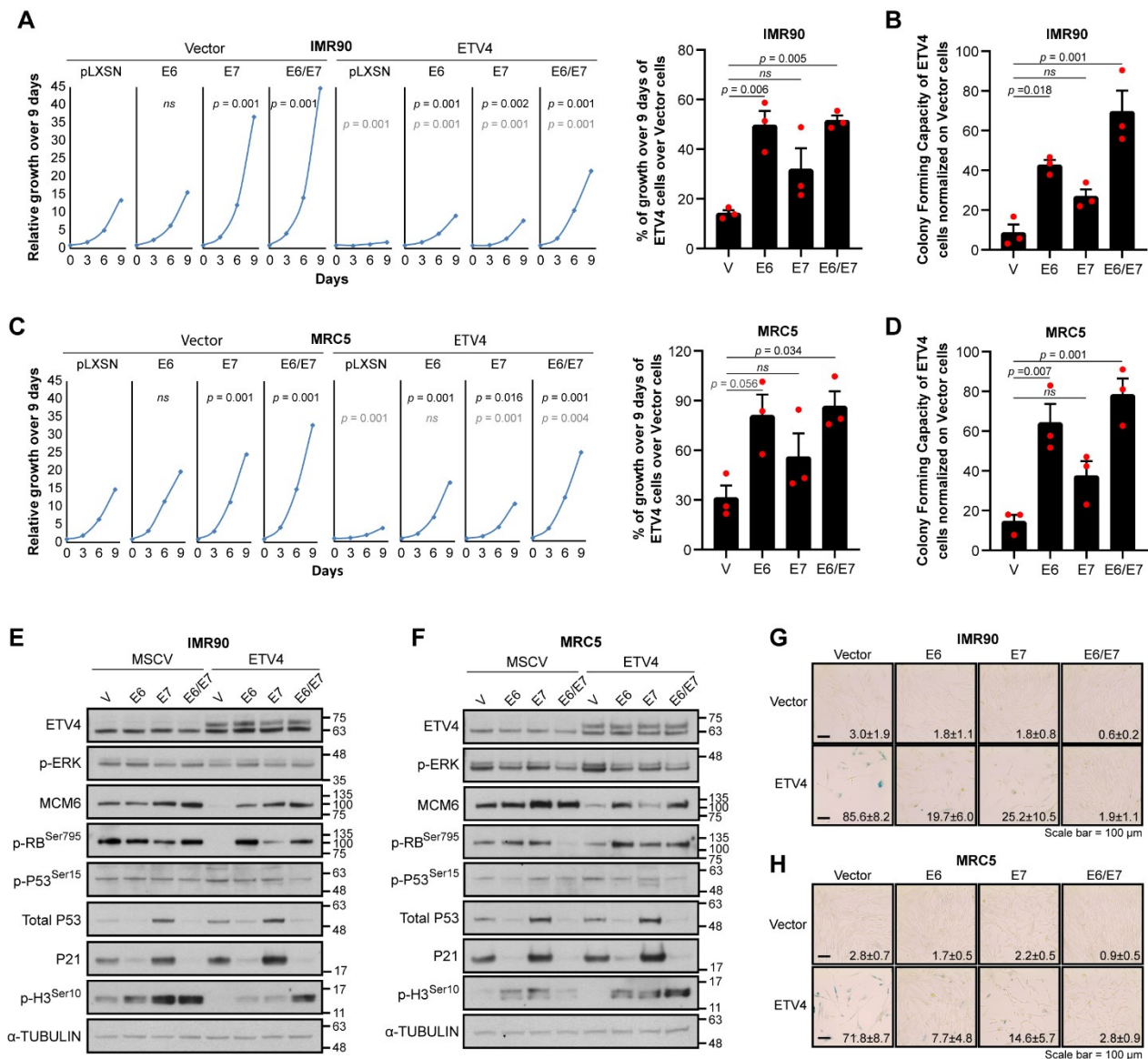


Figure 3.11. (Fig. S5) ETV4 induces senescence by activating both p53 and RB pathways.

(A) Representative growth curve with adjacent histogram showing percentage of growth over 9 days of IMR90 cells co-expressing either an empty vector (MSCV) or ETV4 with an empty vector (pLXSN), E6, E7 or both E6/E7. Cells were plated around day 7 post-infection. For the adjacent histogram, growth is shown as a ratio of ETV4 cells over control cells for each of the conditions. Mean of 3 biological replicates is shown in the histogram with each biological replicate's mean shown as a red dot. Error bars represent SEM. For growth curve, one-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed comparing either E6, E7 and E6/E7 conditions to Vector in both ETV4 and Vector-expressing cells (p-value in black), or comparing Vector, E6, E7 and E6/E7 conditions in ETV4-expressing cells to relative conditions in Vector-expressing cells (p-value in gray). Same statistical test was used for adjacent histogram.

(B) Colony assay performed on cells as in A and normalized on Day 0 from growth curve plated in parallel. Mean of 3 biological replicates is shown with each biological replicate's mean shown as a red dot. Error bars represent SEM. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.

(C) Same as in A but in MRC5 cells.

(D) Same as in B but in MRC5 cells.

(E) Representative western-blot performed with whole cell lysates from cells as in A, n=3.

(F) Same as in E but in MRC5 cells.

(G) SA β Gal performed on cells as in A, B and E. A representative image is shown with a quantification in which the mean of 3 biological replicates is indicated with S.D. as the error, n=3. (H) Same as in G but in MRC5 cells.

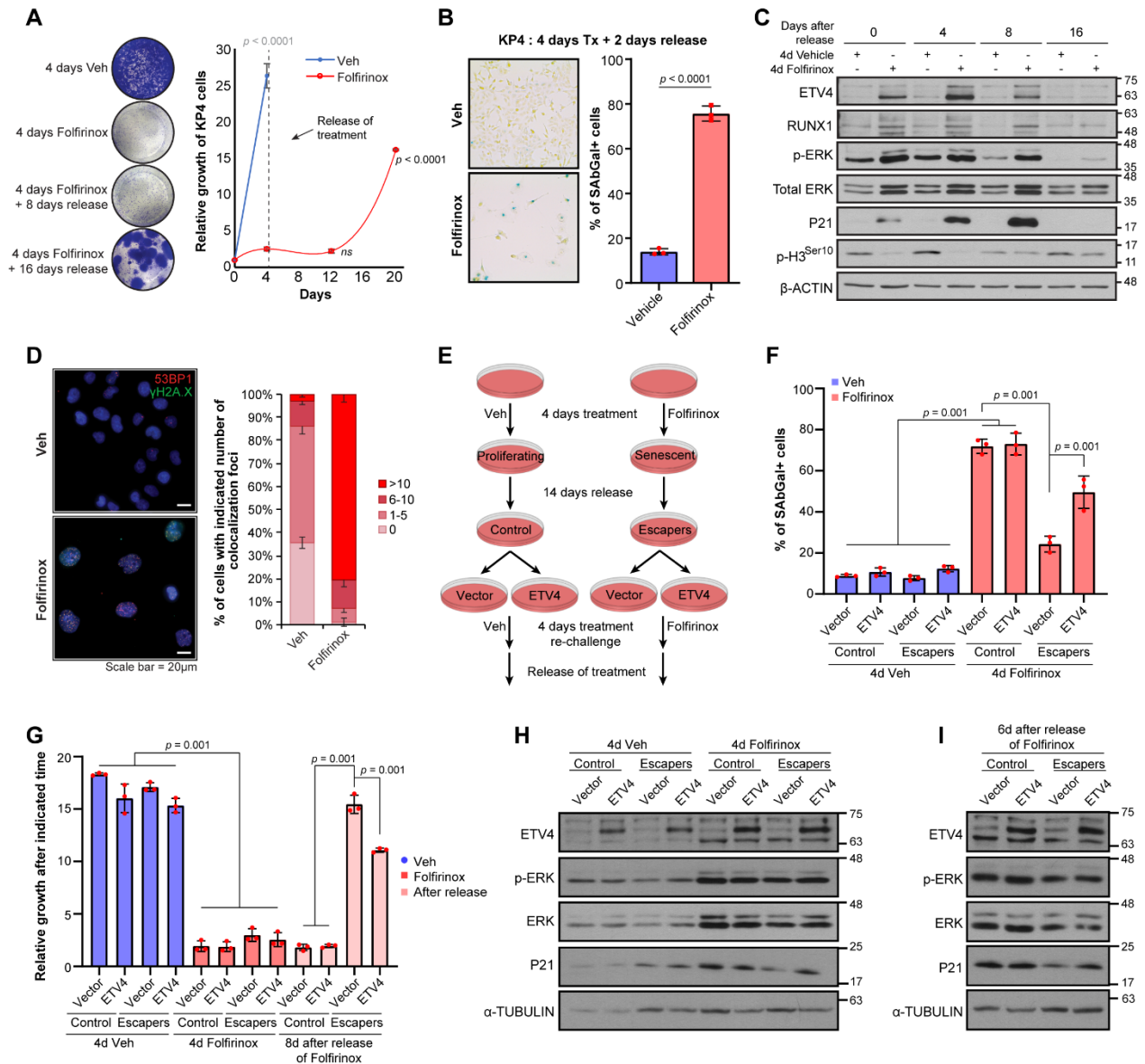


Figure 3.12. (Fig. S6) ETV4 acts as a tumor suppressor in Therapy-Induced Senescence in PDAC cells.

(A) Growth curve of KP4 pancreatic cancer cells treated with either control Vehicle (DMSO+H₂O) or Folfinirox (25nM Sn38 + 10μM 5-FU + 5μM oxaliplatin) for 4 days and then released from treatment. Mean of 3 biological replicates is shown with S.D. as error bars. Two-tailed unpaired t-test was performed comparing either Veh and Folfinirox cells at the end of treatment (p -value in gray), or comparing day 12 and day 20 to the end of treatment (day 4) in Folfinirox-treated cells (p -value in black).

(B) Representative SAβGal assay performed on the same cells as in A, but two days after release of treatment. Mean of three biological replicates is shown with the mean of each biological replicate indicated with a red dot. Error bars represent S.D. Two-tailed unpaired t-test was performed.

(C) Representative western-blot performed on whole cell lysates from KP4 cells treated for 4 days with Veh or Folfinirox and then released from treatment and harvested at different timepoints, $n=2$.

(D) Quantification of DNA damage as seen by colocalization of 53BP1 and γ H2A.X^{Ser139} in cells as in B. Mean of 3 biological replicates is shown with error bars as S.D. for each of the categories. (E) Schematic representation of the experiment in panels F to I. KP4 cells were treated for 4 days with Veh or Folfinirox and the treatment was released for 2 weeks to allow cells to bypass senescence as seen from growth in panels A and C. Control cells and escapers

cells were then infected with empty control vector (MSCV) or ETV4 and re-challenged for 4 days with either Veh or Folfirinox starting at day 7 post infection. Stability of the senescent phenotype was then assessed.

(F) SA β Gal assay was performed 2 days after cessation of re-challenge with Veh/Folfirinox treatment on cells in E. Mean of 3 biological replicates is shown with the mean of each biological replicate shown as a red dot. Error bars represent S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.

(G) Relative growth of cells from (E) at indicated time points. Mean of 3 biological replicates is shown with the mean of each biological replicate shown as a red dot. Error bars represent S.D. One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed.

(H) Representative western-blot performed on whole cell lysates from cells depicted in E at the end of the re-challenge treatment, n=3.

(I) Same as in H but after 6 days of release from treatment, (n=3).

3.3.9.3. Supplemental tables

Table 3.1. Transcription factors cloned for overexpression.

Number of restriction sites present in each CDS per enzyme, and enzymes chosen for cloning (colored)									
In all mRNA:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
(cds size)	RUNX1 1443nt	ETV4 1455nt	POU2F1 2268nt	MAFB 972nt	EHF 903nt	FOS 1143nt	cJUN 996nt	THRB 1386nt	GATA1 1242nt
BglII	1	2	1		2			1	1
BamHI	2		2		1			1	3
BstXI	3	1	8	3	2	2	1	4	3
SnaBI*			1		1				
BsaA1*		1	3		2		1	3	
BsaBI*					1		1		
PfIMI	1	1	11	1	1			1	2
NotI						1	1		
XhoI	2			2					
NsiI	1		4	2	3	1		4	
HpaI*	1						3	2	
AgeI							1		
StuI*	1		2	1		1		2	2
AccI	2		5		1	1	2	1	
Sall	1						1		
HindIII	2		7	1	1			4	2
ClaI									
Primers used for cloning									
Sites	5' – BsaA1: YAC^GTR					3' – NotI: GC^GGCCGC			
Primer name	5' BsaA1 K RUNX1					3' NotI stop RUNX1			
Sequence 5'-3'	gacTACGTA gccacc ATGGCTTCAGACAGCATATTTGA					gacGCGGCCGC TCAGTAGGGCCTCCACACG			
Sites	5' – BamHI: G^GATCC					3' – NotI: GC^GGCCGC			
Primer name	5' BamHI K ETV4					3' NotI stop ETV4			
Sequence 5'-3'	gacGGATCC gccacc ATGGAGCGGAGGATGAAAGC					gacGCGGCCGC CTAGTAAGAGTAGCCACCCTTG			
Primer name	5' BamHI K MAFB					3' NotI stop MAFB			
Sequence 5'-3'	gacGGATCC gccacc ATGGCCGCGGAGCTGAGCAT					gacGCGGCCGC TCACAGAAAGAACTCGGGAGA G			
Sites	5' – NotI: GC^GGCCGC					3' – XhoI: C^TCGAG			
Primer name	5' NotI K POU2F1(1L)					3' XhoI stop POU2F1(1L)			
Sequence 5'-3'	gacGCGGCCGC gccacc ATGCTGGACTGCAGTGAATATG					gacCTCGAG TCACTGTGCCTTGAGGCCG			

Primer name	5' NotI K EHF	3' XhoI stop EHF
Sequence 5'-3'	gac GCGGCCGC gccacc ATGATTCTGGAAGGAGGTGGTG	gac CTCGAG TCAGTTTTTCATTTTCTCTCCATC C
Primer name	5' NotI K THRB	3' XhoI stop THRB
Sequence 5'-3'	gac GCGGCCGC gccacc ATGACTCCCAACAGTATGAC AGAA	gac CTCGAG CTAATCCTCGAACACTTCCAAG AA
Primer name	5' NotI K GATA1	3' XhoI stop GATA1
Sequence 5'-3'	gac GCGGCCGC gccacc ATGGAGTTCCCTGGCCTGG	gac CTCGAG TCATGAGCTGAGCGGAGCCA
Sites	5' – BamHI: G[^]GATCC	3' – XhoI: C[^]TCGAG
Primer name	5' BamHI K FOS	3' XhoI stop FOS
Sequence 5'-3'	gac GGATCC gccacc ATGATGTTCTCGGGCTTCAACG	gac CTCGAG TCACAGGGCCAGCAGCGTGG
Primer name	5' BamHI K JUN	3' XhoI stop JUN
Sequence 5'-3'	gac GGATCC gccacc ATGACTGCAAAGATGGAAACGAC	gac CTCGAG TCAAAATGTTTGCAACTGCTGC G

*blunt

Kozak: gccacc atg

Stop: ...tga / taa / tag

All enzymes were used in buffer 3.1

Table 3.2. List of antibodies used in this article.

For Western-blots:					
Target protein	Company	Cat. No.	Lot #	Host	Dilution
MCM6	Bethyl Laboratories	A300-194A	2	Rabbit	1:1000
P21	BD Pharmingen	556431	8262957	Mouse	1:750
phospho-ERK 1/2 (p44/p42) Thr202/Tyr204	Cell Signaling	4370	15	Rabbit	1:2000
Total ERK 1/2 (p44/p42)	Cell Signaling	9102	27	Rabbit	1:1000
phospho-P90/RSK	Santa Cruz	sc-377526	G2717	Mouse	1:1000
α -TUBULIN	Sigma-Aldrich	T6074	023M4813	Mouse	1:10 000
phospho-RB Ser795	Cell Signaling	9301	13	Rabbit	1:750
phospho-P53 Ser15	Cell Signaling	9286	15	Mouse	1:1000
Total P53	Santa Cruz	sc-126	I2817	Mouse	1:1000
phospho-Histone H3 Ser10	Millipore	06-570	3595103	Rabbit	1:750
phospho-NF- κ B P65 Ser536	Cell Signaling	3033	12	Rabbit	1:500
ETV4	Abcam	ab189826	GR3408434-2	Rabbit	1:1000
RUNX1	Abcam	ab23980	GR3427138-1	Rabbit	1:1000
OCT1	Santa Cruz	sc-8024	D0418	Mouse	1:750
MAFB	Santa Cruz	sc-376387	J2921	Mouse	1:750
EZH2	Cell Signaling	5246	5	Rabbit	1:1000
phospho-c-RAF (Ser338)	Cell Signaling	9427	6	Rabbit	1:1000
Total RAF1	Santa Cruz	sc-133	C0515	Rabbit	1:1000
phospho-MEK 1/2 (Ser217/221)	Cell Signaling	9121	56	Rabbit	1:1000
Total MEK 1/2	Cell Signaling	9122	14	Rabbit	1:1000
DUSP6	Abcam	ab76310	GR33384-3	Rabbit	1:1000

c-MYC	Santa Cruz	sc-789	K0215	Rabbit	1:1000
ER α	Santa Cruz	sc-543	K1715	Rabbit	1:1000
Total Histone H3	Abcam	ab1791	GR206453-1	Rabbit	1:15 000
anti-rabbit IgG (H-L) conjugated to HRP	Bio-Rad	170-6515	64126042	Goat	1:3000
anti-mouse IgG (H-L) conjugated to HRP	Bio-Rad	170-6516	64132955	Goat	1:3000
For Immunofluorescence:					
Target protein	Company	Cat. No.	Lot #	Host	Dilution
γ H2A.X Ser139	Millipore	05-636-I	2552645	Mouse	1:100
53BP1	Calbiochem	PC712	D00137736	Rabbit	1:200
ETV4	Invitrogen	PA5-99226	XI3689746	Rabbit	1:250
RUNX1	Abcam	ab23980	GR3427138-1	Rabbit	1:250
PML	Bethyl Laboratories	A301-167A	2	Rabbit	1:600
For Immunohistochemistry:					
Target protein	Company	Cat. No.	Lot #	Host	Dilution
ETV4	Invitrogen	PA5-99226	XI3689746	Rabbit	1:350
RUNX1	Abcam	ab23980	GR3427138-1	Rabbit	1:250

Table 3.3. List of qPCR primers and shRNAs used in this article.

qPCR primers		
Gene	Forward Primer	Reverse Primer
CXCL1	5'-TCCTGCATCCCCCATAGTTA-3'	5'-CTTCAGGAACAGCCACCAGT-3'
CXCL2	5'- GCCCATGGTTAAGAAAATCATC G-3'	5'- TTCAGGAACAGCCACCAATAAG C-3'
CXCL3	5'- AAAATCATCGAAAAGATACTGA ACAAG-3'	5'- TCTGGTAAGGGCAGGGACCAC-3'
CXCL5	5'- TCTGCTATGCTATTGAAGTTTTG G-3'	5'- TCACCTACAATTCAAGACACTTT GA-3'
CXCL6	5'-GGGTCCTTCGGGCTCCTTGT-3'	5'-GCACAGCAGAGACAGGACCA-3'
CXCL10	5'- TGAAAGCAGTTAGCAAGGAAAG GT-3'	5'- TGGCTTGACATATACTCCATGTA GGG-3'
IL1A	5'- CGGTTGAGTTTAAGCCAATCCAT C-3'	5'- GGTGCTGACCTAGGCTTGATGA- 3'
IL1B	5'- CTCCGGGACTCACAGCAAAAA-3'	5'- AAGGACATGGAGAACACCACTT G-3'
IL6	5'- CCAGGAGCCCAGCTATGAACTC- 3'	5'-AAGGCAGCAGGCAACACCAG-3'
IL8	5'- GGCACAACTTTCAGAGACAGC A-3'	5'- GGCAAACTGCACCTTCACACA- 3'
IL33	5'- AACCACCAAAGGCCTTCACTG- 3'	5'- CCAAAGGCAAAGCACTCCACA-3'
SERPINB4	5'- GGATCTCACCTTCATTCCACAG -3'	5'- TGGTGAACCTCGATGTGATCTGGA -3'
ETV4	5'- TTATGAGAAAGGCATCATGCAG- 3'	5'- CCTCGGGCTCACACACAACTT- 3'
RUNX1	5'- TCGGCTGAGCTGAGAAATGCTA- 3'	5'- TGGGTTTGTGAAGACAGTGATGG -3'
CDKN2A/P16	5'- CCCAACGCACCGAATAGTTACG- 3'	5'-GCTGCCCATCATCATGACCT-3'

CDKN1A	5'-ACCCTTGTGCCTCGCTCAGG-3'	5'-GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCTGT-3'
KI67	5'-AGAAGACAGTACCGCAGATGA-3'	5'-CGGCTCACTAATTTAACGCTGG-3'
TBP	5'-GCTGGCCCATAGTGATCTTTGC-3'	5'-CTTCACACGCCAAGAAACAGTGA-3'
HMBS	5'-AACGGCAATGCGGCTGCAA-3'	5'-GGGTACCCACGCGAATCAC-3'
shRNAs		
Name	Vector	Sequence (sense strand 5'-3')
shNTC	MLPX-neo	ATAGCGACTAAACACATCAATT
shERK2#94	MLPX-neo	ACTACACCAAGTCCATTGATAT
shERK2#95	MLPX-neo	CAGACCTGAATTGTATAATAAA
shETV4#67	MLPX-neo	ATCCGATACTATTATGAGAAAG
shETV4#68	MLPX-neo	ACCTGAGAAATTTGAAGGAGAC
shETV4#69	MLPX-neo	ACCCGAGGCCCTCTTCTCTTTG
shRUNX1#43	MLPX-neo	AGCACTGGCGCTGCAACAAGAC
shRUNX1#44	MLPX-neo	CAGATTTAATGACCTCAGGTTT
shRUNX1#45	MLPX-neo	AACCATCACTGTCTTCACAAAC
shOCT1#70	MLPX-neo	CGCTGATCAGCTCAATATGGAA
shOCT1#71	MLPX-neo	AACAGAGCCAGTCAACACCAA
shOCT1#72	MLPX-neo	CGCAGAGAACCTCTCATCTGAT
shMAFB#73	MLPX-neo	ACCACAGCCGCTGCAAAGCTTC
shMAFB#74	MLPX-neo	AACCATCACCATCATCACCAAG
shMAFB#75	MLPX-neo	AATGGAGTATGTCAACGACTTC

4. Sénescence et vieillissement prématuré dans un modèle murin de déficience conditionnelle en Rsl1d1

4.1. Mise en contexte de l'article 3

Ce troisième article origine d'un projet que j'ai commencé durant ma deuxième année de doctorat, en parallèle de mon projet principal présenté dans la section précédente. De ce fait, ces projets se voulaient initialement complémentaires du fait que dans l'article 2 on étudie l'engagement vers la sénescence, alors que dans cet article on étudie plutôt la maintenance de ce phénotype via l'induction de défauts de ribogénèse. Toutefois, considérant la littérature et les résultats obtenus à l'article 2, notre modèle actuel qui sera détaillé davantage dans la discussion nous porte à croire que l'engagement vers la sénescence est probablement causé par la décondensation de régions précises du génome, plutôt qu'une décondensation globale aléatoire. Plus précisément, nous pensons que la décondensation de l'hétérochromatine périnucléolaire jouerait un rôle clé dans l'induction du phénotype sécrétoire et l'arrêt stable de prolifération en induisant des défauts de biogénèse des ribosomes qui permettraient de stabiliser la sénescence. Ainsi, dans cet article, nous décrivons la génération d'un modèle murin transgénique développant un phénotype de vieillissement prématuré induit par la déplétion conditionnelle d'un facteur impliqué dans la biogénèse des ribosomes, soit *Rsl1d1*. Dans ces souris nommées Rickdo (Ribosomal L1 domain-containing protein 1 conditional knockdown), le pool de cellules étant sénescents suggère une atteinte principale des cellules souches comme origine du phénotype. Une caractérisation plus approfondie de ce modèle sera requise afin de comprendre les mécanismes moléculaires responsables des phénotypes observés. Néanmoins, la dégénérescence fonctionnelle de plusieurs compartiments de cellules souches ayant déjà été liée à la pathogénèse de plusieurs maladies associées au vieillissement dont le cancer, l'emploi de ce modèle transgénique pourrait s'avérer utile dans le futur pour tester l'efficacité de thérapies visant à améliorer la fonction des cellules souches dans le vieillissement.

4.2. Contribution à l'article 3

L'article 3 de cette thèse représente un second projet que j'ai entrepris en parallèle de mon projet principal (présenté à la section précédente) durant mon doctorat. Ainsi, j'ai conçu toutes les expériences présentées dans cet article. C'est également moi qui ai généré le modèle murin transgénique à partir des chimères reçues de la compagnie *Mirimus*. Pour ce faire, j'ai croisé les chimères avec des souris exprimant la Cre recombinase afin d'exciser la cassette Stop en amont du transactivateur Tet contrôlant l'expression de notre shRsl1d1. J'ai ensuite rétrocroisé ce modèle sur 7 générations afin de générer un modèle congénique. Tous les génotypages ont cependant été effectués par Guillaume Bernas et Jean-François Schmouth de la plateforme de transgénèse et modélisation animale du CRCHUM. J'ai effectué pratiquement toutes les expériences présentées dans cet article à l'exception de : la qPCR en Figure 4.4L réalisée par Véronique Bourdeau, le dosage d'insuline en Figure 4.7G réalisé par Mélanie Guévremont de la plateforme de physiologie cellulaire du CRCHUM et les marquages immuno-histochimiques en Figure 4.3D-E effectués par Liliane Meunier et Véronique Barrès de la plateforme de pathologie du CRCHUM. J'ai ainsi fait des clonages et des RT-qPCR, ainsi que toutes les expériences de culture cellulaire, essais de croissance, westerns-blots, immunofluorescences, essais SA- β -gal, bio-imagerie par fluorescence, microtomographie aux rayons X (micro-CT), analyses de composition corporelle (EchoMRI) et tests de tolérance au glucose (OGTT). J'ai également effectué l'analyse des résultats et généré tous les graphiques. En ce qui concerne les plasmides utilisés dans cet article, j'ai cloné les shARNs contre Rsl1d1 murin, ainsi que la surexpression murine WT et RsMut. Les constructions RSL1D1 WT et Δ C-term humains furent quant à elles clonées par Frédéric Lessard. Marie-Camille Rowell m'a assisté techniquement lors de toutes les nécropsies effectuées dans le cadre de ce projet et elle a également fourni une contribution intellectuelle et technique dans la réalisation de l'expérience d'OGTT. Le manuscrit a été rédigé par Gerardo Ferbeyre et moi, puis relu par chacun des auteurs.

4.3. Article 3

Senescence and premature aging in conditional Rsl1d1 deficient mice

Stéphane Lopes-Paciencia^{1,2}, Marie-Camille Rowell^{1,2}, Véronique Bourdeau², Frédéric Lessard³,
Gerardo Ferbeyre^{1,2}

In preparation for BioRxiv.

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

²Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, QC H3C
3J7, Canada

³Laboratory of Growth and Development, St-Patrick Research Group in Basic Oncology, Cancer
Division of the Quebec University Research Centre, (CRCHU de Québec - Université Laval), QC,
G1R 3S3, Canada

Corresponding author: g.ferbeyre@umontreal.ca

4.3.1. Abstract

Reduced expression of ribosome biogenesis factors as well as decreased transcription and processing of rRNA are hallmarks of cellular senescence. These defects ultimately lead to nucleolar alterations and stable proliferation arrest through ribosomal proteins-mediated CDKs inhibition and p53 activation. Consequently, we report here that alterations in the expression or nucleolar localization of the ribosome biogenesis factor Rsl1d1 leads to cellular senescence in normal human and mouse cells. Furthermore, we generated a transgenic mouse model for conditional inactivation of Rsl1d1 expression through shRNA. Knockdown in adult mice leads to a premature aging phenotype characterized by alopecia, subcutaneous lipodystrophy, kyphosis and accumulation of adipocytes in the bone marrow. Rsl1d1 knockdown mice accumulate senescent cells in high turnover tissues such as the hair follicles and the testis, suggesting that the stem cell compartment might be very sensitive to ribosome biogenesis inhibition. This work provides new mechanistic insights to understand stem cell senescence and a new mouse model to test interventions to rejuvenate stem cell functions during aging.

Keywords: Rsl1d1, Ribosome biogenesis, Stem cells, Senescence, Alopecia, Kyphosis, Premature aging, Lipodystrophy, Transgenic mouse model

4.3.2. Introduction

Accumulation of uncleared senescent cells plays a driving role in the pathogenesis of age-related diseases and aging itself. This concept is well supported by evidence showing accumulation of senescent cells in several tissues with age (89,132,406,549) and the ability of senescent cells to accelerate aging when injected in mice (374). In addition, mouse models that increase the generation of senescent cells display a premature aging phenotype (134,550,551) while elimination of senescent cells increases both health span and lifespan in mice (134,415,552,553) and ameliorates several age-related diseases (346-348,373,375,407,554-556).

The mechanisms leading to accumulation of senescent cells with age are not well understood. Telomere dysfunction (557), increased DNA damage (558-560), loss of epigenetic control (561) and alteration in the immune system (562) are sufficient to trigger accumulation of senescent cells and premature aging but none of them in isolation are essential for it (563-565). Thus, it is likely that a combination of multiple factors underpins the origin of organismal aging by increasing senescent cells burden.

An additional pro-senescence factor is nucleolar stress (219,246,566,567) but it is not known whether direct perturbations in nucleolar functions leads to senescence and aging *in vivo*. Here we show that altering the functions of the nucleolar ribosome biogenesis factor Rsl1d1 leads to cellular senescence in cell culture using both human and mouse cells. Conditional knockdown of Rsl1d1 in adult mice leads to signs of premature aging and accumulation of senescent cells in stem cell compartments. We discuss the role of ribosome biogenesis for maintaining stem cells and suggest the potential use of our mouse model to test interventions aimed to restore stem cell functions.

4.3.3. Results

4.3.3.1. Alterations in RSL1D1 levels trigger senescence

RSL1D1 (Ribosomal L1 Domain-Containing Protein 1) is a ribosome biogenesis factor required for proper maturation of rRNA (568) through the nucleolar recruitment of additional ribosome biogenesis factors such as Nucleostemin (NS) (219,242). Our lab has previously shown that knockdown of RSL1D1 in human cells led to defects in ribosome biogenesis (ribogenesis) and accumulation of ribosomal proteins outside of the ribosomes, ultimately leading to inhibition of

CDK4 and induction of an RB-dependent senescence (219). In order to validate that senescence induced by knockdown of RSL1D1 (Figure 4.1A-B) was dependent on an alteration of its nucleolar functions, we forced RSL1D1 out of the nucleolus to see if we could phenocopy senescence induction. To do so, we overexpressed a dominant negative mutant of RSL1D1 lacking its 35 last amino acids (Δ C-term) containing the nucleolar localization signal (Figure 4.1C-D). As expected, this mutant led to a loss of RSL1D1 signal at the periphery of the granular component (GC) of the nucleolus, accompanied by its nucleoplasmic accumulation (Figure 4.1C). Interestingly, this mutant also decreased nucleolar levels of Nucleolin (NCL), another GC-associated ribogenesis factor. This suggests that RSL1D1's function may not be limited to NS, but rather, that it may have a more global role in the recruitment of GC-associated factors. Overexpression of Δ C-term mutant induced growth arrest and cellular senescence (Figure 4.1E-F), suggesting that indeed, disturbance of RSL1D1's nucleolar functions underpins senescence induction upon its knockdown. Of note, overexpression of wild type RSL1D1 also induced senescence. This was associated with a significant accumulation of its levels in the nucleoplasm but without a decrease in NCL nucleolar levels. In this context, this might be due to its reported inhibitory effect on HDM2 upon nucleolar stress (569). To test this, we inactivated the P53 or the RB pathways using papillomavirus E6 or E7 oncoproteins in the context of RSL1D1-induced senescence. While both pathways inactivation restored proliferation, P53 inactivation seemed more efficient to restore growth, suggesting that its activation played an important role in this senescence phenotype (Figure 4.5).

4.3.3.2. Rsl1d1 depletion in mouse progenitor myoblasts induces senescence

Ribosome biogenesis is an important anticancer target as cancer cells rely more heavily on this process to sustain their increased proliferation state. Therefore, several clinical trials using drugs impacting ribogenesis factors such as RNA polymerase I are currently ongoing (570). However, most of these drugs are associated with adverse side-effects such as thrombocytopenia and neutropenia (241). Thus, less toxic alternatives to inhibit ribosome biogenesis could be relevant for anticancer treatments. To test this, we decided to generate a transgenic mouse model for conditional inhibition of Rsl1d1 which acts at the rRNA processing level rather than rRNA transcription. However, we first wanted to assess whether depletion of Rsl1d1 also induced senescence in mouse cells or if this was restricted to human cells. Thus, since stem cells and progenitors cells are the normal cells with the highest levels of ribogenesis (571), we depleted

Rsl1d1 in mouse C2C12 myoblasts using two shRNAs (Figure 4.2A-B) to see if we recapitulated the senescence phenotype. Both shRNAs induced senescence in these cells as observed by a decrease in cell proliferation (Figure 4.2C), increase in phospho-p53 and p21 (Figure 4.2D), a decrease in mitotic marker phospho-H3 (Figure 4.2D), increased SA β Gal positive cells (Figure 4.2E) and increased expression of Il6 proinflammatory cytokine (Figure 4.2F). Of note, overexpression of a mutant Rsl1d1 insensitive to shRNA#86 allowed partial rescue of Rsl1d1 expression in cells expressing this shRNA and this was accompanied by a concomitant reversal of above-mentioned senescent phenotypes (Figure 4.2A-F).

4.3.3.3. Generation of Rsl1d1 conditional knockdown mice

To generate Ribosomal L1 Domain-Containing Protein 1 conditional knockdown (Rickdo) mice, we used the shRNA#86 validated and described above (Figure 4.2). This shRNA was cloned in a targeting vector downstream of the turboGFP reporter gene under the control of the Tet-regulated promoter. The targeting cassette was then inserted into the Colla1 locus of D34 embryonic stem cells using flippase mediated recombination. D34 cells have a reverse tetracycline-controlled Tet transactivator 3 (rtTA3) transgene coupled to the expression of the mKATE2 fluorophore at the endogenous Rosa26 locus. This transgene is however silenced by an upstream transcription termination signal (STOP) flanked by two LoxP sites that can be targeted by the Cre-recombinase. The double transgenic stem cells were used to generate chimeric mice (see full description in Material and methods) from which we rederived a congenic line by backcrossing them into C57BL/6NJ background for 7 generations. The resulting line was then crossed with Cre recombinase-expressing mice to remove the STOP cassette, which was silencing the expression of the Tet activator, thus generating the Rickdo mice (Figure 4.3A) with the expected PCR amplification pattern for both transgenes (Figure 4.3B). Induction of the shRsl1d1 in Rickdo mice can be easily followed by monitoring turboGFP expression with the opti-mx2 imaging system (Figure 4.3C). Of note, Rickdo female mice were initially mosaic for the activation of the Tet transgene because the Cre recombinase-expressing strain used to eliminate the STOP signal in the Tet-activator cassette expressed Cre from the X chromosome. Therefore, as expected from the genetic model, in these mosaic females, the reduction of Rsl1d1 expression was only seen in cells that expressed turboGFP (Figure 4.3D), illustrating the specificity of the transgenes. In males,

however, all cells have reduced *Rsl1d1* expression (Figure 4.3E). For subsequent studies we generated both males and females where the Tet activator was expressed in all cells (Figure 4.6).

4.3.3.4. Phenotype of Rickdo mice

Rickdo mice are phenotypically indistinguishable from normal mice since the model requires treatment with doxycycline to activate the Tet and allow it to bind the Tet-Responsive Elements (TRE) to drive the expression of the shRNA against *Rsl1d1*. Also, to avoid any toxicity during mouse development, we only started to induce the expression of sh*Rsl1d1* once mice reached adulthood at 3-4 months of age. Surprisingly, inducing the shRNA against *Rsl1d1* did not trigger any visible alteration in these mice for up to 2-3 months. Interestingly, this long period of innocuity suggests a therapeutic window for anticancer therapies targeting ribogenesis. After 2-3 months of doxycycline treatments, mice progressively developed full alopecia and kyphosis, and failed to gain weight as normal mice (Figure 4.4A-C and Figure 4.7A). Importantly, alopecia and kyphosis occur in several mouse models of accelerated aging (551,572). Of note, kyphosis was accompanied by calcification in the peritoneum cavity (Figure 4.4B box), a feature generally associated to chronic inflammation as observed in arthritis. Weight reduction relative to wild type mice was mainly due to a lack of adipose mass gain (Figure 4.7B) since both lean mass and hydration were not altered in Rickdo mice (Figure 4.7B-D). As observed in natural aging (573), organ weight normalized to body weight increased in Rickdo mice (Figure 4.4D-H), particularly in the testis (Figure 4.4G) and spleen (Figure 4.4H-I). Of note, splenomegaly is common in aging mice due to extramedullary hematopoiesis compensating for a bone marrow failure (572). Consistent with this explanation, the bone marrow in Rickdo mice was infiltrated with adipocytes (Figure 4.4J), a feature of a failing bone marrow during aging (574).

Since Rickdo mice were mostly affected in tissues with high turnover from adult stem cells, we examined the skin for the presence of senescent cells. We found senescent cells in the hair follicles (Figure 4.4K) as previously reported in a mouse model of accelerated aging secondary to p63 deficiency (550). Hair follicles undergo cycles of growth (anagen), regression (catagen) and rest (telogen). Hair follicle stem cells are located in the bulb which is in the mid portion of the hair follicle during anagen (575). During aging, the telogen phase is extended and the normal transition from telogen to anagen does not happen, leading to hair loss (alopecia). The bulb during telogen is located closer to the base of the hair follicle (575) where we detected senescent cells (Figure 4.4K).

Also, we measured the efficiency of ribosome biogenesis by looking at the ratio between early processed rRNAs (30S+45S) and the primary transcript (47S) by RT-qPCR on RNA extracted from the skin. As expected, the ratio was dramatically increased in Rickdo mice skin, indicating a defective rRNA maturation (Figure 4.4L). Since most of the cells in the skin did not stain for the SA β Gal biomarker, this result suggests that stem cells are particularly sensitive to altered ribosome biogenesis. Interestingly, accumulation of SA β Gal positive cells in Rickdo mice were also noticeable in the testis, seminal vesicles and the pancreas (Figure 4.4M-O). In the testis, senescent cells accumulated in the periphery of the seminiferous tubules where spermatogonia and Sertoli cells are located. In addition, interstitial Leydig cells were also SA β Gal positive (Figure 4.4M).

4.3.3.5. Rickdo mice do not develop insulin resistance with age

The combination of obesity, glucose intolerance, dyslipidemia and high blood pressure defines the metabolic syndrome (MS) which is strongly associated to mortality, cardiovascular disease and diabetes (576). Although the prevalence of metabolic syndrome increase with age, it does not define normal aging (577). In addition to lower weight, Rickdo mice's adipocytes in the white adipose tissue were smaller, suggesting less fat accumulation (Figure 4.7E). Moreover, their brown adipose tissue contained less multilocular lipid droplets, indicative of active fat oxidation (Figure 4.7E). Since diet-related dyslipidemia underpins insulin resistance and MS (578), we next studied glucose metabolism in Rickdo mice. First, fasting glycemia and insulin were lower in Rickdo mice induced with doxycycline for 6 months in comparison to age matched wild type mice (Figure 4.7F-G). Furthermore, in an oral glucose tolerance test, Rickdo mice cleared glucose better than wild type mice as shown by a significant reduction of the area under the curve (AUC) (Figure 4.7H). These results indicate that Rickdo mice age faster but without signs of metabolic syndrome.

4.3.4. Discussion

We report here the generation of a mouse model of premature aging driven by conditional inactivation of ribosome biogenesis, the Rickdo mice. In particular, tissues with high cellular turnover such as the skin, testis and the bone marrow were predominantly affected, suggesting that stem cells are highly susceptible to perturbations in ribosome biogenesis. In the skin, senescent cells were visualized at the bulb of the hair follicles, where hair follicle stem cells are located. In testis, senescent cells were among other visualized at the periphery of seminiferous tubules, where

spermatogonia stem cells are located. In the bone marrow, Rickdo mice accumulated adipocytes. These cells originate from mesenchymal stem cells (MSC), which are normally able to give rise to both adipocytes and osteogenic precursors. Aging favours the adipocyte fate of MSCs and both cell autonomous defects in old MSCs and altered microenvironment have been found to mediate this bias (579,580). These adipocytes could further impair the functions of hematopoietic stem cells and bone regeneration via the production of Dipeptidyl peptidase-4 (581) a protease that is also highly expressed in senescent cells (582). Senescent stem cells can also impair normal tissue functions by failing in their function to replace lost cells or by secreting pro-inflammatory factors that further impair tissue homeostasis (583).

A link between the nucleolus and stem cell functions was initially proposed with the discovery of nucleostemin, a protein preferentially expressed in the nucleoli of stem cells and cancer cells. Depletion or overexpression of nucleostemin reduced cell proliferation in stem cells and cancer cells (584). Nucleostemin plays a role in pre-rRNA processing forming a complex with rRNA processing factors DDX21, EBP2 and Pes1(585). RSL1D1 is a partner of Nucleostemin (242), DDX21 and EBP2 required for their stability (219). In *Drosophila*, the mutation *udd¹* (under developed¹) leads to germ cell loss in ovaries and testis. Udd forms a complex with RNA polymerase I, allowing higher production of rRNA in germ cells. This study suggest that stem cells require a higher level of ribosome production (586). This concept was then extended to mouse embryonic stem cells that express high levels of several ribosome biogenesis factors required for maintenance of pluripotency via high global translation rates, which are critical to sustain the levels of labile pluripotency factors such as *Nanog* and *Esrrb* (587). Future studies are required to investigate the precise maturation defects in rRNA as well as translation capacity in Rickdo mice. However, given the long time required to observe defects in these mice and the fact that these defects were likely linked to stem cell dysfunction, it is very probable that both rRNA processing and translation were more compromised in stem cells.

One intriguing characteristic of Rickdo mice is that they undergo an accelerated aging without signs of MS. The latter is characterized by insulin resistance, lipid abnormalities, impaired glucose tolerance and hypertension (the deadly quartet). Among these factors, insulin resistance seems to be the stronger predictor of serious illness and mortality (588). Reducing insulin levels enhances insulin sensitivity and prolongs lifespan in mice (589), suggesting that insulin resistance

is secondary to hyperinsulinemia. However, aging in human and rodents often involves a reduction in insulin secretion (590,591), indicating that hyperinsulinemia and insulin resistance is not a fundamental trait of aging. Since wild type mice gain weight as they age under an *ad libitum* regime, it is plausible that high glucose, high insulin levels and insulin resistance in these mice is due to their rich diet. Consistent with this idea, aging or a high fat diet alone were not associated to insulin resistance in mice, but their combination did (578). In this perspective, Rickdo mice do not develop MS probably because they do not accumulate lipids. This could be secondary to a decrease in food intake or an increase in lipid oxidation. Future studies are required to measure food intake in Rickdo mice, but we noticed less lipids in their BAT, which is consistent with an increase in lipid oxidation. Another possible explanation concerns the immune system. In mouse models of obesity, insulin resistance is critically dependent on gut associated immune cells (592,593). It is plausible that immune cell infiltration in aging organs is attenuated in Rickdo mice due to the constraints imposed to cell proliferation by reduced ribosome biogenesis.

We thus propose that Rickdo mice provide an *in vivo* model of aging due to stem cell dysfunction without MS. Caloric restriction (CR) mostly affect MS but not stem cell dysfunction and that is the reason it is not always effective (594). Like with CR, Rickdo mice are lean, contain less WAT and more BAT but still, they display signs of premature aging. Therefore, Rickdo mice could be useful to assess the potential of pharmacological or dietary interventions to improve stem cells during aging.

4.3.5. Materials and methods

Reagents

Doxycycline hyclate (D9891), D-(+)-Glucose (G8270) and crystal violet (C6158) were purchased from Sigma. Sucrose (SUC507.1) was purchased from Bioshop. X-Gal (800-145-UG) was purchased from Wisent.

Plasmids

Retroviruses pBABE(puro), pLXSN(neo), pLXSN-E6, pLXSN-E7 were described previously (219). The MLPXneo backbone which was used to clone the following shRNAs (shNTC, shRsl1d1#85, shRsl1d1#86) was generated by subcloning the Neomycin resistance cassette (Neo^r) from the MSCVneo plasmid into AgeI/ClaI restriction sites in MLPpuro. shRNAs

were cloned into XhoI/EcoRI restriction sites as described (542). Human shRNAs against RSL1D1 (A and B) were purchased from Sigma (TRCN0000159162 and TRCN0000159486). Human RSL1D1 cDNA was PCR-amplified and subcloned in BamHI/EcoRI restriction sites to create pBABE-RSL1D1(WT). Δ C-term mutant of human RSL1D1 was generated by PCR-amplifying RSL1D1 from pBABE-RSL1D1(WT) using primers introducing a premature stop codon at the amino acid 456. It was then re-introduced in pBABE plasmid, thus generating a mutant containing amino acids 1-455. Mouse Rsl1d1 cDNA was PCR-amplified from RNA extracted from genotype control mouse skin and subcloned in BamHI/SnaBI restriction sites to create pBABE-Rsl1d1(Mm). shRNA-insensitive mutant of mouse Rsl1d1 (RsMut) was cloned by site-directed mutagenesis from pBABE-Rsl1d1(Mm) to change the shRNA-targeted sequence: 5'-ACT CCA GAT AAA GAA AAT GTA AAG-3' for 5'-ACT CCT GAC AAG GAG AAC GTC AAG-3'. This allowed for insertion of 6 point mutations, decreasing shRNA affinity for the targeted sequence. For PCR primers used for cloning see Supplementary Table 4.1.

Cells and viral gene transfer

Phoenix amphi packaging cells used to generate retroviral particles were a gift from S. W Lowe. HEK-293T cells used to generate lentiviral particles were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Normal human diploid fibroblast cell line IMR90 were obtained from Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ). Murine myoblast C2C12 cells were a gift from P. Chartrand. All abovementioned cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM #319-015-CL; Wisent) supplemented with 10% FBS (FBS, Cat.no. 12483020 Gibco for Phoenix and HEK293T; or FBS Premium, Cat.no. 091-150 Wisent for IMR90 and C2C12), 1% penicillin / streptomycin sulfate (Cat.no. 450-201-EL, Wisent) and 2 mM L-glutamine (Cat.no. 609-065-EL, Wisent).

Retroviral and lentiviral-mediated gene transfer were done as previously described (219), but doing only one round of infection with either half a viral-soup or a quarter of a viral-soup. The viral soups were filtered using a 0.45 μ m filter, then supplemented with 4 μ g/mL of polybrene (Sigma) and poured on target cells. Twenty-four hours after infection, media was changed and thirty hours after infection, cells were selected with the following Wisent-purchased antibiotics: puromycin dihydrochloride (1.25 μ g/mL in IMR90/C2C12) and/or G418 (500 μ g/mL in IMR90/C2C12).

Western-blot

Western-blot were performed as previously described (219). For antibodies, see Supplementary Table 4.2.

Cell proliferation assays

Growth and colony forming assays were performed as previously described (219). Quantification was performed by a crystal violet retention assay. Briefly, 10,000 cells were plated either in a 10cm dish (for colony assay) or in several 12-well plates (for growth curves) with 3 technical replicates for each of the biological replicates. In order to get a normalized day 0, the next day, one plate of each condition was fixed with a 1% glutaraldehyde solution in PBS 1X for 10 minutes at room temperature, and then washed in PBS. Other plates were then fixed at different time-points. During each growth and colony assays, media was replaced every 2-3 days. After fixation of all time points, cells were stained for 30 mins at room temperature under agitation with a 0.1% crystal violet solution in PBS. The staining solution was then removed and plates were washed in tap water 15 times to remove all excess of crystal violet. Plates were then dried at room temperature overnight. The next day, crystal violet was dissolved in 10% acetic acid in water for 20 mins under agitation and then transferred in 96-wells plates to measure optical density (OD) at 590nm. Of note, for very confluent wells, twice or thrice the volume of 10% acetic acid was used to avoid saturation of dissolved crystal violet. OD values were multiplied by the appropriate factor and then normalized on values from day 0, prior to normalizing on each experimental internal control.

In vitro SA- β -gal assay

Six-well plates containing cells were first washed with PBS and then fixed with 0.5% glutaraldehyde in PBS for 15 mins at room temperature. Cells were then rinsed with PBS twice and then incubated 2x10 mins in a solution containing 1mM MgCl₂ in PBS at pH 6.0 (IMR90) or pH 5.5 (C2C12). This solution was then replaced by the pre-warmed (37°C) and pre-filtered (0.45 μ m) staining solution (PBS pH 6.0 or 5.5, 1mM MgCl₂, 1mg/mL X-Gal, 5mM potassium ferricyanide and 5mM potassium ferrocyanide) and cells were incubated for 1-6 hours at 37°C protected from the light. Reactions were stopped by replacing the staining solution with 100mM

Tris-HCl pH 8.0. Finally, pictures were taken with an Evos XL Core light microscope (AMEX1000 from Invitrogen).

In vivo SA- β -gal assay

Mice were first perfused with 10mL sterile PBS 1X and tissues of interest were harvested. Perfusion step allowed for removal of blood (containing high levels of iron) from tissues, thereby decreasing cross-reactivity of the staining solution (itself containing iron-based compounds). Tissues of interest were individually embedded and frozen in OCT (Sakura) on dry ice and then kept at -80°C. Tissues were either cut the same day or maximum 1 day after harvesting, due to time-limited activity of the β -galactosidase enzyme. Depending on the tissue, either 4 μ m or 10 μ m cuts were performed and slides were kept at -80°C. When ready for assay, slides were removed from -80°C and fixed in 0.2% glutaraldehyde in PBS 1X for 10 mins at 4°C. Slides were then rinsed once with PBS 1X, then washed for 10 mins again in PBS 1X and then incubated for 10 mins at room temperature in Permeabilization solution (0.02% NP-40 [Igepal], 0.01% sodium deoxycholate, and 2mM MgCl₂ in 0.1M phosphate buffer pH 6.0). Depending on the tissue of interest and the thickness of the cuts, slides were then incubated either overnight or for 1-8 hours at 37°C in the dark in pre-warmed (37°C) and pre-filtered (0.45 μ m) staining solution (0.02% NP-40 [Igepal], 0.01% sodium deoxycholate, 2mM MgCl₂, 1mg/mL X-Gal, 5mM potassium ferricyanide and 5mM potassium ferrocyanide in 0.1M phosphate buffer pH 6.0). To do so, \pm 1mL of staining solution was added on each slide to cover all tissues, and then slides were kept in a humid chamber within the 37°C incubator, in order to prevent evaporation from slides. For tissues requiring an overnight incubation, staining solution was refreshed in the morning. Once staining was sufficient, staining solution was removed and replaced by 4% PFA for 10 mins at room temperature to stop the enzymatic reaction. Slides were then rinsed once with PBS 1X, then washed for 10 mins again in PBS 1X and then washed 2 x 5 mins in ddH₂O. Tissues were then counterstained for \pm 40 secs using Haematoxylin (Harris) diluted 1/10 in ddH₂O. Slides were once again rinsed with ddH₂O to stop counterstain reaction and then washed in ddH₂O for 2 mins. Tissues were finally dehydrated by incubating slides in the following baths: 1 min in 40% ethanol, 1 min in 75% ethanol, 1 min in 95% ethanol, 1 min in 100% ethanol and then 2 x 5 mins in xylene. Slides were then removed from the last xylene bath and let to dry under the chemical hood for 45 mins. Finally, slides were mounted with CytoSeal and a coverslip, and let to dry overnight under the

chemical hood. Slides were then scanned using the Aperio Verso 200 slide scanner microscope with a 20×0.8 NA objective with a 0.275MPP resolution (Leica Biosystems).

Immunohistochemistry

Tissues were cut into 4µm slides. After deparaffinization, tissues were stained using the Benchmark XT automated stainer (Ventana Medical Systems, Roche). Antigen retrieval was then performed using Tris-EDTA buffer at pH 7.8 (Cell Conditioning #1 solution from Ventana Medical System Inc.) for 60 mins at 95°C. Slides were then incubated with anti-Rsl1d1 antibody (1:1000, sc-376302, Santa Cruz) or anti-turboGFP antibody (1:1000, PA5-22688, Invitrogen) for 60 mins at 37°C. DAB Detection Kit (Ventana Medical System Inc.) was then used to perform revelation. Finally, tissues were counterstained with hematoxylin and bluing reagent (Ventana Medical System Inc.). Slides were scanned using the Aperio Verso 200 slide scanner microscope with a 20×0.8 NA objective with a 0.275MPP resolution (Leica Biosystems). Image Scope software (Leica Biosystems) was used for visualization of slides.

Immunofluorescence

Immunofluorescence experiments were performed as previously described in (544). For the list of antibodies, see Supplementary Table 4.2. Images were acquired with a Zeiss Axio Imager Z2 upright microscope using a 63X objective with a sCMOS 16-bit Prime camera (Photometrics) and/or CCD 12-bit AxioCam MRm3 camera (Zeiss) and ZEN 2 Imager (2.0.14283.302). Images were processed using the ZEN Black Software.

RT-qPCR

For *in vitro* experiments, cells were washed with PBS 1X and then scrapped directly in the dish with 1mL of TRIzol (Invitrogen). For mouse tissues, 1mL of TRIzol was first added to an eppendorf and then a piece of ±20-50 mm³ of frozen tissue (kept at -80°C) was added to that eppendorf and homogenized using a Polytron PT1200E. Total RNA was then extracted from TRIzol samples according to the manufacturer's instructions and then reverse transcribed using All-In-One 5X RT MasterMix (ABM, Cat.no. G592). Gene expression was determined with a LightCycler 96 (software version 1.1) Real-Time PCR System (Roche Applied Science) or with a CFX384 (software CFX Maestro version 1.1) Real-Time system (Bio-Rad), using SYBR Green

technologies as described previously (219). qPCR primers are presented in Supplementary Table 4.1

Mouse husbandry

All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care Committee (CIPA) and performed in compliance with the guidelines from the Canadian Council on Animal Care (Ethics number: C18007GFs). Wild-type C57BL/6NJ or CMV-Cre mice were purchased from Jackson Laboratory and maintained at the animal facility of the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Transgenic mice were generated as described below.

Generation of Rickdo mice

Chimeric mice were generated according to (595) by the company Mirimus Inc. Briefly, they used D34 mouse embryonic stem cells (mESCs) of a mixed background (11.75% C57BL/6, 87.41% Het (B6/129) and 0.84% 129SVJ) which have a CAG-loxP-STOP-loxP-rtTA3-IRES-mKATE2 (CLR3K) cassette knocked-in their endogenous Rosa26 locus and a homing cassette containing a neomycin resistance gene (Neo^R) between two Flippase Recognition Target sites (FRT) at their endogenous Col1a1 locus. Then, recombinase flippase (FLP) was used to excise the PGK-Neo^R and insert a targeting vector containing a Tet-regulated shRsl1d1 with a reporter turboGFP and hygromycin resistance gene. Selection for integration of this plasmid was then performed using hygromycin. These genetically modified mESCs were then micro-injected into blastocysts from B6-tyr mice, allowing for quick visual assessment of chimerism levels depending on the pup's fur color (agouti vs white). Once received, the chimeras (shRsl1d1/+, LSL-Tet/+ mice) were back-crossed on a C57BL/6NJ background (Stock #005304_Jackson Laboratory) for 7 generations and then crossed with CMV-Cre mice (Stock #006054_Jackson Laboratory) to remove the LSL (loxP-STOP-loxP) cassette upstream of the Tet transactivator (rtTA3), thus generating shRsl1d1/+, Tet/+, Cre/+ mice. Cre was then bread-out from these mice, generating shRsl1d1/+, Tet/+ mice which express the Tet transactivator. Upon addition of doxycycline, the latter binds the TET, enabling its binding to the Tet-Responsive Element (TRE) upstream of the turboGFP and shRsl1d1 in the Col1a1 locus.

Genotyping

At weaning, an ear punch was harvested to identify mice and to proceed to genotyping. Genomic DNA was extracted using MyTaq™ Extract-PCR Kit (BIO-21126, Bioline) and PCR reactions were performed using protocols indicated in Supplementary Methods and primers indicated in Supplementary Table 4.1.

In vivo fluorescence imaging

Mice were anesthetized with 2% isoflurane and 1L/min oxygen and then placed in the eXplore Optix-MX2 system (ART Advanced Research Technologies, Inc., Montreal, Canada) to acquire images. Of note, during the whole procedure, mice's eyes were kept hydrated using eye ointment (Soothe Night Time - Bausch + Lomb). TurboGFP images were acquired with the LDH-P-C-470 laser scanning the ROI with a resolution of 3mm.

Micro-CT analysis

Mice were first anesthetized with 2% isoflurane and 1L/min oxygen and then imaged in a Skyscan 1176 micro-computed tomograph (micro-CT, Bruker) system equipped with a 20-90kV X-ray source, a distortion corrected 11Mp X-ray detector and 25W 6-position automatic filter changer. Images were acquired at 35µm spatial resolution. The rotation step size used for image acquisition was 0.4°. CTVox software was used for fast volumetric reconstruction of images to generate 3D mouse images.

Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

As mice were given doxycycline in water containing 0.5% sucrose, this solution was replaced by the same solution without sucrose two days before performing the experiment in order to avoid this bias. Then, on the day of the experiment, mice were fasted for 6 hours prior to performing the test. Meanwhile, a glucose stock solution at 0,666g/mL in water was prepared and then filtered (0.2µm). One hour before starting the experiment, the lean mass of each mouse was assessed using the EchoMRI system in order to determine the exact mass of glucose to be administered (2g of glucose per kg of lean mass). Individual eppendorfs containing 400µL of glucose solution were then prepared from the stock solution for each mouse, so that the mass of glucose required per mouse is in 100µL of water. Typically, mice received between 40 and 70mg of glucose depending on their lean mass. Of note, normalizing the glucose dose on lean mass rather

than the whole-body weight is important in order to avoid bias with fat mice. Indeed, glucose being mainly consumed by lean mass (brain, muscles, etc.) rather than fat mass, if glucose is normalized on whole-body weight for a fat mouse, it will exaggerate the amount of glucose this mouse should receive because the increased mass is only due to fat tissue accumulation and not lean mass. Thus, it could artefactually generate results indicating diabetes. After 6 hours of fasting, for each mouse, blood glucose concentration was assessed with a glucometer (Contour next one) for $t=0$ min and 40 μ L of blood was harvested into a Heparin-Lithium microvette (20.1292.100, Sarstedt) and then spined down following manufacturer's instructions in order to isolate plasma which was then kept on ice. Then a first mouse was administered a bolus of 100 μ L of glucose solution at 2g/kg of lean mass by gavage, and the chronometer was started. Each mouse gavage was then spaced from the previous with 3 minutes (maximum 5 mice at a time). At the equivalent of $t=15$ mins and $t=30$ mins for each mouse, blood glucose concentration was assessed with the glucometer and 40 μ L of blood was harvested into a Heparin-Lithium microvette. At the equivalent of $t=60$ mins, $t=90$ mins and $t=120$ mins for each mouse, only blood glucose concentration was assessed with the glucometer. All microvettes were all spun down and plasmas were transferred in new eppendorfs and kept at -80°C . Insulin levels were then measured on plasma samples by AlphaLISA Immunoassays.

Statistics and reproducibility

Statistical analysis (two-tailed Student's t-test) was performed using GraphPad Prism 8 and One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD Test using Astatsa website. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Number of biological replicates or mice are indicated for each panel in each figure legend. Experiments that were performed less than three times include technical triplicates.

4.3.6. Acknowledgements

We thank Liliane Meunier and Véronique Barrès from the Pathology facility at the CRCHUM for immunohistology staining of Rsl1d1 and turboGFP. We also thank Guillaume Bernas and Jean-François Schmouth from the Transgenesis and animal modelling facility for the genotyping of mice. Likewise, we thank Mélanie Guévremont from the Cellular physiology facility for the insulin dosage. Finally, we thank all the staff from the Animal facility for technical advice during the whole project. S.L.P. was supported by FRQS (Fonds de Recherche du Québec-Santé),

CIHR (Canadian Institutes of Health Research), Institut du cancer de Montréal and the Défi Canderel. G.F. is supported by the CIBC chair for breast cancer research.

4.3.7. Contributions

S.L.P. designed the experiments, generated the transgenic mouse model from chimeras, planned breeding and performed all *in vitro* and most of the *in vivo* experiments, including: cloning, cell culture experiments, growth assays, western blots, RT-qPCR, immunofluorescence, *in vitro* and *in vivo* SA- β -gal, fluorescence bio-imaging, micro-CT scans, EchoMRI experiments, OGTT experiments and data analysis. M.C.R. provided technical assistance for all necropsies performed in this project and the OGTT experiment. She also gave intellectual input for the OGTT experiment. V.B. performed RT-qPCR experiment on mouse skin samples in Figure 4.4K. F.L. cloned the WT human RSL1D1 gene in pBABE retroviral construct and generated the Δ C-term mutant. S.L.P. and G.F. wrote the manuscript.

4.3.8. Main figures and legends

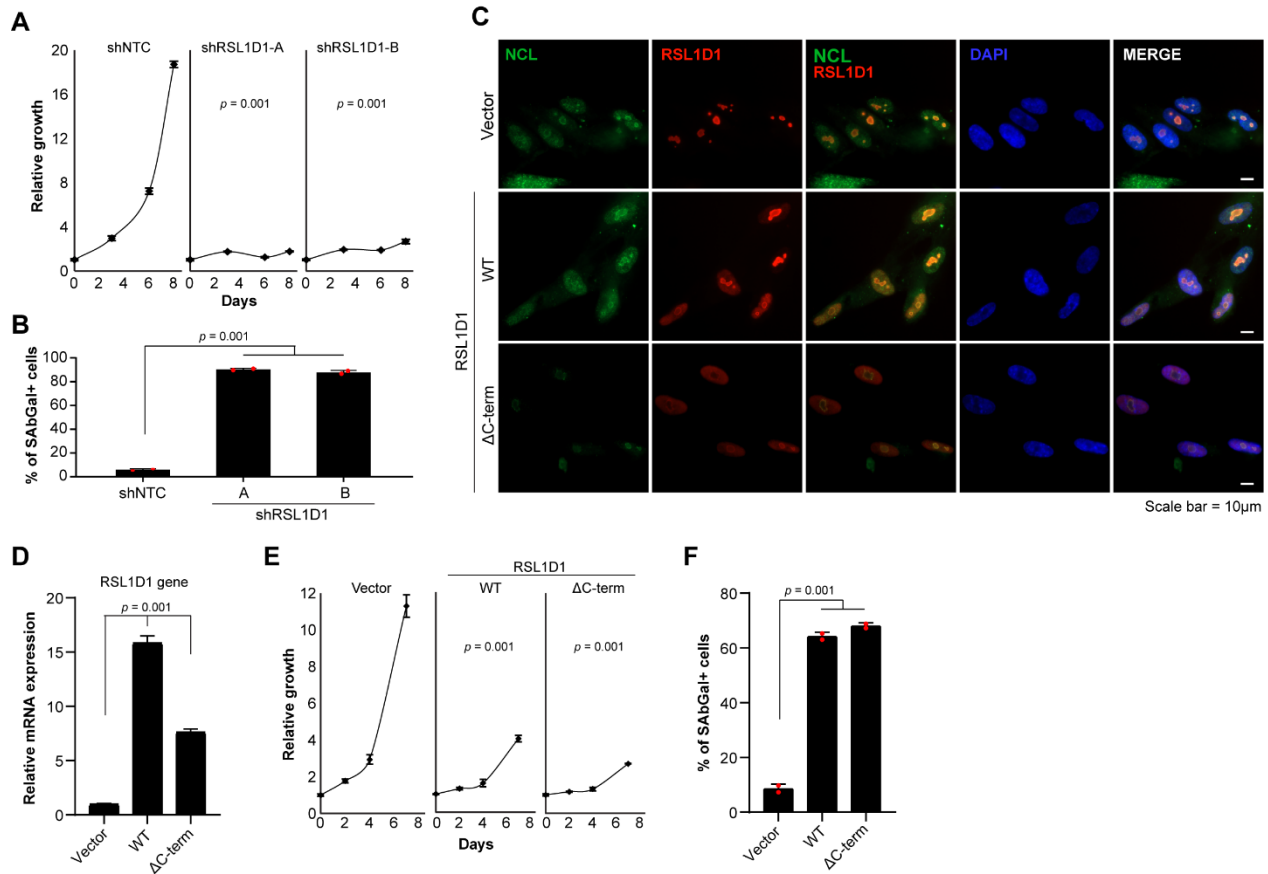


Figure 4.1. Nucleolar functions of RSL1D1 are essential for cell proliferation and its delocalization from nucleolus induces senescence.

(A) Representative growth curve of IMR90 cells infected with either control shRNA (shNTC) or two different shRNAs against RSL1D1 and plated for growth assay at day 7 post-infection (n=2). Error bars represent S.D. (B) Percentage of SAβGal positive cells at day 14 post-infection for cells as in (A) n=2. Error bars represent S.D. At least 3 x 50 cells were counted per condition per biological replicate. (C) Representative images of immunofluorescence staining for RSL1D1 and Nucleolin (NCL) in IMR90 cells infected with either control empty vector, full length wild-type (WT) RSL1D1 or a mutant RSL1D1 lacking its 35 last amino acids (ΔC-term) at 7 days post-infection; n=1. (D) RSL1D1 mRNA levels were measured by RT-qPCR in cells as in (C) at day 18 post-infection. Error bars represent S.D.; n=1. (E) Representative growth curve of cells as in (C) plated at day 10 post-infection (n=2). Error bars represent S.D. (F) Percentage of SAβGal positive cells at day 7 post-infection in cells as in (C), n=2. Error bars represent S.D. At least 3 x 50 cells were counted per condition per biological replicate. All p-values indicated in this figure were calculated by performing One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD.

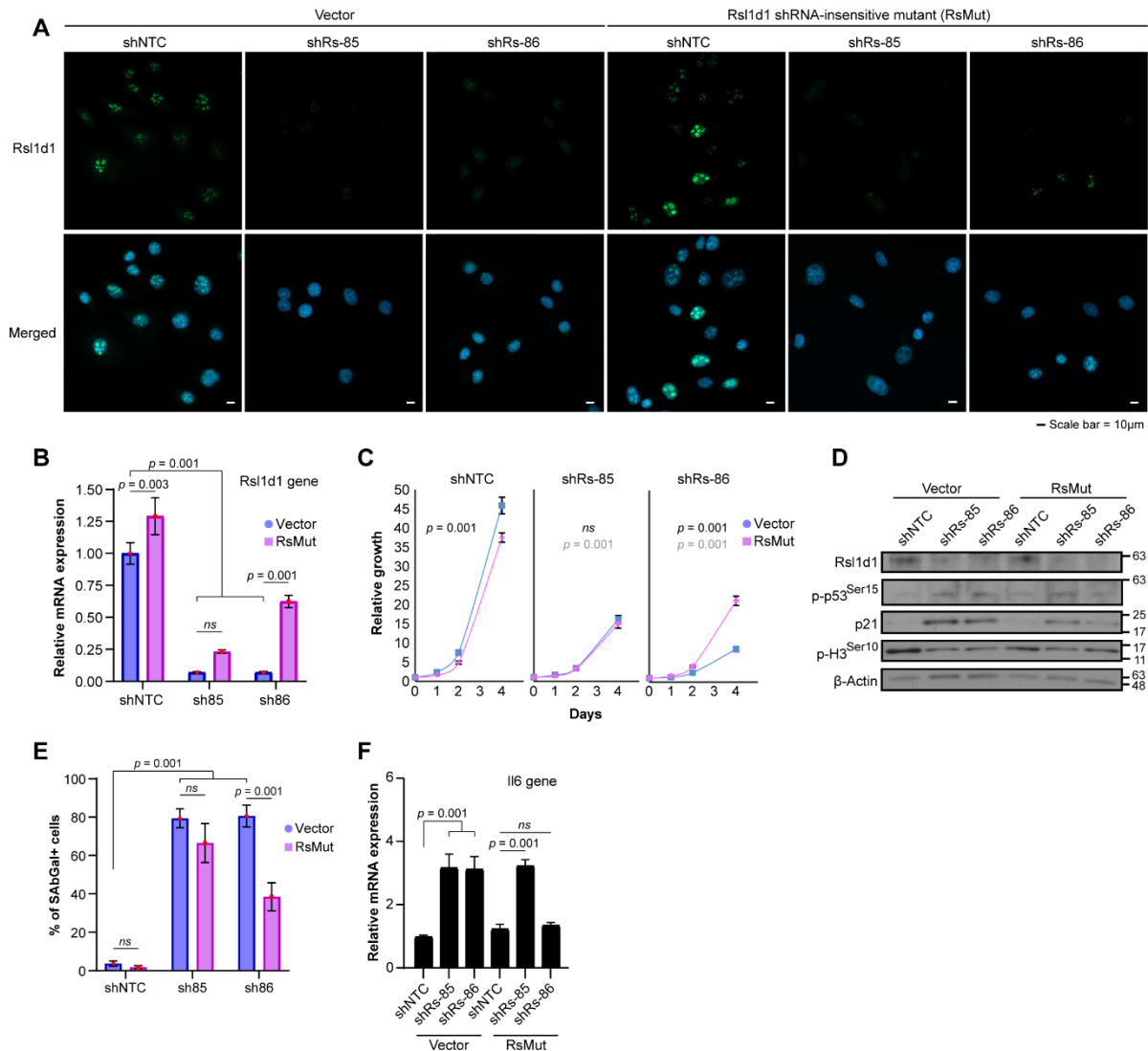


Figure 4.2. Rsl1d1 depletion induces senescence in murine C2C12 myoblasts stem cells.

(A) Representative images of immunofluorescence staining for Rsl1d1 in murine C2C12 cells co-infected with either shNTC or two different shRNAs against Rsl1d1 (shRs-85/86) and a control empty vector or a mutant of full length murine Rsl1d1 which is insensitive to the shRNA-#86 (RsMut). Images were taken at day 7 post-infection. (B) Rsl1d1 mRNA levels were measured by RT-qPCR in cells as in A at day 7 post-infection. Error bars represent S.D. (C) Growth curve of cells as in A. Error bars represent S.D. p values in black compare Vector cells to RsMut cells for each of the indicated conditions (shNTC, shRs-85 and shRs-86), whereas p-value in gray compare shRsl1d1-85/86 to shNTC in vector-expressing cells. (D) Western-blot for the indicated proteins performed on cells as in (A) at day 7 post-infection. (E) Percentage of SAβGal positive cells at day 7 post-infection in cells as in (A). Error bars represent S.D. At least 3 x 100 cells were counted per condition. (F) Il6 mRNA levels were measured by RT-qPCR in cells as in (A) at day 7 post-infection. Error bars represent S.D. All experiments shown in this Figure were performed once. All p-values indicated in this figure were calculated by performing One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD.

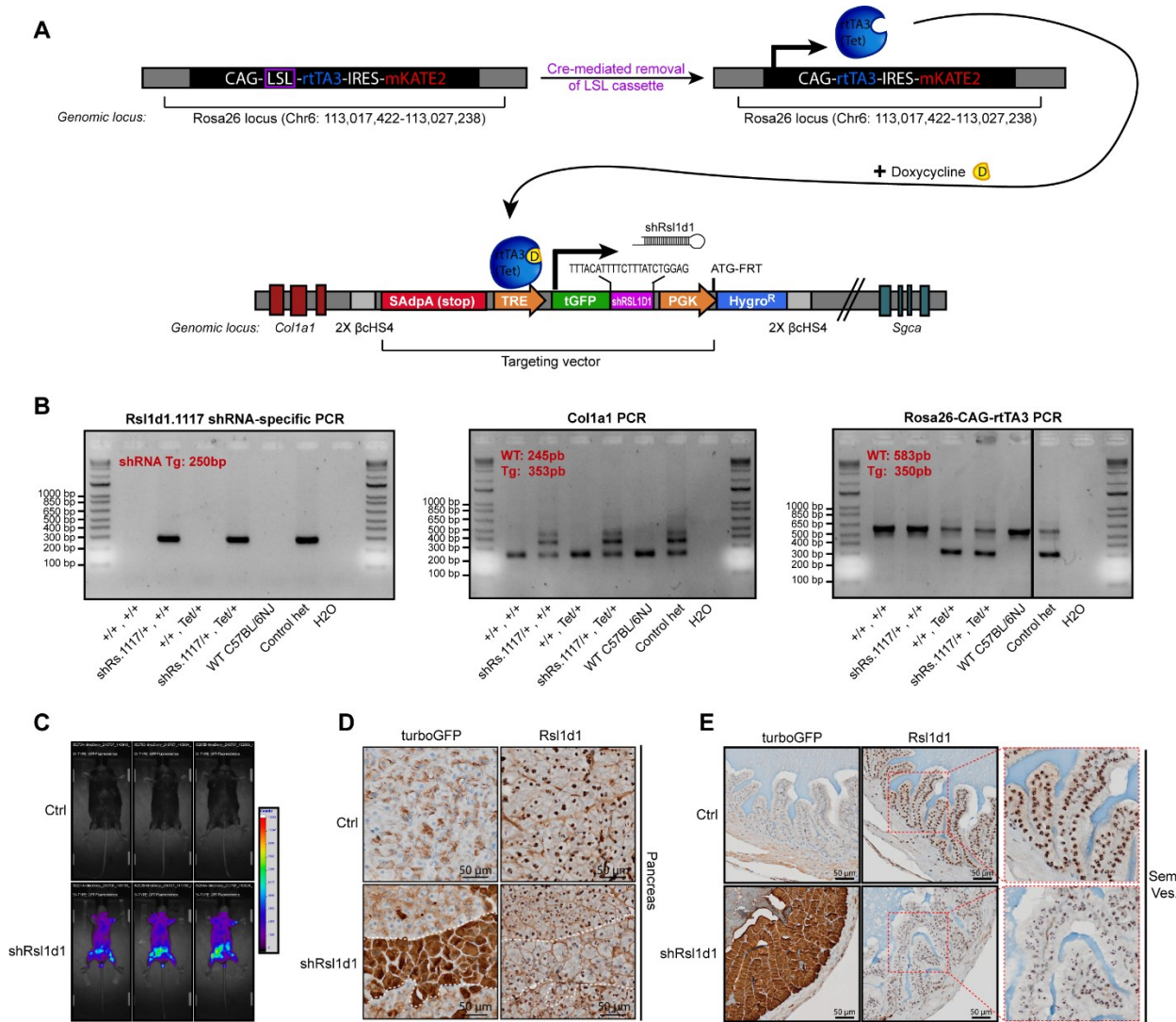


Figure 4.3. Design and validation of genetically engineered mouse model for conditional knockdown of Rsl1d1.

(A) Schematic representation of both transgenes present in the genetically engineered mouse model (GEMM). Targeting vector containing the Tet-regulated shRsl1d1 with its turboGFP reporter was inserted in the *Col1a1* locus in D34 mouse embryonic stem cells using flippase recognition target (FRT) sites. D34 stem cells already have a CAG-loxP-STOP-loxP-rtTA3-IRES-mKate2 knocked-in at endogenous Rosa26 loci on chromosome 6. By crossing the double transgenic mice with Cre-expressing mice, loxP-STOP-loxP (LSL) cassette can be removed, allowing expression of the reverse tetracycline-controlled transactivator 3 (Tet). After addition of doxycycline (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in water containing 0.5% sucrose, the doxycycline-bound Tet can bind the Tet-Responsive Element (TRE) upstream of the shRsl1d1 to mediate its expression along with its reporter. (B) Example of the genotyping procedure for this GEMM. Expected molecular weight for WT and Tg+ bands is indicated for each of the 3 PCR reactions. (C) Fluorescence-intensity imaging using Optix-mx2 imaging system on 3 genotype control males compared to 3 shRsl1d1+/+, Tet+/+ males after 9 months of doxycycline treatment. Sustained induction of the transgene is detectable via the turboGFP signal which serves as a read-out of the transgene expression (shRsl1d1). (D) Demonstration of Rsl1d1 knockdown specificity on pancreas from female mosaic mice. Regions where the turboGFP is expressed correspond exactly to regions of Rsl1d1 knockdown. (E) Example of Rsl1d1 knockdown in male seminal vesicles, with corresponding turboGFP signal.

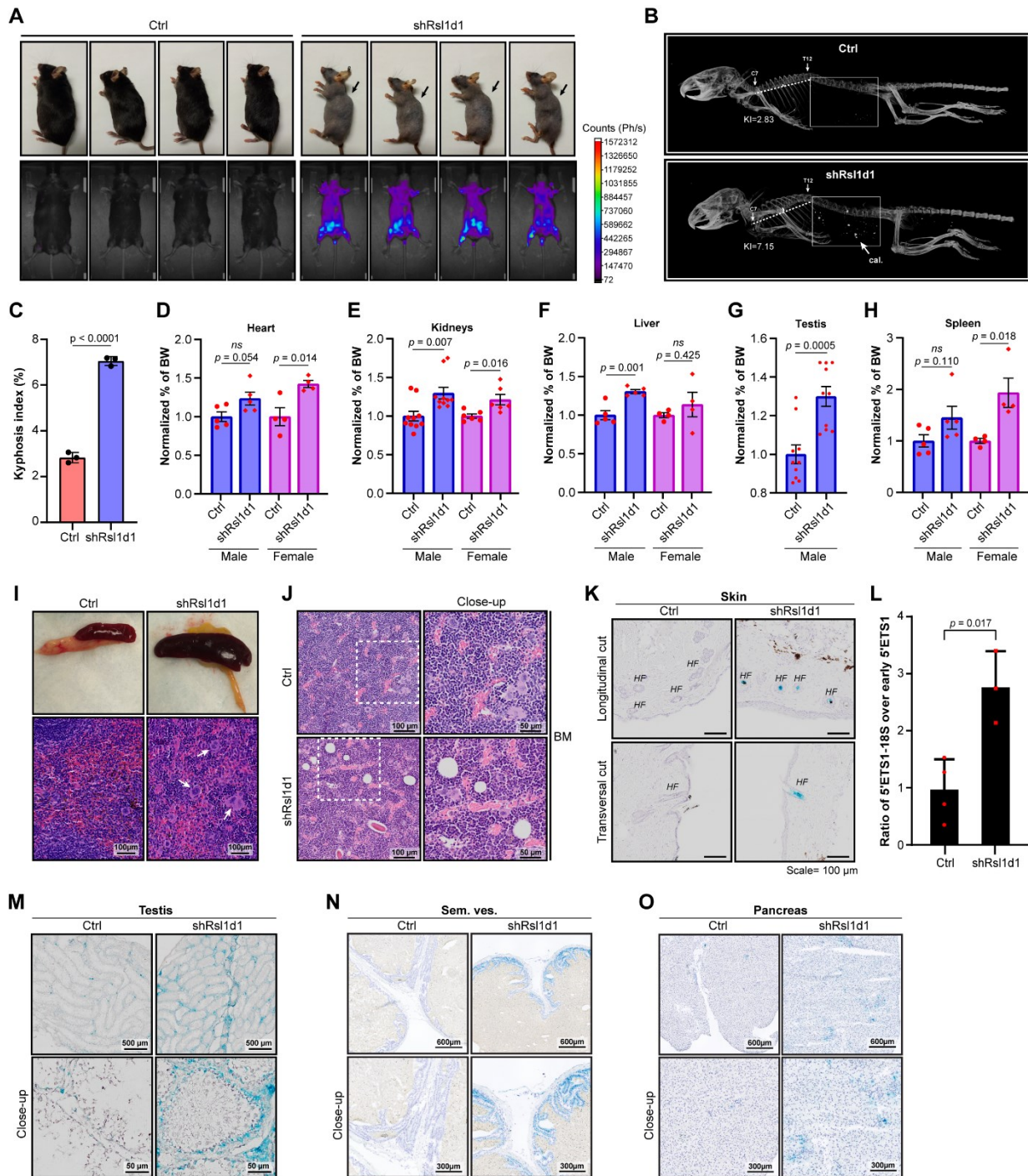


Figure 4.4. Systemic depletion of Rsl1d1 in adult mice gradually induces a premature aging-like phenotype after 2-3 months.

(A) Representative pictures of control and transgenic mice phenotypes after 9 months of doxycycline regimen. Mice are around 14 months old and shRs1d1 mice display general alopecia and kyphosis (arrow). Alopecia gradually appears starting after 2-3 months of shRNA induction and then spreads to the entire body. Fluorescence-intensity imaging shows expression of the turboGFP transgene specifically in shRs1d1 mice. (B) Representative micro-CT scan performed on genotype control and shRs1d1 mice using a SkyScan 1176 (Brucker) after 9 months doxycycline. C7 and T12 vertebrae were used to draw thoracic curve width (TW) and thoracic curve length (TL) and calculate the

kyphosis index (KI). $KI = (TW/TL) \times 100$. Arrow indicates abnormal calcification present in shRsl1d1 mice. (C) Kyphosis index of control and shRsl1d1 mice calculated from micro-CTs performed in (B). Unpaired t-test with two-tailed p-value is indicated. Three mice per genotype were scanned. (D-H) Weight of indicated organs in both male and female mice treated for 6 months with doxycycline. For both genders, weight is represented as a normalized percentage of body weight (BW). Error bars represent SEM. (I) Representative splenomegaly present in shRsl1d1 female mice with H&E close-up showing accumulation of megakaryocytes (arrows) as sign of extramedullary hematopoiesis. (J) Representative H&E staining of bone marrow (BM) in femurs from genotype control and shRsl1d1 mice after 12 months of doxycycline regimen, showing accumulation of adipocytes. (K) SA- β -Gal assay performed on skin of genotype control mice compared to shRsl1d1-expressing mice after 9 months of doxycycline regimen. (L) rRNA defects measured by RT-qPCR on RNA extracted from skin of genotype control and shRsl1d1-expressing mice treated for 3 months with doxycycline. Graph shows ratio of site 1 (junction between 5'ETS and 18S) over site 01 in 5'ETS, indicating accumulation of less efficiently processed 47S, 45S and/or 30S rRNA precursors. Error bars represent S.D. Unpaired t-test with two-tailed p-value is indicated. (M-O) SA- β -Gal assay performed on testes (M), seminal vesicles (N) and pancreas (O) of genotype control mice compared to shRsl1d1-expressing mice after 6 months of doxycycline regimen. For all panels, One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed, except for testis weights in panel F where unpaired t-test with two-tailed p-value is indicated. Also, for all panels, each red dot represents a different mouse, except for panel F in which two kidneys and two testes are used per mouse.

4.3.9. Supplemental material

4.3.9.1. List of Supplemental Material

Supplemental Figure 4.5

Supplemental Figure 4.6

Supplemental Figure 4.7

Supplemental Table 4.1

Supplemental Table 4.2

Supplemental Methods

4.3.9.2. Supplemental figures and legends

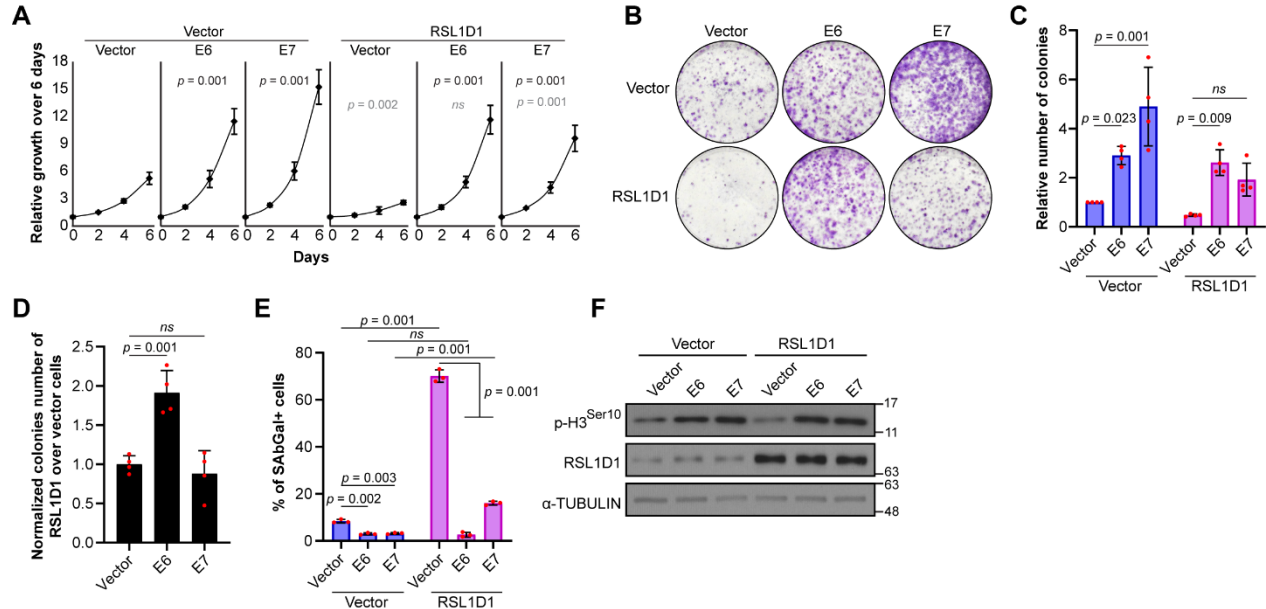


Figure 4.5. (Fig. S1) Senescence induced by overexpression of RSL1D1 is more importantly mediated by the P53 pathway.

(A) IMR90 cells were co-infected with either control empty vector or full-length WT RSL1D1 and either Vector, E6 or E7, and then plated for growth curves at day 8 post-infection. Mean of 3 biological replicates is shown with S.D. as error bars. p-values in black compare either E6 or E7 relative to empty vector for either Vector or RSL1D1-expressing cells, whereas p-values in gray represent comparison of empty vector, E6 and E7 from RSL1D1-expressing cells compared to their counterpart in Vector expressing cells. (B) Representative image of colony assays at day 19 post-infection from cells as in A. n=4 (C) Quantification of colony assays performed on cells as in A. Mean of 4 biological replicates is shown with the mean of each replicate indicated as a red dot. Error bars represent S.D. (D) Normalized colony forming capacity of RSL1D1-expressing cells over control Vector expressing cells showing a higher P53-dependancy for this model of senescence. Mean of 4 biological replicates is shown with the mean of each replicate indicated as a red dot. Error bars represent S.D. (E) Percentage of SAβGal positive cells at day 7 post-infection in cells as in A. Mean of 3 biological replicates is shown with each replicate value indicated as a red dot. Error bars represent S.D. At least 3 x 100 cells were counted per condition per biological replicate. (F) Representative western-blot performed on cells as in A at day 14 post-infection; n=3. All p-values indicated in this figure were calculated by performing One-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD.

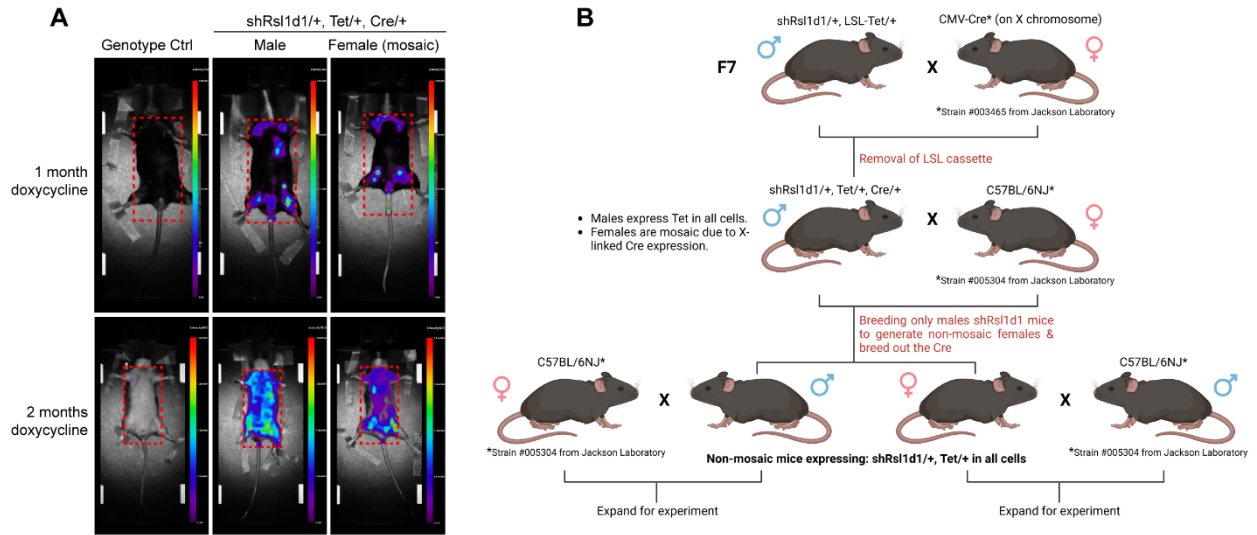


Figure 4.6. (Fig. S2) Breeding strategy to generate non-mosaic females expressing both transgenes.

(A) Optix-mx2 imaging after 1 and 2 months of doxycycline treatment, showing differential expression of turboGFP between males and females which were mosaic. turboGFP signal is used as a read-out of the expression of the shRNA against Rsl1d1. (B) Schematic representation of the breeding strategy used to generate non-mosaic females expressing the shRsl1d1 in all cells as for males. This strategy allows for the removal of the Cre after the LSL excision, thereby reducing the number of transgenes to control for. Figure generated using BioRender.

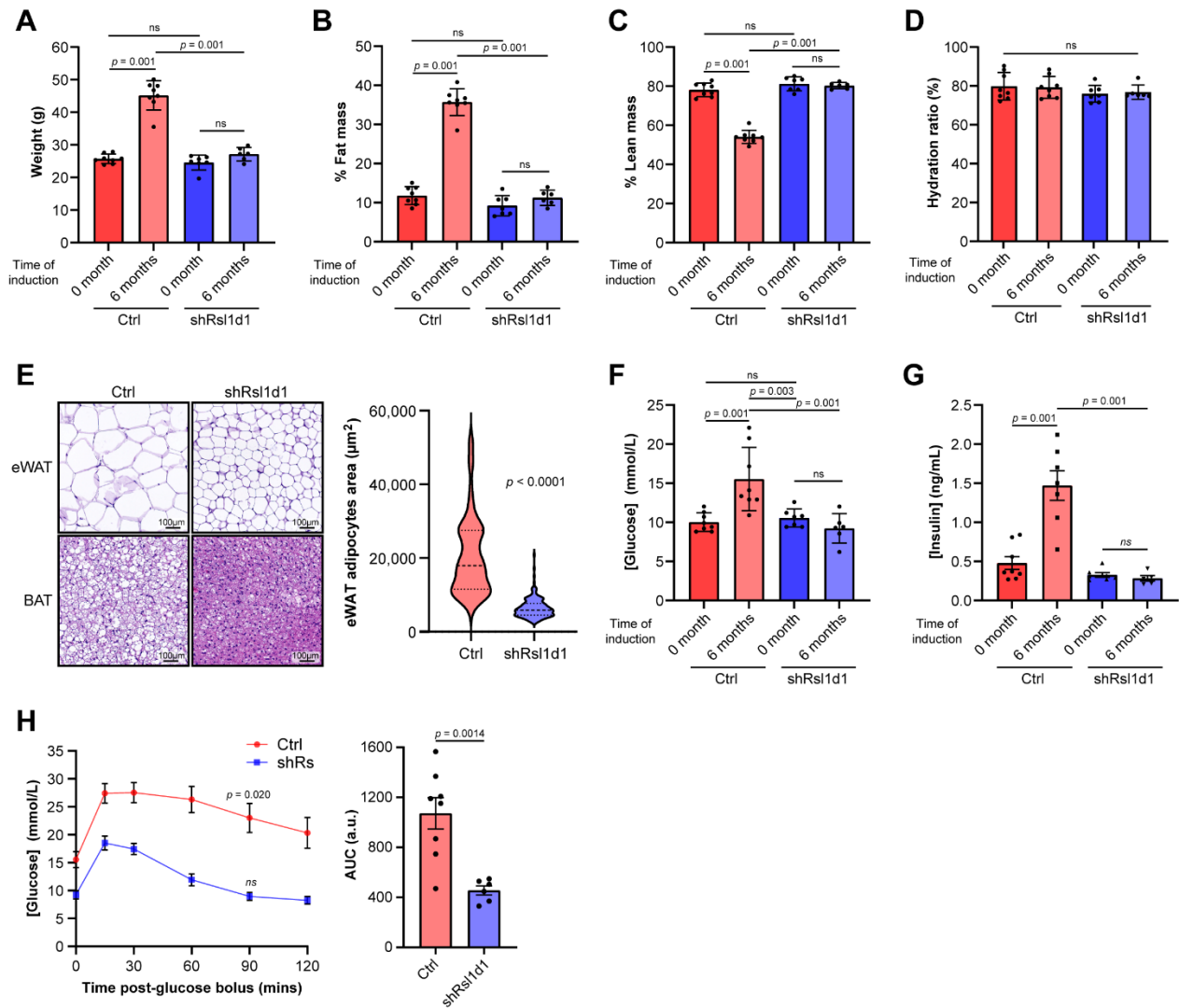


Figure 4.7. (Fig. S3) Rickdo mice do not develop insulin resistance and obesity like control mice as they age.

(A) Weight of genotype control and shRsl1d1 male mice before (0 months) and after 6 months of doxycycline regimen. (B-D) Percentage of fat mass (B), lean mass (C) and hydration ratio (D) were measured using EchoMRI for the same mice as in A. Hydration ratio represents $[(\text{Total water} - \text{Free water}) / \text{lean mass}]$. (E) Representative eWAT and BAT from Ctrl and shRsl1d1 mice with adjacent quantification of adipocytes size. Middle dashed line represents median and dashed lines above and below median represent quartiles. Quantification was performed on 5 mice per genotype and pooled together. Unpaired t-test with two-tailed p-value is indicated. (F) Concentration of plasmatic glucose measured with a glucometer on fasted mice before (0 months) and after 6 months of doxycycline regimen. (G) Plasmatic insulin levels measured by AlphaLISA on mice as in F. (H) Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) was performed after 6 months of doxycycline regiment on same mice as in A. p-value represents comparison of $t=0$ and $t=90$ mins for both genotype control and shRsl1d1-expressing mice. For all panels, error bars represent S.D., except for panel G which represents SEM. Also, for all panels each dot represents an individual mouse. Finally, one-way ANOVA with Dunnett's correction, followed by Tukey-HSD was performed for all panels.

4.3.9.3. Supplemental tables

Table 4.1. List of primers used for qPCR, cloning, genotyping, and shRNAs sequences.

qPCR primers		
<i>In vitro</i> (cultured cells)		
Gene	Forward Primer	Reverse Primer
RSL1D1 (Hs)	5'- TCCCACAGCTGGTACCAATAGGA- 3'	5'- TCCTGTGGCATGTTTTTGAATC TC-3'
TBP (Hs)	5'-GCTGGCCCATAGTGATCTTTGC- 3'	5'- CTTCACACGCCAAGAAACAGT GA-3'
HMBS (Hs)	5'-AACGGCAATGCGGCTGCAA-3'	5'-GGGTACCCACGCGAATCAC- 3'
Rsl1d1 (Mm)	5'-TCTCTAAGCGTGGTTCTTGCAG- 3'	5'- TGTC AACGATGTGCTCAGTCTC C-3'
Il6 (Mm)	5'- ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGA G-3'	5'- TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGC CA-3'
Cxcl1 (Mm)	5'-CGAAGTCATAGCCACACTCAA-3'	5'- GAGCAGTCTGTCTTCTTTCTCC- 3'
Ccl7 (Mm)	5'-ATGAGGATCTCTGCCACGCTTC- 3'	5'- TAGCAGCATGTGGATGCATTG G-3'
Tbp (Mm)	5'-GTTTCTGCGGTCGCGTCATTTT-3'	5'- TCTGGGTTATCTTCACACACCA TGA-3'
β-Actin (Mm)	TCC TAG CAC CAT GAA GAT CAA GAT C	CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG
<i>In vivo</i> (Mouse skin - ribogenesis)		
Gene	Forward Primer	Reverse Primer
rDNA_5'ETS -early (Mm)	5'-TTGCTGCGTGTCAGACGTTTTT-3'	5'- AATAAGGTGGCCCTCAACCAC A-3'
rDNA_5'ETS /start18S (Mm)	5'-TCCTCTCTCGCGCTCTCTGT-3'	5'- ATGCTACCTGGCAGGATCAAC C-3'
Primers used for cloning		
Gene	Forward Primer	Reverse Primer

RSL1D1 (Hs)	5'- CGCGGATCCACCATGGAGGATTCC GCCTCG-3'	5'- CGGAATTCTTAGGTCGACTGGG GTAC-3'	
Δ C-term (Hs)	5'- GCGAGACAGACTCCATAAAAGCC AGAGGCCAAG-3'	5'- GTTGGCCTCTGGCTTTTATGGA GTCTGTCTCGC-3'	
Rsl1d1 (Mm)	5'- CGCGGATCCATGAAGGGCTCTGCG TCCG-3'	5'- GTCGTACGTACTAGTTTGAGTG GGCCGCC-3'	
RsMut (Mm)	5'- CTCCTGACAAGGAGAACGTCAAG ATGCAAGAAAATATCACAGGG-3'	5'- TTGACGTTCTCCTTGTCAGGAG TCTCTCCTATTGGTACCAGTT-3'	
shRNAs			
Name	Vector	Sequence (sense strand 5'-3')	
shNTC	MLPX-neo	5'-ATAGCGACTAAACACATCAATT-3'	
shRsl1d1#85	MLPX-neo	5'-CCAGATGTATGTCTCTTCACAA-3'	
shRsl1d1#86	MLPX-neo	5'-ATCCAGATAAAGAAAATGTAAA-3'	
shNTC (SHC002)	TRC1-pLKO-puro	5'-CAACAAGATGAAGAGCACCAA-3'	
shRSL1D1-A	TRC1-pLKO-puro	5'-GCCTTTGTAACCTTCTCTAAA-3'	
shRSL1D1-A	TRC1-pLKO-puro	5'-CAAGAGAGATCAATGACTGTA-3'	
Primers used for genotyping			
Locus	Primers sequences		
Coll1a1 PCR	Cola1a For	Colla1 Rev	SAdpA Rev2
	5'- AATCATCCCAGGTG CACAGCATTGCG-3'	5'- CTTTGAGGGCTCATGA ACCTCCCAGG-3'	5'- AAGACCGCGAA GAGTTTGTC-3'
shRNA-specific PCR	Specific forward primer	Colla1 Rev45	
	5'- AAGCCACAGATGTA TTTACATTTTC-3'	5'- CACCTGAAAACCTTG CCCC-3'	
Rosa26-CAG-rtTA3 PCR	ROSA D	ROSA B	ROSA C
	5'- TCAGTAAGGGAGCT GCAGTGG-3'	5'- GCGAAGAGTTTGTCCT CAACC-3'	5'- GGAGCGGGAGA AATGGATATG-3'

Table 4.2. List of antibodies used in this article.

For Western-blots:					
Target protein	Company	Cat. No.	Lot #	Host	Dilution
P21	BD Pharmingen	556431	8262957	Mouse	1:750
α -TUBULIN	Sigma-Aldrich	T6074	023M4813	Mouse	1:10 000
phospho-P53 Ser15	Cell Signaling	9286	15	Mouse	1:1000
phospho-Histone H3 Ser10	Millipore	06-570	3595103	Rabbit	1:750
RSL1D1	Sigma-Aldrich	HPA043483	R40297	Rabbit	1:4000
β -ACTIN	Cell Signaling	3700S	18	Mouse	1:2000
anti-rabbit IgG (H-L) conjugated to HRP	Bio-Rad	170-6515	64126042	Goat	1:3000
anti-mouse IgG (H-L) conjugated to HRP	Bio-Rad	170-6516	64132955	Goat	1:3000
For Immunofluorescence:					
Target protein	Company	Cat. No.	Lot #	Host	Dilution
C23/NCL	Santa Cruz	sc-8031	I0816	Mouse	1:200
RSL1D1	Sigma-Aldrich	HPA043483	R40297	Rabbit	1:600
Rsl1d1	Santa Cruz	sc-376302	I0117	Mouse	1:200
For Immunohistochemistry:					
Target protein	Company	Cat. No.	Lot #	Host	Dilution
Rsl1d1	Santa Cruz	sc-376302	I0117	Mouse	1:1000
turboGFP	Invitrogen	PA5-22688	N/A	Rabbit	1:1000

4.3.9.4. Supplemental methods

Genotyping protocols from Mirimus Inc.

RSL1D1 GENOTYPING PROTOCOLS

Col1A1 Homing Cassette PCR

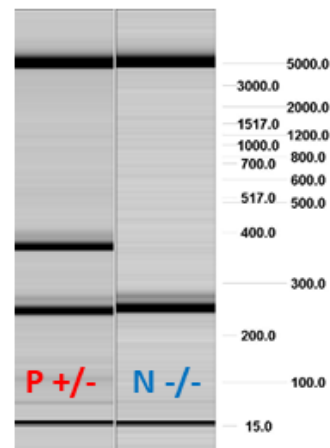
Primer	Sequence 5' -> 3'
Col1a1 For	AATCATCCCAGGTGCACAGCATTGCG
Col1a1 Rev	CTTTGAGGGCTCATGAACCTCCCAGG
SAdpA Rev2	AAGACCGCGAAGAGTTTGTC

Reaction Components	Volume/Sample (µL)
H ₂ O (PCR grade)	15.25
AmpliTaq 360 10X PCR Buffer	2.5
25mM MgCl ₂	2.5
dNTP 10mM	1
Col1a1 For (10µM)	0.5
Col1a1 Rev (10µM)	0.5
SAdpA Rev2 (10µM)	1
AmpliTaq 360 Polymerase	0.25
DNA Template	1.5 (~150ng crude DNA)
Total Volume	25

Steps	Temperature (C)	Time (min)	Comments
1	95	5:00	-
2	95	0:40	-
3	62	0:40	Repeat steps 2-4 for 34 cycles
4	72	1:00	-
5	72	5:00	-
6	4	∞	-

Expected Results:

- Mutant: 353 bps
- Wild Type: 245 bps



Mirimus, Inc., 760 Parkside Ave, Suite 206.
Brooklyn, NY 11226. Direct Line: 929-377-3744

RSL1D1 GENOTYPING PROTOCOLS

Rsl1d1.1117 shRNA-specific PCR

Primer	Sequence 5' -> 3'
Specific forward primer	AAGCCACAGATGTA + first 11 bp from guide sequence AAGCCACAGATGTATTTACATTTTC
Col1a1 Rev45	CACCTGAAAACCTTGCCCC

Reaction Components	Volume/Sample (µL)
H ₂ O (PCR grade)	15.25
AmpliTaq 360 10X PCR Buffer	2.5
25mM MgCl ₂	2.5
dNTP 10mM	1
Specific Forward Primer 10µM	1
Col1a1 Rev45 10µM	1
AmpliTaq 360 Polymerase	0.25
DNA Template	1.5 (~150ng crude DNA)
Total Volume	25

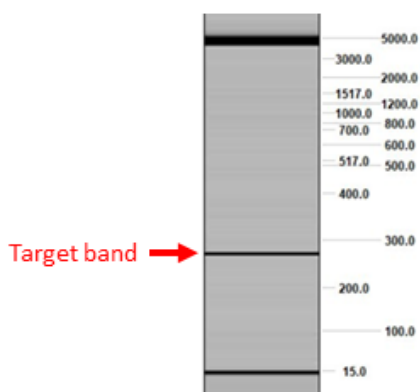
Steps	Temperature (C)	Time (min)	Comments
1	95	5:00	-
2	95	0:30	-
3	60	0:30	Repeat steps 2-4 for 34 cycles
4	72	0:45	-
5	72	5:00	-
6	4	∞	-

Expected Results:

Mutant Band: ~250bp

Note:

- Specific shRNA PCR only distinguishes if the mouse has the specific shRNA.
- This PCR does not distinguish between homozygous and heterozygous.
- Please refer to Col1a1 PCR Protocol.



RSL1D1 GENOTYPING PROTOCOLS

CAGs-LSL-RIK (3) PCR

Primer	Sequence 5' -> 3'
ROSA D	TCAGTAAGGGAGCTGCAGTGG
ROSA B	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC
ROSA C	GGAGCGGGAGAAATGGATATG

Reaction Components	Volume/Sample (μL)
H ₂ O (PCRgrade)	15.05
AmpliTaq 360 10X PCR Buffer	2.5
25mM MgCl ₂	2.5
dNTP 10mM	1
ROSA D (10μM)	1
ROSA B (10μM)	0.2
ROSA C (10μM)	1
AmpliTaq 360 Polymerase	0.25
DNA Template	1.5 (~150ng crude DNA)
Total Volume	25

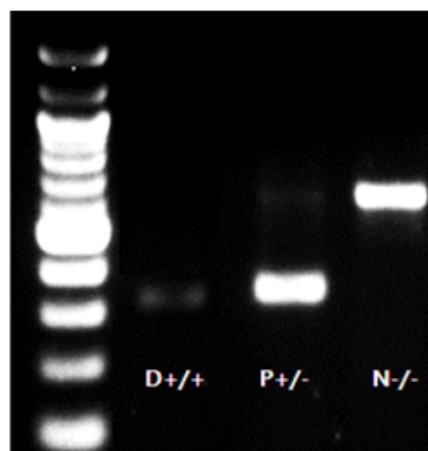
Steps	Temperature (C)	Time (min)	Comments
1	95	5:00	-
2	95	0:40	-
3	60	0:40	Repeat steps 2-4 for 34 cycles
4	72	1:00	-
5	72	5:00	-
6	4	∞	-

Expected Results:

- Mutant: ~350 bps
- Wild Type: ~583 bps

Note:

CAGs-LSL-RIK(3) PCR distinguishes zygosity of your rtTA.



5. Discussion générale

5.1. Mise en contexte des modèles utilisés

Avant d'entrer dans le vif du sujet et d'analyser plus en profondeur les résultats présentés dans les articles 2 et 3 de cette thèse, il est important de prendre quelques instants afin de se familiariser avec les modèles utilisés. Ainsi, cette première partie sera dédiée à introduire les avantages et limitations des modèles employés, ainsi que les aspects à prendre en considération.

Tout d'abord, dans les deux articles nous avons utilisé la lignée de fibroblastes humains normaux IMR90 afin d'étudier la sénescence induite entre autres par l'oncogène HRAS^{G12V}. L'utilisation de fibroblastes pour mimer le processus de sénescence induite par RAS peut à prime abord paraître étrange du fait qu'il est bien établi que la majorité des tumeurs (bénignes ou malignes) arborant des mutations oncogéniques dans RAS originent de cellules épithéliales. Néanmoins, il faut mettre le tout dans son contexte historique. Ainsi, la sénescence induite par les oncogènes (RAS) a été découverte dans les années 90 (4) et à cette époque les modèles cellulaires primaires humains établis étaient principalement des fibroblastes, puisque ce sont les cellules normales les plus faciles à mettre en culture. En effet les conditions de culture de fibroblastes normaux sont généralement très basiques alors que les cellules épithéliales isolées de tissus humains requièrent généralement plusieurs suppléments dans le milieu (*e.g.* hormones thyroïdiennes, hydrocortisone, épinéphrine, etc.), ce qui rendait l'établissement de ces modèles plus complexe à cette époque. Ainsi, de nos jours, dans le domaine de la sénescence, les IMR90 sont un modèle largement établi et utilisé par presque tous les groupes de recherche, ce qui permet de pouvoir comparer plus facilement les résultats entre différents laboratoires.

Ensuite, il faut savoir qu'en ce qui concerne l'inducteur de sénescence utilisé dans l'article 2, soit HRAS^{G12V} (en version inductible ou constitutive), sa surexpression *in vitro* est souvent considérée comme représentant des niveaux supra-physiologiques. Cela étant dit, il demeure incertain si c'est réellement le cas ou pas. En effet, la littérature actuelle suggère que l'intensité de signalisation par RAS serait un élément important pour l'induction de la sénescence et dans l'article 2 de cette thèse, nous montrons que la durée de signalisation est un autre facteur important, puisque nous pouvons tout de même compromettre des cellules vers la sénescence en diminuant l'intensité de signalisation si l'on compense par une plus longue durée de signalisation (Figure 3.11-L). Aussi,

plusieurs études ayant montré la présence de cellules sénescences dans des tumeurs bénignes ont démontré que ces cellules ne représentaient qu'une certaine fraction ($\pm 20\%$) des cellules présentes au sein de la tumeur bénigne (596). Ainsi considérant le modèle actuel d'évolution clonale lors de la tumorigénèse (Figure 1.1), il est probable que cette fraction de cellules sénescences au sein des tumeurs bénignes représente en fait le peu de cellules ayant atteint ce niveau dit «supra-physiologique» de signalisation par RAS. Aussi, il n'est pas à exclure que ces cellules aient pu se compromettre vers la sénescence avec des niveaux d'activation de la voie RAS-MAPK plus bas en ayant compensé avec une plus longue durée de signalisation, puisque ces tumeurs prennent généralement des années à s'établir. De plus, il faut également garder en tête que malgré le fait que les mutations oncogéniques dans les GTPases RAS soient souvent hétérozygotes, cela n'implique pas nécessairement que chaque cellule mutée aura le même niveau de signalisation. En effet, plusieurs autres facteurs entrent en ligne de compte, comme par exemple le patron d'expression génique régulé par l'accessibilité à la chromatine, lui-même dépendant du statut épigénétique qui induira ou non des boucles de rétroaction positives ou négatives sur la voie MAPK. Finalement, les rapports suggérant qu'il s'agisse de surexpressions non-physiologiques se basent souvent sur des analyses comparatives par western-blot entre des échantillons de tumeurs et des extraits cellulaires générés *in vitro*. Ainsi, évidemment que le fait de récolter des cellules ayant été sélectionnées *in vitro* permet d'obtenir une population homogène dont 100% des cellules expriment fortement l'oncogène RAS, ce qui ne sera jamais le cas *in vivo* du fait que la fraction populationnelle exprimant plus fortement l'oncogène RAS sera diluée par la majorité des cellules dans le microenvironnement tumoral exprimant plus faiblement ce mutant. Finalement, il faut mentionner que dans plus de 80% des cancers mutés en RAS, c'est KRAS qui sera muté et que HRAS représente environ 13% des cancers mutés en RAS (597). De plus, il a été montré que pour les mêmes acides aminés, les codons présents chez KRAS sont plus rares que ceux chez HRAS, ce qui mènerait à une expression généralement plus faible de KRAS (598). Ainsi, ceci pourrait expliquer en partie les observations suggérant que les surexpressions *in vitro* tendent à atteindre des niveaux dits «supra-physiologiques», puisque la plupart des laboratoires travaillant sur la sénescence induite par RAS dans des modèles primaires utilisent HRAS^{G12V}.

Finalement, dans l'article 2, nous avons recours à des essais à la nucléase micrococcalle (essais MNase) afin d'évaluer l'accessibilité à la chromatine dans diverses conditions. Il faut dire que la technique d'ATAC-seq nous fournirait évidemment plus d'informations concernant les loci

génomiques précis montrant une accessibilité accrue à la chromatine pendant la fenêtre d'engagement. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous performerons cette expérience d'ATAC-Seq pour les révisions de l'article, d'où le fait que ces résultats ne soient pas encore inclus dans cette thèse. Néanmoins, il est important de mentionner que la technique d'essai MNase est également une technique fiable pour supporter nos conclusions concernant une augmentation générale de l'accessibilité de la chromatine. En effet, même si la MNase sonde indirectement l'accessibilité de la chromatine en identifiant les régions génomiques liées aux nucléosomes, elle partage tout de même le même «mode d'action», soit des clivages enzymatiques, que d'autres tests d'accessibilité à la chromatine tels que l'ATAC-Seq (599). De plus, malgré le degré de variabilité inhérent à cette technique, le fait de pouvoir évaluer l'accessibilité de la chromatine à l'œil nu (sur un gel d'agarose) est d'autant plus fiable, puisque cela n'implique pas des étapes multiples de traitement de données. Évidemment, cela ne nous informe pas sur la nature des loci accessibles, mais uniquement sur le degré d'accessibilité global à l'échelle du génome selon qu'on observe plus de mononucléosomes ou à l'inverse, des formes polynucléosomales. Néanmoins, ces essais sont beaucoup plus abordables que la technique d'ATAC-Seq pour évaluer l'accessibilité de la chromatine dans de multiples conditions expérimentales tel que c'est le cas dans cet article, expliquant notre décision initiale d'utiliser les essais MNase pour tester notre hypothèse.

5.2. Dommages à l'ADN et activation des voies de DDR : une conséquence de l'entrée en sénescence?

Jusqu'à présent, le modèle le plus répandu afin de tenter d'expliquer l'entrée en sénescence suivant l'activation de l'oncogène RAS reposait sur le postulat que les cellules subissent un stress réplicatif menant à l'accumulation de dommages à l'ADN et l'activation des voies de réponses aux dommages à l'ADN (DDR) qui seraient responsables de leur arrêt stable de prolifération. En effet, ceci est supporté par le fait que durant les trois premiers jours suivant l'activation de RAS, les cellules entrent généralement en phase d'hyper-prolifération qui serait responsable de ce stress réplicatif et de l'activation conséquente des DDR. Conséquemment, le laboratoire du Dr. Fabrizio d'Adda di Fagagna a montré que dans la sénescence induite par RAS, la simple déplétion par shARN de CHK2 permettait de contourner la sénescence et de transformer les cellules (600). Il faut cependant mentionner que ceci a été montré dans la lignée de fibroblastes humains BJ1 où la simple déplétion de P53 permet un contournement de la sénescence induite par RAS (600). Or,

contrairement aux cellules de souris où l'inactivation d'une seule des deux voies de suppression tumorale (P53/P21 ou P16/RB) est suffisante pour mener à un contournement du programme de sénescence, les cellules normales humaines requièrent généralement une inactivation des deux voies afin de contourner ce programme. Ces résultats d'échappement à la sénescence par RAS via l'inactivation de P53 dans les BJ's ont été reproduits par le laboratoire de Dre. Judith Campisi (601). Cependant, dans ce même article ils montrent que les WI-38, une autre lignée normale de fibroblastes humains, ne contournent pas la sénescence suivant l'inactivation de P53. En approfondissant leur caractérisation, ils finissent par identifier que ce qui permet aux BJ's d'échapper à la sénescence via la simple inactivation de P53 est le fait qu'ils n'expriment pratiquement pas de P16 suivant l'induction de sénescence par RAS comparativement aux WI-38 (601). Ainsi, en contextualisant les résultats du laboratoire du Dr. Fabrizio d'Adda di Fagagna avec ces informations, cela suggère que l'échappement qu'ils observent est en fait probablement un artéfact dû à une coopération entre l'équivalent d'une voie P16/RB inactive et la déplétion de CHK2 dont le rôle est normalement de stabiliser et activer P53 via les DDR (602).

De ce fait, tout comme les WI-38, les IMR90 ont une activation conséquente des deux voies principales de suppression tumorale suivant l'activation de RAS et l'inactivation à elle seule de P53 ne permet pas un contournement de la sénescence (414). De plus, dans les IMR90, la surexpression de RAS couplée à la simple déplétion d'ATM est insuffisante pour permettre un échappement (153). En effet, il faut une combinaison de l'inactivation de la voie RB et de la déplétion d'ATM afin de contourner la sénescence. Cela revient à dire qu'il faut inactiver la voie P53 (activée par ATM) et la voie RB afin de contourner la sénescence, ce qui dans tous les cas contournerait ce programme. Enfin, les articles du laboratoire de Dr. d'Adda di Fagagna suggérant que les dommages à l'ADN et l'activation des voies de DDR sont causals de l'entrée en sénescence étudient généralement l'implication des voies de DDR à des temps tardifs, *i.e.* environ 7-12 jours post-infection, lorsque la sénescence est déjà bien établie. Or, considérant l'article 2 de cette thèse montrant que les cellules se compromettent vers la sénescence dès 3 jours de signalisation MAPK (Figure 3.1A-G et Figure 3.7A-F) et qu'il n'y a à ce moment pas encore d'activation des voies de DDR (Figure 3.1E et Figure 3.7D), il semble improbable que dans un contexte de sénescence induite par RAS dans des cellules avec les deux voies de suppression tumorale fonctionnelles ce soit l'activation des voies de DDR ou l'accumulation de dommages à l'ADN qui compromettent les cellules vers un arrêt de prolifération. Il semblerait plus probable que les voies de DDR et

l'accumulation de dommages à l'ADN représentent une conséquence plutôt que la cause de l'entrée en sénescence. Il est toutefois important de mentionner que nous n'avons pas mesuré directement les dommages à l'ADN, ce qui aurait impliqué d'effectuer d'autres essais tel que le *Comet assay*.

Ceci étant dit, cela amène une question supplémentaire. En effet, si les cellules se compromettent vers la sénescence et cessent de proliférer bien avant l'accumulation des dommages à l'ADN, d'où proviennent alors ces dommages? Nous n'avons pas cherché à répondre spécifiquement à cette question dans l'article 2, mais il est possible d'envisager des hypothèses impliquant le stress oxydant ou l'accumulation de *R-loops* causée par une hyper-transcription par exemple. En ce qui concerne l'hypothèse du stress oxydant, il est depuis longtemps établi que l'accumulation excessive de ROS mène à l'accumulation de dommages à l'ADN et à la sénescence (154). À l'inverse, l'utilisation d'antioxydants a été montrée comme permettant de retarder la sénescence répliquative (603). Il a également été montré que les ROS produits par les cellules sénescents dû à leurs dysfonctions mitochondriales contribuent à la persistance des voies de DDR, ce qui renforcerait l'arrêt du cycle cellulaire observé durant la sénescence (168). Parallèlement, une autre hypothèse serait que l'augmentation d'accessibilité à la chromatine que nous avons observée lors de l'engagement des cellules vers la sénescence soit associée à une hyper-transcription générale causant l'accumulation de *R-loops*. En ce sens, il a été montré dans des BJ's que l'activation de l'oncogène HRAS^{G12V} mène à une augmentation de l'expression du facteur de transcription général TBP, menant à une augmentation de la transcription générale et à l'accumulation d'hybrides ADN : ARN (*R-loops*) qui causeraient des dommages à l'ADN (604). En effet, l'ADN simple brin déplacé par la formation de l'hybride ADN : ARN peut servir de substrat aux désaminases (mutagénèse spontanée et instabilité génomique) et aux enzymes de réparation de l'ADN (*e.g.* APE dans la voie de réparation par excision de base), causant des bris d'ADN (605). De plus, des structures G-quadruplex peuvent se former sur le brin opposé riche en guanosine, ce qui peut générer des sites sensibles à des nucléases (605). Conséquemment, une augmentation de la transcription générale pourrait être en cause dans l'accumulation tardive de dommages à l'ADN dans la sénescence. Encore une fois, ici, le rôle de ces dommages à l'ADN serait de stabiliser le phénotype de sénescence déjà prédéterminé.

5.3. L'augmentation d'accessibilité à la chromatine comme mécanisme d'engagement vers la sénescence induite par RAS

Tel que susmentionné, nous proposons dans l'article 2 de cette thèse que l'engagement vers la sénescence serait déjà déterminé avant même l'établissement du phénotype. En effet, nous proposons que l'augmentation d'accessibilité à la chromatine agit comme point de restriction médiant l'engagement des cellules vers la sénescence (Senescence Restriction Point, SeRP) en intégrant la durée et l'intensité des stress oncogéniques. Tel que détaillé dans l'article, ceci est notamment supporté par le fait que forcer l'ouverture de chromatine avec un prétraitement de seulement 1 jour avec du butyrate de sodium, un inhibiteur de HDAC de classe I et II, permet d'engager le SeRP après seulement 1 jour de signalisation MAPK contrairement aux 3 jours requis normalement (Figure 3.2F-K). Il est à mentionner que nous avons essayé l'expérience inverse, *i.e.* traiter les cellules avec des inhibiteurs de HATs afin de retarder le SeRP. Nous n'avons cependant pas été en mesure de retarder l'entrée en sénescence des cellules en inhibant TIP60, ni GCN5, ni P300, probablement dû à une action concertée de plusieurs HATs lors du SeRP induit par RAS. Ainsi, une première option à envisager serait de tester des combinaisons d'inhibiteurs, mais cela pourrait également augmenter les effets hors-cibles et conséquemment la toxicité du traitement. Alternativement, une option intéressante serait de tester la preuve de concept en utilisant ces inhibiteurs de HATs dans un contexte de sénescence induite par la surexpression d'un seul des facteurs de transcription que nous avons identifié plus loin dans l'article. En effet, contrairement à la sénescence induite par RAS où les kinases ERK vont mener à l'activation d'une multitude de facteurs de transcription (TFs), la sénescence induite directement par un seul de ces TFs, *e.g.* ETV4 ou RUNX1, pourrait en théorie dépendre de moins de HATs et donc une inhibition individuelle de ces HATs pourrait potentiellement permettre de retarder le SeRP. Il faudrait toutefois sous-cloner ETV4 ou RUNX1 dans des vecteurs inductibles, puisqu'avec une surexpression constitutive il faudrait potentiellement maintenir constamment les inhibiteurs de HATs, ce qui finirait simplement par être toxique. Ainsi, une version inductible permettrait de tester l'inhibition uniquement dans la fenêtre d'engagement vers la sénescence induite par le TF en question.

Un des points qui mériterait d'être investigué davantage est le concept de mémoire des stress oncogéniques que nous amenons en Figure 3.2A-C. En effet, nous montrons bel et bien qu'avec 2 x 24h de signalisation espacées de 3 jours, nous ne reproduisons pas l'engagement vers

la sénescence obtenu avec 72h consécutives, mais que 3 x 24h le reproduisent. Cependant, nous n'avons pas de preuve que cette mémoire est intégrée au niveau de la chromatine. Nous avons des corrélations dont le fait qu'on observe une augmentation de l'accessibilité à la chromatine au SeRP (Figure 3.2D-E) et le fait que la coopération entre RAS et MYC semble être également associée à une augmentation accrue de l'accessibilité à la chromatine (Figure 3.9E-F) malgré un niveau pratiquement basal de signalisation par les kinases ERK (Figure 3.9C). Toutefois, nous n'avons pas d'essais MNases parallèles à l'expérience de mémoire. Ainsi, il serait intéressant de faire ces essais MNases afin de voir si dans les conditions ne se compromettant pas vers la sénescence, *i.e.* 1 x 24h et 2 x 24h, l'ouverture de la chromatine demeure sous le seuil normalement détecté à 48h, alors que dans la condition récapitulant l'engagement du SeRP, *i.e.* 3 x 24h, on reproduirait une ouverture d'environ 40% tel qu'observé au SeRP (Figure 3.2E,K et 3.9E-F). D'ailleurs, le fait de maintenir la chromatine plus accessible, mais en deçà du seuil «compromettant» avec 2 x 24h, validerait d'autant plus le concept de mémoire du stress.

Enfin, il semble peu probable que cette mémoire soit due à un artéfact de signalisation qui continuerait malgré la relâche du 4OHT. De manière générale, la demi-vie du 4OHT *in vitro* est d'environ 24 à 48h. Ainsi, lorsque nous faisons un «*pulse*» d'activation de cette construction pour seulement 24h, il pourrait en effet y avoir quelques heures supplémentaires de signalisation après le changement de milieu. Cependant, en replaquant les cellules à la fin de chaque traitement, nous sommes en mesure d'arrêter davantage la signalisation MAPK pendant le temps nécessaire pour que les cellules réadhèrent au pétri. De plus, s'il y avait une continuation de la signalisation, nous observerions un engagement du SeRP dans les cellules ayant été traitées 2 x 24h, puisqu'elles auraient atteint un équivalent de 3 jours de signalisation. Enfin, il serait intéressant de refaire l'expérience de mémoire des stress oncogéniques mais en espaçant davantage que 3 jours les «*pulses*» afin de déterminer la «durée maximale de mémorisation». Nous pourrions ainsi évaluer ce qui se passe avec l'accessibilité à la chromatine lorsque les cellules perdent cette mémoire.

5.4. ERK2 agit comme suppresseur de tumeur dans la sénescence RAS en médiant l'accessibilité à la chromatine

Notre laboratoire a précédemment identifié que les kinases ERK, spécifiquement ERK2, étaient requises pour la sénescence induite par RAS (108). Nous avons en effet confirmé leur rôle

essentiel pour l'atteinte du SeRP (Figure 3.8A-C). Cependant, nous montrons aussi que, passé l'atteinte de ce point de restriction, le signal des kinases ERK est partiellement dispensable (Figure 3.8D-G) puisque, selon notre modèle, elles auraient engagé un système indépendant de relais de la signalisation. Initialement, notre laboratoire avait suggéré que le rôle suppresseur de tumeur de ERK2 était lié à sa capacité à médier un programme de dégradation spécifique de protéines (SAPD), parmi lesquelles il y aurait des effecteurs requis pour la prolifération cellulaire, la ribogénèse et plusieurs autres processus importants de la cellule (108). Conséquemment, une déficience en ces facteurs mènerait à l'arrêt de prolifération observé dans la sénescence. Cependant, le rôle du SAPD comme inducteur de sénescence et l'implication précise de ERK2 dans ce processus n'ont pas été démontrés dans cette publication. En effet, il a été montré que plusieurs protéines sont dégradées dans la sénescence RAS et qu'elles ne le sont plus lorsqu'on co-infecte des cellules avec RAS+shERK2. Or, les cellules RAS+shERK2 n'entrent jamais en sénescence; il s'agit d'un contournement de la sénescence et non d'un échappement à la sénescence. Ainsi, on compare le profil protéique de cellules sénescents à celui de cellules transformées qui ont bien sûr un protéome différent. Cela ne veut pas dire que le SAPD n'existe pas, puisque ces cibles sont tout de même dégradées dans la sénescence comparativement à des cellules contrôles. Toutefois, il aurait plutôt été pertinent de dépléter ERK2 dans des cellules où la sénescence par RAS est déjà induite afin de voir si dans ces circonstances on peut restaurer les niveaux des cibles du SAPD. Il faut néanmoins dire que dans ce contexte, la déplétion de ERK2 ne permet pas un échappement à la sénescence (résultats non-publiés dans cet article), ce qui n'est pas surprenant considérant nos résultats en Figure 3.8D-G et notre modèle de relais de la signalisation. Somme toute, si la restauration des niveaux des cibles du SAPD menait à une déstabilisation du phénotype de sénescence et à un échappement prématuré, cela pourrait au moins confirmer le rôle du SAPD dans la stabilisation du phénotype de sénescence.

Ainsi, ERK2 est bel et bien requis pour l'induction de sénescence, puisque sa déplétion empêche l'initiation de la sénescence. Par contre, on ne peut pas dire que sa capacité à médier l'engagement vers la sénescence est dû à sa capacité à induire le SAPD. En effet, tel que montré en Annexe 1, le moment précis auquel les protéines identifiées dans le SAPD se mettent à être dégradées est incompatible avec un rôle causal pour l'entrée en sénescence, puisque la plupart des cibles sont dégradées à partir de 10 jours post-activation de RAS et que nous avons identifié le SeRP à jour 3. Il faut d'ailleurs dire que la phospho-protéomique ayant identifié ces cibles

dégradées avait été réalisée à 12 jours post-activation de RAS. De plus, un autre projet dans le laboratoire portant sur le rôle de la E3 ubiquitine ligase ASB14 impliquée dans ce processus de SAPD semble montrer que les niveaux de cette dernière commencent à augmenter autour du jour 10 suivant le début de la signalisation, ce qui est plus compatible avec un rôle du SAPD comme stabilisateur plutôt qu'un inducteur du phénotype de sénescence. Ainsi, les résultats en Figure 3.2L-O où l'on réinstaura une sénescence complète uniquement en réintroduisant l'ouverture de chromatine pendant deux jours en début de signalisation RAS dans un contexte où l'on a enlevé les kinases ERK2, suggèrent très fortement que c'est cette fonction qui permet à ERK2 de médier l'engagement vers la sénescence. De plus, nous savons qu'il ne s'agit pas d'un artefact dû à un stress induit par le butyrate de sodium qui est connu comme pouvant induire de la sénescence (606-608), puisque suivant ce traitement, ni les cellules contrôles Vecteur, ni les cellules contrôles RAS+E1A n'entrent en sénescence comme le font les cellules RAS+shERK2. Enfin, il serait tout de même intéressant de mesurer l'accessibilité à la chromatine dans ce contexte afin de voir si les cellules RAS+shERK2 ont réellement une chromatine moins accessible tel que l'on pourrait s'y attendre.

Par ailleurs, une analyse des motifs présents dans les éléments de régulation des gènes étant augmentés dans les cellules compromises vers la sénescence (Figure 3.3I-J) nous a permis d'identifier des membres putatifs d'un réseau de facteurs de transcription qui seraient impliqués dans l'ouverture de la chromatine en aval de ERK2 lors du SeRP. Ce réseau comprendrait notamment ETV4, RUNX1, OCT1 et MAFB, dont la simple surexpression individuelle permet de phénotypier l'induction de sénescence (Figure 3.4A-G). Pour le reste de notre étude, nous nous sommes concentrés davantage sur ETV4 et RUNX1, puisque ce sont ceux dont la surexpression semblait induire les sénescences les plus fortes. Il est à mentionner que nous avons aussi essayé l'approche inverse, *i.e.* dépler les niveaux endogènes de ces TFs individuellement afin de voir si nous pouvions empêcher ou retarder l'entrée en sénescence, mais cela n'a pas fonctionné. Ainsi, plusieurs résultats semblaient suggérer l'existence d'un réseau de TFs ayant des fonctions compensatoires. Parmi ces éléments, le premier est que la délétion d'un seul TF ne permet pas à elle seule d'empêcher l'engagement vers la sénescence. Ensuite, les niveaux des TFs identifiés ne semblent pas augmenter au moment du SeRP (Figure 3.5A,C), mais leur liaison à l'ADN, elle, augmente (Figure 3.5B). De plus, à mesure que leur liaison à l'ADN augmente de plus en plus, leurs niveaux (ARNm et protéine) se mettent à augmenter selon une régulation transcriptionnelle

(Figure 3.5B-G). De manière intéressante, il a d'ailleurs été montré que la liaison à long terme d'un TF à son élément de réponse à la chromatine mène à une stabilisation de l'expression génique et à l'engagement d'un destin cellulaire précis (609); dans ce cas, on pourrait concevoir que ce destin est la sénescence cellulaire. Enfin, tous ces éléments en combinaison avec les résultats en Figure 3.8D-G montrant que le signal de ERK n'est plus obligatoire suivant l'atteinte du SeRP, suggèrent l'existence d'un réseau auto-régulé de facteurs de transcription qui relayent le signal des kinases ERK afin de maintenir le programme de sénescence. D'ailleurs, il a été montré que RUNX1 serait régulé transcriptionnellement par des TFs de la famille OCT et ETS dont font partie OCT1 et ETV4 respectivement, et que son promoteur semble contenir des sites de liaison pour lui-même (610). Aussi, il a été montré par CHIP-Seq dans des lignées de carcinome hépatocellulaire (611) et de cancer de la prostate (612) que ETV4 liait son propre promoteur. De plus, la liaison d'ETV4 à des sites bipartites ETS-AP1 dans les PC3 serait associée à l'induction d'un programme transcriptionnel similaire à celui induit par RAS, mais en absence d'activation de la voie MAPK (612), ce qui suggère encore une fois qu'il pourrait relayer le signal des kinases ERK. Enfin, ces kinases régulent directement la stabilité et l'activité d'ETV4 (77,613) et RUNX1 (614), ce qui pointe encore une fois dans la même direction. Ainsi, ces résultats suggèrent que ce réseau de TFs pourrait être auto-régulé, permettant de relayer le signal de la voie RAS/MAPK et de maintenir le programme de sénescence.

5.5. Un réseau de facteurs de transcription agissant en amont de P53 contrôle l'engagement vers la sénescence

De manière intrigante, la surexpression d'ETV4 et RUNX1 est associée à une augmentation des niveaux de p-P53^{Ser15}, une marque d'activation de P53. Ce site de phosphorylation est très bien caractérisé comme étant une cible d'ATM en réponse aux dommages à l'ADN dans la sénescence (139,140). Or, tel qu'illustré en Figure 3.4E, la sénescence induite par la surexpression de ces TFs n'est pas associée à une augmentation de dommages à l'ADN. Ainsi, l'activation de P53 doit avoir lieu en réponse à un autre événement. De manière intéressante, il a été montré que l'augmentation d'ouverture de la chromatine à elle seule pouvait mener à l'activation de la kinase ATM (523,524). Ainsi, la capacité de ces TFs à activer P53 pourrait en fait être dépendante de leur capacité à médier l'ouverture de la chromatine. En effet, la surexpression à elle seule de ces TFs mène à une augmentation de l'accessibilité à la chromatine dans un laps de temps compatible avec

l'engagement vers la sénescence, *i.e.* 3 jours de signalisation (Figure 3.4I-J). Ceci suggère que ces TFs pourraient agir en amont de P53 en spécifiant l'engagement vers le destin cellulaire de sénescence via une augmentation de l'accessibilité à la chromatine lors du SeRP. Ainsi l'activation de P53 agirait plutôt à titre de stabilisateur du destin cellulaire. Cela expliquerait d'ailleurs que l'induction transcriptionnelle de P21, un des principaux gènes cibles de P53, ait lieu après l'augmentation de l'accessibilité à la chromatine lors du SeRP, soit à 4-5 jours d'activation de RAS (Annexe 2). Il est important de mentionner que nous n'avons pas essayé de voir si la déplétion d'un de ces TFs permettait de diminuer l'accessibilité à la chromatine lors du SeRP, ce qui aurait pu confirmer leur rôle à cet égard. Cependant, tel que susmentionné, il est possible que par la nature probablement redondante de ce réseau, la déplétion d'un seul TF soit compensée par l'activité d'un autre, ce qui explique le fait qu'on ne puisse pas contourner la sénescence RAS en déplaçant un seul TF. Conséquemment, il est possible que la déplétion d'un seul de ces TFs ne soit pas suffisante pour voir une diminution notable de l'accessibilité à la chromatine au SeRP par essai MNase.

De manière intéressante, il a été montré que ETV4 régule la liaison de ER α (ER) à environ 70% de ses cibles dans des cellules de cancer endométrial (615,616). Ainsi, une déplétion de ETV4 dans ces cellules mène à une diminution très importante de la capacité du récepteur à l'estrogène à lier ses cibles transcriptionnelles. Tel que mentionné en introduction, au même titre que FOXA1 agit comme facteur pionnier pour ER dans un contexte de cellules du sein, dans cet article, les auteurs suggèrent que ce serait plutôt ETV4 qui jouerait ce rôle dans le cas de cellules endométriales. Ainsi, à la lumière de nos résultats, il serait intéressant d'investiguer davantage cette piste afin de savoir si ETV4 et RUNX1 peuvent agir à titre de facteurs pionniers lors du SeRP. Nous pourrions évaluer leur potentiel de facteur pionnier en faisant leur CHIP-Seq dans des cellules compromises (3 jours 4OHT) versus non-compromises (1,5 jour), puis en comparant leur patron de liaison à l'ADN avec des résultats de CHIP-Seq pour différentes marques d'acétylation et de méthylation afin de profiler le statut de leurs cibles génomiques à la manière de Martínez-Zamudio, R.I., Roux, P.-F., *et al.* (339). Conséquemment, tout comme AP-1 a été identifié comme facteur pionnier remodelant le paysage d'amplificateurs permissif au destin cellulaire de sénescence induite par RAS (339), il serait concevable que d'autres facteurs également régulés par ERK agissent de concert avec AP-1 (77), notamment ETV4 et RUNX1.

5.6. Conséquences fonctionnelles d'une accessibilité accrue à la chromatine

Nous avons montré dans l'article 2 que l'engagement vers la sénescence induite par RAS est accompagné par une augmentation de l'accessibilité à la chromatine médiée par ERK2 via l'action de plusieurs facteurs de transcription, comprenant notamment ETV4 et RUNX1. Cette ouverture de la chromatine semble causale dans le processus d'engagement vers la sénescence, puisque le fait de forcer l'ouverture de la chromatine raccourcit la fenêtre de compromission suivant l'activation de l'oncogène RAS. Cependant, nous n'apportons pas d'explication sur le mécanisme d'induction de la sénescence par l'ouverture de chromatine dans cet article. Autrement dit, comment l'ouverture de la chromatine enclenche-t-elle le programme de sénescence cellulaire? La section suivante se veut donc une proposition de modèle permettant de répondre à cette question.

Tout d'abord, tel que présenté en introduction, il a été montré que la sénescence était généralement accompagnée par une dérégulation de loci normalement maintenus sous forme d'hétérochromatine au niveau des LADs et des NADs (307,308). Parmi ces loci, il y a notamment des rétrotransposons, des séquences satellites et autres séquences répétées dont la réexpression mènerait à l'activation du phénotype sécrétoire pro-inflammatoire des cellules sénescents (SASP) (309,310). Nous pensons d'ailleurs que l'augmentation d'accessibilité à la chromatine que nous avons identifiée comme cruciale lors du SeRP reflète le début de l'ouverture de ces régions. Ceci permettrait notamment d'expliquer les principales signatures que nous avons obtenu dans notre analyse par RNA-Seq sur les cellules compromises, soit des signatures de SASP (Figure 3.3C,F,K-L et Figure 3.10C-G). De plus, cela pourrait aussi expliquer le fait que ETV4 et RUNX1 semblent réguler le SASP au SeRP (Figure 3.10H-L), probablement indirectement via l'ouverture de ces loci satellites. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer par ChIP-Seq les régions liées par ETV4 et RUNX1 au moment du SeRP afin de voir s'ils lient des LADs ou NADs. Si tel est le cas, il serait intéressant de sélectionner des sites corégulés par ETV4 et RUNX1, puis de cibler un système *CRISPR-activator* (617,618) à ces loci afin de voir si l'on arrive à phénotyper l'induction de sénescence. Il serait également intéressant de valider dans notre modèle si nous observons une diminution de CTCF ou HMGB2 au moment de l'engagement, puisque tous deux ont été montrés comme étant diminués dans la sénescence et leur diminution est associée à l'induction du SASP. En ce qui concerne CTCF, sa diminution mènerait à la réexpression de hSATII qui irait lier et inhiber le

bassin de CTCF restant lié aux loci de gènes du SASP, menant ainsi à l'induction de ces gènes (310). En ce qui concerne HMGB2, sa perte serait plutôt associée à une redistribution de ses niveaux résiduels dans d'autres isolateurs, empêchant ainsi l'étalement de l'hétérochromatine et menant ainsi à l'induction du SASP (313,340).

De manière intéressante, il a été montré que RB s'associe de façon non-canonique et indépendante de son domaine «pocket» avec E2F1 afin de recruter la méthyltransférase EZH2 au niveau de régions répétées comme des satellites et des LINEs, dont LINE-1, afin de les réprimer (619). Or, non seulement le niveau de phosphorylation de RB diminue dans la sénescence (activation de RB), mais ses niveaux totaux semblent également diminuer. Il s'agit en fait d'un débat encore actuel dans le domaine de la sénescence, car plusieurs chercheurs observent le même phénomène, mais puisqu'il semble contrintuitif, les gens évitent généralement de le souligner. Néanmoins, nous observons également ce phénomène et d'ailleurs, même en regardant attentivement dans plusieurs publications, il est possible de le constater (323,620,621). Cette observation est généralement ignorée sous prétexte qu'il s'agirait d'un artefact technique dû à une liaison accrue de RB à la chromatine dans la sénescence, ce qui empêcherait sa solubilisation optimale dans des lysats protéiques. Cependant, cette hypothèse est somme toute incongrue considérant la quantité de détergents utilisée dans les tampons de lyse comme le *Laemmli* et la sonication subséquente des échantillons. De plus, dans mes expériences de fractionnement de la chromatine dans la sénescence RAS, j'ai également observé que RB total diminuait au niveau de la chromatine (Annexe 3). Ainsi, tout comme pour HMGB2 et CTCF susmentionnés, il serait possible qu'une diminution de RB ait pour conséquence une induction du SASP via la réexpression de ces éléments répétés. D'ailleurs tel que mentionné en introduction, LINE-1 a été montré comme dé-réprimé dans la sénescence, ce qui contribuerait au SASP (309).

En ce qui a trait à la sénescence répllicative, celle-ci serait accompagnée par une plus grande décondensation des NADs que des LADs (308). En plus de contenir des régions répétées/satellites et des centromères, les NADs contiennent également des familles de gènes n'étant exprimés que dans certains tissus spécifiques et devant être réprimés dans les autres tissus, *e.g.* des récepteurs olfactifs (622,623). De manière intéressante, notre laboratoire a déjà rapporté la surexpression de ces récepteurs dans la sénescence induite par RAS chez les IMR90 étant des fibroblastes pulmonaires (624). Aussi, nous avons montré en Figure 3.5F-G que ETV4 et une fraction de

RUNX1 s'accumulent non seulement au nucléoplasme, mais également aux nucléoles dans les cellules sénescences. Ainsi, ces éléments couplés à notre augmentation d'accessibilité à la chromatine et au phénotype de SASP précoce nous portent à croire que la décondensation de la chromatine située dans les NADs pourrait être l'élément clé de l'engagement vers la sénescence.

En effet, cette décondensation des NADs pourrait non seulement expliquer en partie l'induction du phénotype sécrétoire des cellules sénescences, mais elle pourrait également potentiellement expliquer les défauts de ribogénèse et l'arrêt du cycle cellulaire observés dans la sénescence. Effectivement, tel que mentionné en introduction, la présence d'hétérochromatine périnucléolaire dans les NADs est à la base de la séparation de phase du nucléole avec le nucléoplasme (230,231). Conséquemment, il est concevable qu'une décondensation de cette hétérochromatine des NADs mène à une diminution de la tension de surface entre le nucléole et le nucléoplasme (227,230), ce qui pourrait résulter en la coalescence des nucléoles (625). Ceci pourrait potentiellement expliquer le mystère qui persiste concernant l'origine du nucléole unique hypertrophique observé dans la sénescence. De plus, la coalescence de plusieurs sphéroïdes en un seul corps mène nécessairement à la diminution du ratio surface/volume du nucléole résultant. Ainsi, tel qu'expliqué en introduction, considérant que la maturation des ARNr survient en périphérie du nucléole à mesure que le transcrit primaire migre de l'interface FC/DFC vers le GC, il est également concevable qu'une diminution du ratio surface/volume du nucléole mène à une diminution de l'efficacité de la maturation co-transcriptionnelle. À terme, ceci mènerait à une diminution de la production des ARNr et à une accumulation des protéines ribosomiques (RPs) hors des ribosomes, tel que précédemment observé par notre laboratoire dans la sénescence (219). Ces RPs pourraient alors inhiber HDM2, permettant ainsi la stabilisation de P53 (236-239). De plus, ces RPs seraient capables d'inhiber des complexes CDKs-cyclines dont CDK4-cyclineD1 menant ainsi à l'activation de RB et l'arrêt du cycle cellulaire (219). Ce modèle illustré en Figure 5.1 ci-après pourrait ainsi répondre à la question demeurée en suspens, soit : quelle est l'origine des défauts de ribogénèse présents dans la sénescence? De plus, tel que mentionné précédemment, l'activation de P53 indépendante des dommages à l'ADN dans la sénescence induite par ETV4 et RUNX1 pourrait s'expliquer par le fait qu'une augmentation importante de l'accessibilité à la chromatine à elle seule induit l'activation d'ATM (523,524). Ainsi, la décondensation des NADs pourrait également mener à la stabilisation et à l'activation de P53.

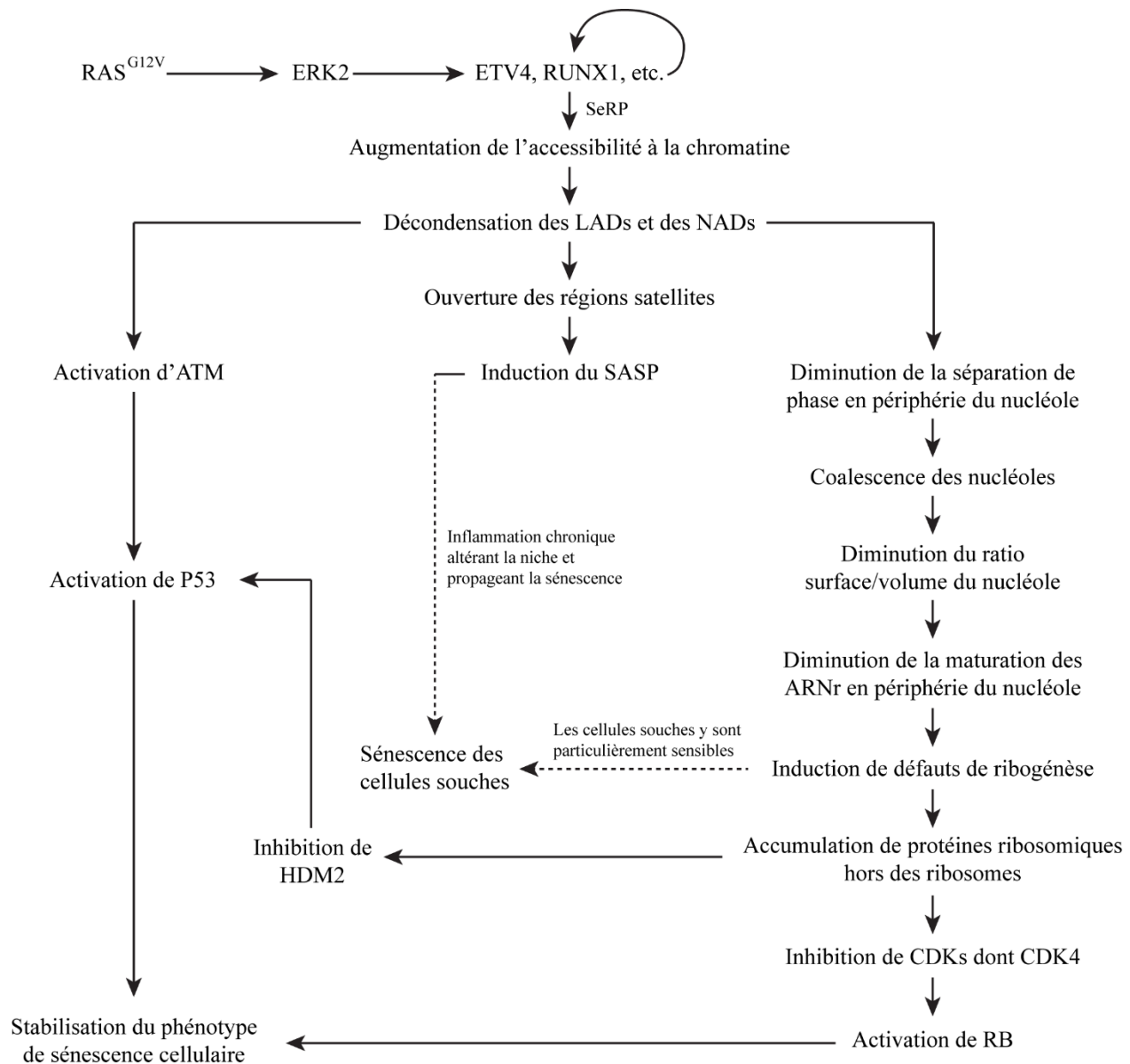


Figure 5.1. Modèle proposé intégrant les concepts issus des articles 2, 3 et de la discussion de cette thèse.

Selon ce modèle, un seuil d'activation intégrant la durée et l'intensité de signalisation par l'oncogène RAS mène à l'activation dépendante de ERK2 d'un réseau auto-régulé de facteurs de transcriptions (TFs) comprenant entre autres ETV4 et RUNX1 relayant le signal de ces kinases. L'activation de ces TFs enclencherait le point de restriction (point de non-retour) compromettant les cellules vers le destin de sénescence cellulaire (SeRP) via une augmentation de l'accessibilité globale à la chromatine. Cette ouverture de la chromatine mènerait à l'activation d'ATM qui stabiliserait et activerait P53 par phosphorylation en Ser15. Parallèlement, parmi les régions génomiques les plus accessibles, nous postulons que les NADs seraient sur-représentés et que leur décondensation mènerait à une perte d'hétérochromatine périnucléolaire et à une diminution concomitante de la tension de surface entre les nucléoles et le nucléoplasme, ce qui induirait la coalescence des nucléoles. Ceci mènerait à une diminution de la maturation des ARNr via une diminution du ratio surface/volume du nucléole résultant. Conséquemment, ces défauts de ribogénèse mèneraient à une désynchronisation entre la production d'ARNr et de protéines ribosomiques (RPs) ce qui causerait l'accumulation de celles-ci hors du ribosome. Ceci mènerait à l'inhibition de HDM2 et la stabilisation conséquente de P53, puis à

l'inhibition de CDK4 et l'activation conséquente de RB. Ainsi, les voies P53 et RB permettraient une pérennisation du phénotype de sénescence à long terme. D'un point de vue systémique, les cellules les plus sensibles aux défauts de ribogénèse seraient les cellules souches dont les niches pourraient en plus être altérées dû à une inflammation chronique médiée par le SASP induit par la dérégulation de régions répétées telles que des satellites.

Cette hypothèse concernant la décondensation des NADs comme mécanisme potentiel d'induction de la sénescence est d'ailleurs soutenue par la littérature. En effet, il a été montré que la formation d'hétérochromatine périnucléolaire au niveau des NORs était contrôlée par des ARNs promoteurs (ARNp) qui seraient eux-mêmes issus de la maturation d'un long ARN non-codant précurseur nommé IGS-ARNr (626,627). En temps normal, les copies inactives d'ADNr seraient maintenues sous forme d'hétérochromatine dans des NORs inactifs via les ARNp qui serviraient de plateforme pour le recrutement du complexe répresseur nucléolaire NoRC au niveau des copies d'ADNr. Cependant, en absence de DHX9, l'enzyme clivant le IGS-ARNr en ARNp, le précurseur IGS-ARNr s'accumule et séquestre le complexe NoRC, l'empêchant d'accéder aux copies d'ADNr, menant ainsi à l'euchromatinisation des loci (626,627). De manière intéressante, DHX9 est diminué dans la sénescence induite par RAS et sa simple déplétion par shARN phénotypique induit la sénescence (628). Il est ainsi probable que cette diminution de DHX9 dans la sénescence mène à l'accumulation de IGS-ARNr, contribuant ainsi à l'euchromatinisation des NADs et à l'induction de sénescence. Ceci implique que les défauts de maturation et de transcription des ARNr observés par notre laboratoire dans la sénescence ne seraient probablement pas une conséquence d'une diminution du nombre de NORs actifs, mais plutôt une conséquence d'une diminution de l'efficacité de maturation dû à la diminution du ratio surface/volume du nucléole tel que précédemment abordé. En effet, considérant que le SeRP arrive en fin de phase d'hyper-prolifération médiée par RAS, il serait possible que l'euchromatinisation / décondensation des NADs mène à l'activation des 10 NORs (génomme diploïde) afin d'augmenter la transcription d'ARNr pour soutenir la prolifération initiale. Cependant, cette décondensation mènerait également à la coalescence des nucléoles, ce qui diminuerait le ratio surface/volume du nucléole et imposerait un stress en diminuant la capacité de maturation des ARNr étant transcrits. Parallèlement, les protéines ribosomiques s'accumuleraient hors des ribosomes dû à une diminution de la production d'ARNr matures, ce qui inhiberait entre autres CDK4, envoyant ainsi un signal pour diminuer la transcription d'ARNr dû à l'arrêt de prolifération. Conséquemment, lorsque le phénotype de sénescence serait complètement induit, nous observerions une diminution tant de la transcription que de la maturation. Il serait donc pertinent d'évaluer le statut

d'accessibilité des NORs lors de l'engagement et une fois la sénescence établie via FRET-FISH par exemple (629), afin de tester cette hypothèse.

De plus, la stabilité des phénotypes de sénescences induites par la surexpression de ETV4 et RUNX1 dans l'article 2 renforce également ce modèle. En effet, nous arrivons à obtenir une sénescence très stable dans les IMR90 qui ont leurs voies P53 et RB intactes. Cependant, dans des cellules KP4 d'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC) ayant leur voie p16/RB non-fonctionnelle, la surexpression de ETV4 ne restaure que partiellement et transitoirement l'effet du Folfirinox dans des «*escapers*» (Figure 3.12E-I). Ainsi, il est concevable que l'ouverture de chromatine arrive à induire un arrêt transitoire de prolifération et un phénotype «*senescence-like*», mais que puisque la voie RB ne peut pas être activée, il n'y a pas de stabilisation du phénotype et donc la sénescence devient réversible. De plus, bien que cette lignée soit officiellement compétente pour P53, nous n'avons jamais été en mesure de le détecter, ce qui suggère que ce sont en fait les deux voies qui ne sont pas activées. Il serait donc intéressant de mesurer par essais MNase l'accessibilité à la chromatine dans des cellules contrôles versus «*escapers*» infectées avec le vecteur contrôle ou ETV4, puis traités au véhicule ou Folfirinox. Nous devrions ainsi observer une augmentation de l'accessibilité à la chromatine dans les cellules contrôles sous Folfirinox comparativement au véhicule, puis potentiellement une incapacité à induire cette augmentation d'accessibilité à la chromatine sous Folfirinox dans les cellules «*escapers*» vecteur, et enfin une ré-augmentation de l'accessibilité à la chromatine dans les cellules «*escapers*» surexprimant ETV4 et traitées au Folfirinox.

Enfin, le fait que les niveaux de ETV4 et RUNX1 augmentent de base sous Folfirinox, puis rediminuent lors de l'échappement à la sénescence dans ce modèle de cancer du pancréas (Figure 3.12C), suggère que les cellules cancéreuses cherchent à éviter cet effet suppresseur de tumeur associé à une chromatine très accessible. En ce sens, il a été rapporté que le patron d'accessibilité à la chromatine de cellules PDAC isolées de tumeurs fraîchement réséquées permettait de prédire la survie en réponse à un traitement chimio-thérapeutique adjuvant (630), confirmant l'importance du statut de la chromatine dans le processus de suppression tumorale. De plus, nous avons obtenu des résultats similaires *in vivo* avec des échantillons pancréatiques de tumeurs bénignes (lésions contenant des cellules sénescents) et malignes (adénocarcinomes) de patients humains. De ce fait, ETV4 et RUNX1 augmentent de manière importante dans les lésions bénignes et diminuent

presque complètement dans les tumeurs malignes (Figure 3.6). Finalement, il a aussi été montré que la surexpression d'ETV4 dans la prostate de souris mène au développement de néoplasies intraépithéliales prostatiques (PIN) ne progressant pas vers le stade de cancer (631). Ces PINs étant reconnues pour contenir des cellules sénescents (91), cela appuie encore une fois le rôle suppresseur de tumeur que nous avons identifié pour ce TF.

5.7. Défauts de ribogénèse : un élément stabilisateur de la sénescence

Tel qu'illustré dans la Figure 5.1 et discuté dans la section précédente, nous constatons que les défauts de ribogénèse identifiés dans la sénescence pourraient en fait être une conséquence de l'augmentation de l'accessibilité de la chromatine lors de l'atteinte du SeRP. De plus, le simple fait de mimer ces défauts en déplaçant des facteurs de ribogénèse permet de reproduire le phénotype de sénescence (219). Enfin, un projet actuel au sein de notre laboratoire semble nous indiquer que ces défauts de ribogénèse seraient importants pour la stabilité du phénotype de sénescence, puisque leur absence dans un modèle de sénescence de cellules cancéreuses du pancréas mène à un échappement rapide de la sénescence. De plus, le fait de réinstaurer ces défauts via des drogues ciblant entre autres l'ARN polymérase I mène à une pérennisation du phénotype de sénescence à long terme (Rowell, M.-C. *et al.*, 2023, en révision à *Communications Biology*). Nous avons ainsi voulu évaluer *in vivo* l'impact fonctionnel de tels défauts de ribogénèse en établissant un modèle murin transgénique conditionnel pour ces défauts via la déplétion inductible à la doxycycline du facteur de ribogénèse Rsl1d1 étant impliqué dans la maturation des ARNr. Nous avons choisi ce gène puisque la protéine qui en résulte est dégradée lors du SAPD et que sa déplétion phénocopie la sénescence. De plus, Rsl1d1 est nécessaire pour le recrutement de Nucléostémine aux nucléoles (242) et il semble interagir avec plusieurs autres facteurs de ribogénèse (219), suggérant que sa déplétion pourrait avoir un effet domino en impactant également le recrutement de ces facteurs. Aussi, ce modèle nous permettrait un jour d'évaluer la faisabilité d'inhiber la ribogénèse plus en aval du processus comme stratégie anticancer, puisqu'une inhibition en amont du processus semble associée à de la toxicité hématologique (241). Il faut toutefois dire qu'il s'agit ici d'une preuve de concept, puisque Rsl1d1 n'est pas actuellement droguable. Néanmoins, advenant une confirmation ultérieure du modèle de décondensation des NADs proposé ci-avant, le phénotypage de ce modèle murin transgénique pourrait nous informer quant aux potentielles conséquences fonctionnelles

d'une décondensation des NADs à l'échelle systémique. En effet, il serait possible que les phénotypes observés chez ce modèle de déplétion conditionnelle de Rsl1d1 (conséquence de la sénescence) soient semblables à ce que l'on observerait dans un modèle transgénique exprimant un *CRISPR-activator* inductible ciblant les régions NADs identifiées dans l'expérience proposée de ChIP-Seq d'ETV4 et RUNX1 (cause potentielle de la sénescence).

Ainsi, nous avons tout d'abord commencé par valider *in vitro* que la déplétion de Rsl1d1 induisait également de la sénescence dans des cellules de souris, tout comme chez l'humain. Pour ce faire, nous avons utilisé comme modèle les C2C12, une lignée murine de myoblastes, soit des cellules progénitrices ayant un haut niveau de ribogénèse semblable aux cellules souches satellites desquelles elles dérivent (632-634). Nous avons aussi évalué que cette sénescence n'était pas due à des effets hors cibles, puisque les deux shRNAs induisaient le même phénotype et que la surexpression d'un mutant Rsl1d1 insensible au shRNA que nous avons conservé pour la génération du modèle murin (sh#86) permettait de sauver le phénotype de sénescence de manière proportionnelle au niveau de surexpression (Figure 4.2). Il est à mentionner que ce mutant ne semble pas s'exprimer très fortement (à peine 1,25x plus), ce qui explique fort probablement qu'on ne sauve pas complètement le phénotype de sénescence. Ainsi, par souci de clarté, il serait pertinent de sous-cloner ce mutant dans un autre plasmide rétroviral exprimant plus fortement la construction (*e.g.* pLPC) afin d'avoir un «*rescue*» complet.

5.8. Établissement du modèle murin transgénique Rickdo

Nous avons subséquentement généré le premier modèle murin transgénique de sénescence induite par des défauts de ribogénèse via la déplétion conditionnelle de Rsl1d1 (souris Rickdo). Nous avons ainsi pu valider que le transgène shRsl1d1 s'exprimait bel et bien en monitorant l'expression du rapporteur turboGFP (Figure 4.3C) et en évaluant les niveaux de Rsl1d1 par immunohistochimie (Figure 4.3D-E). Ce modèle nous a permis de constater que l'inhibition de la maturation des ARNr semble une option intéressante pour des thérapies anticancer puisqu'elle ne semble pas toxique pendant au moins deux mois, après quoi, les souris se mettent à développer de l'alopecie. De plus, ce modèle nous a également permis de constater qu'une altération à long terme de la maturation des ARNr mène au développement d'un phénotype de vieillissement prématuré, tel qu'attendu avec l'accumulation de cellules sénescents à l'échelle systémique *in vivo* (Figure 4.4). Toutefois, les souris semblent montrer un phénotype de vieillissement en santé (*healthy*

aging), puisqu'elles demeurent actives et curieuses. Enfin, nous avons constaté que les cellules induites en sénescence via la déplétion de Rsl1d1 semblent s'accumuler principalement dans des tissus à renouvellement élevé comme les testicules et les follicules pileux, suggérant que l'on affecte principalement les compartiments de cellules souches. Cette observation est somme toute logique considérant que les cellules souches sont les cellules normales ayant le plus haut niveau de ribogénèse *in vivo* (571).

Il est important de mentionner que nous avons uniquement commencé à induire notre transgène lorsque les souris étaient adultes (3-4 mois d'âge) afin de contourner un éventuel problème de toxicité. En effet, les ribosomes d'une cellule étant partagés à chaque division cellulaire entre la cellule mère et la cellule fille, il est nécessaire de régénérer son bassin de ribosomes à chaque division cellulaire. Conséquemment, durant la phase de croissance chez la souris, une inhibition de la ribogénèse serait probablement très toxique. De plus, tel que susmentionné, à long terme, ce modèle transgénique permettrait éventuellement d'évaluer la possibilité d'inhiber la ribogénèse en aval du processus comme stratégie anticancer, donc principalement chez des adultes. Il faut dire que nous voulions initialement valider cette potentielle toxicité dans le cadre d'expériences de phénotypage de notre modèle, mais nous avons eu un problème dans la colonie. En effet, suivant une première expérience avec une quinzaine de souris transgéniques congéniques afin d'observer le phénotype sur fonds pur, nous avons planifié une large expérience avec 90 souris transgéniques afin de mesurer plusieurs paramètres supplémentaires. Cette large expérience devait également servir à comparer le phénotype hétérozygote *versus* homozygote. Cependant, nous avons constaté que le croisement de souris hétérozygotes pour générer des homozygotes pour le shRsl1d1 menait à une recombinaison de ce dernier, inactivant ainsi le transgène. Conséquemment, nous n'avons obtenu que 9 souris dont le transgène était demeuré intact et nous avons donc dû annuler la plupart des expériences prévues, dont les expériences de reproduction que nous devons reprendre dans le futur. En effet, nous avons planifié de croiser des mâles ou femelles shRsl1d1 avec des souris contrôles et de traiter ces souris à la doxycycline au moment de la mise en couple, afin de tester l'effet de la déplétion de Rsl1d1 sur le développement embryonnaire sans avoir le temps d'induire potentiellement un phénotype d'infertilité chez nos reproducteurs. Parallèlement, nous avons planifié de croiser des mâles ou des femelles pré-induits à la doxycycline pendant 2 mois avec des femelles ou des mâles WT afin de voir si la déplétion de Rsl1d1 rend les souris infertiles. En somme, quelques expériences

supplémentaires devront être réalisées afin d'approfondir le phénotypage de notre modèle transgénique.

5.9. Critique du modèle transgénique et expériences futures

Tout d'abord, il faut mentionner que l'établissement de ce modèle murin transgénique ainsi que son phénotypage représentent un second projet que j'ai développé en parallèle de mon projet principal (Article 2) pendant mon doctorat. Ainsi, dû à des contraintes de temps, il ne s'agit pas d'un projet complètement terminé et donc cette section se veut une piste de réflexion sur les expériences qui devraient être réalisées dans le futur afin de soutenir davantage nos observations.

Premièrement, nos résultats sont basés sur le phénotypage de souris avec un seul shARN contre *Rsl1d1*. Bien que nous ayons validé *in vitro* la spécificité du sh*Rsl1d1* utilisé pour notre modèle transgénique (sh#86 issu de l'expérience sur les C2C12), l'idéal serait tout de même d'avoir un deuxième sh*Rsl1d1* *in vivo* pour confirmer que nous obtenons les mêmes phénotypes. Il faut dire que nous avons reçu des chimères pour un second shARN contre *Rsl1d1*, mais uniquement deux ans et demi après le début du projet, ce qui ne m'a pas donné le temps de travailler sur ce modèle. De plus, la compagnie Mirimus ayant généré les chimères pour nous a récemment changé son système, c'est-à-dire qu'ils ont enlevé le transgène codant pour le transactivateur Tet afin de forcer les gens à acheter un deuxième modèle murin pour leurs croisements. Ceci a également retardé le processus pour générer les souris avec un second sh*Rsl1d1*. Ainsi, il faudra que les phénotypes principaux soient validés avec un second shARN pour éliminer la possibilité de phénotypes dus à des effets hors-cibles.

Aussi, il est important de mentionner que lors de l'établissement d'un nouveau modèle transgénique, il peut s'avérer pertinent d'introduire le transgène d'intérêt dans au moins deux fonds génétiques différents afin de s'assurer qu'il ne s'agisse pas de phénotypes dépendants du fonds génétique. En ce sens, tel qu'expliqué dans l'article 3, pour nos expériences, nous avons tout d'abord excisé la cassette STOP en amont du transactivateur Tet chez les chimères F0 reçues de chez Mirimus, puis nous avons redérivé un modèle congénique sur fonds génétique C57BL/6NJ. Nous avons tout de même effectué une expérience pilote avec des souris chimériques afin de voir si nous reproduirions les phénotypes observés une fois sur un fonds pur. Ainsi, le modèle chimérique présentait également les phénotypes d'alopecie, de kyphose et des signes

d'hématopoïèse extramédullaire (splénomégalie avec adipocytes dans la moelle osseuse), ce qui suggère que ces phénotypes seraient probablement conservés à travers différents fonds génétiques. Par contre, de manière importante, les chimères avaient plutôt un phénotype d'obésité et de diabète type II, contrairement au modèle congénique qui est résistant à l'obésité. Ceci pourrait cependant être explicable par l'origine du modèle chimérique. En effet, les blastocystes utilisés pour microinjecter les cellules souches embryonnaires génétiquement modifiées avec le shRsl1d1 proviennent de souris B6-tyr (B6 albinos) qui sont des souris C57BL/6J avec une mutation dans le gène tyrosinase rendant la pigmentation complètement absente de la peau, des poils et des yeux. Notre modèle congénique a quant à lui été généré en rétrocroisant les chimères vers un fonds génétique C57BL/6NJ qui diffère de la souche 6J de par le fait que cette dernière a une délétion dans le gène NNT rendant ces souris très susceptibles au développement d'obésité, de résistance à l'insuline et de diabète de type 2 (635,636). En effet, la réintroduction par transgénèse du gène NNT dans le fonds 6J permet de sauver ces phénotypes associés à un syndrome métabolique. Conséquemment, le phénotype d'obésité que nous avons initialement obtenu dans notre modèle chimérique était peut-être un artéfact de ce modèle et reflétait peut-être une coopération entre des défauts de ribogénèse et la déficience en NNT, une enzyme importante pour les défenses antioxydantes mitochondriales. En effet, il a été montré que la déplétion de NNT mène à une augmentation des gènes de ribogénèse, ce qui permettrait probablement un renouvellement plus élevé des protéines afin de remplacer rapidement celles qui auraient subi des dommages oxydants irréversibles (637) dû à la perte de fonction de NNT. Ainsi, on peut imaginer que le fait de bloquer le mécanisme compensatoire d'augmentation de la ribogénèse pourrait mener à un stress oxydant connu pour augmenter la prolifération et la différenciation des préadipocytes en adipocytes et augmenter la taille des adipocytes matures (638,639). Conséquemment, on pourrait plutôt s'attendre à reproduire notre phénotype actuel de résistance à l'obésité dans des fonds génétiques différents. De plus, considérant que nous semblons avoir un phénotype lié à la sénescence des cellules souches, l'incapacité d'expansion des compartiments adipeux dans notre modèle congénique suggère que nous pourrions peut-être avoir induit une sénescence des progéniteurs préadipocytes qui est généralement associée à une diminution de la capacité de générer des adipocytes (640). Il serait donc intéressant d'isoler ces progéniteurs et de les forcer à se différencier *in vitro* afin de voir si leur fonction est réellement altérée.

Par ailleurs, nous avons constaté une accumulation d'adipocytes dans la moelle osseuse des souris Rickdo (Figure 4.4J), ainsi qu'un phénotype de splénomégalie (Figure 4.4I) particulièrement notable chez les femelles. Tel que discuté en introduction et dans l'article 3, il s'agit là d'un phénotype généralement associé à la sénescence des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) dans la moelle osseuse, causant une différenciation biaisée vers l'adipogénèse au détriment d'autres destins tels que l'ostéogénèse, la chondrogenèse, etc. (357,358). De plus, par leur sécrétome, ces adipocytes sénescents pourraient altérer la fonction des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) en inhibant le développement des lymphocytes B, causant une différenciation biaisée vers la myélopoïèse (361,362). Il serait alors possible de développer une splénomégalie comme conséquence d'une hématopoïèse extramédullaire (641). Cependant, il ne s'agit là que de spéculations et il faudra investiguer davantage cette hypothèse dans notre modèle.

De même, nous avons un phénotype remarquable d'alopecie quasi-complète chez les souris Rickdo après 6 à 9 mois d'induction du transgène (Figure 4.4A) et ceci est accompagné d'une accumulation de cellules sénescents au niveau des follicules pileux (Figure 4.4K) où se trouvent les cellules souches (HFSCs). De manière intéressante, il a été montré chez l'humain que des mutations de type perte de fonction dans le gène RBM28 encodant pour un facteur d'assemblage de la large sous-unité ribosomique menaient à la pathogénèse du syndrome ANE, notamment caractérisé par le développement d'alopecie (642,643). L'étiologie de l'alopecie induite par les défauts de ribogénèse demeure malgré tout mal comprise à ce jour. Néanmoins, on constate que des perturbations de la ribogénèse peuvent en effet mener au développement du phénotype que nous observons. Il est toutefois important de mentionner qu'encore une fois, nous n'avons pas de preuve complète que la fonction des cellules souches dans les follicules pileux est altérée. Conséquemment, tant pour les MSCs que les HSCs ou les HFSCs, il serait pertinent pour la suite du projet de les isoler et de les caractériser davantage pour supporter nos conclusions. Par exemple, en collaboration avec le laboratoire du Dr. Guy Sauvageau, nous planifions éventuellement isoler les HSCs et procéder à des essais de repopulation *in vivo* avec ceux-ci afin de vérifier si les HSCs des souris shRsl1d1 induites à la doxycycline ont une capacité de repopulation amoindrie comparativement à celles de souris de génotypes contrôles. Alternativement, nous pourrions également procéder à l'immunophénotypage de ces souris pour voir si nous avons une sur-représentation des lignées myéloïdes au détriment des lignées lymphoïdes. Ceci nous permettrait d'évaluer par le fait même si une inhibition plus en aval de la ribogénèse empêche l'induction des

défauts hématologiques (*e.g.* neutropénie, thrombocytopénie, etc.) observés lors d'une inhibition plus en amont de la voie. En ce qui a trait aux MSCs, suivant leur isolation, il serait possible de tester leur potentiel de différenciation vers l'ostéogénèse afin de voir si leur fonction est altérée. Enfin, tant pour les MSCs que les HSCs ou les HFSCs, une fois isolées des souris contrôles et Rickdo, nous pourrions mesurer leur pourcentage de positivité à la β -galactosidase associée à la sénescence par cytométrie en flux (Spider- β Gal, Dojindo) et mesurer leur niveau de P16 et de SASP par RT-qPCR.

Un autre point important à mentionner est que nous avons identifié des cellules sénescents dans différents organes via l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (Figure 4.4K-O). Cependant, tel que mentionné en introduction, il n'existe pas de marqueur unique spécifique des cellules sénescents. Ainsi, malgré le fait que la β -galactosidase soit largement utilisée *in vivo* pour identifier des cellules sénescents, il faut idéalement utiliser différents marqueurs en combinaison afin de s'assurer qu'il s'agit de cellules sénescents. Bien que dans certains cas nous ayons plusieurs indices suggérant la présence de cellules sénescents, *e.g.* au niveau de la peau avec l'alopecie couplée à l'augmentation de signal β -Galactosidase et l'accumulation de formes immatures d'ARNr par RT-qPCR, nous devons éventuellement utiliser d'autres marqueurs afin d'étoffer nos conclusions. Ainsi, dans les organes où l'on observe du signal positif pour la β -galactosidase associée à la sénescence, nous devrions également faire des marquages en immunohistochimie pour P16, P21 et KI67. De manière similaire, notre démonstration que la déplétion de *Rsl1d1* induit des défauts de ribogénèse n'est objectivement pas très poussée, puisqu'elle ne repose que sur des RT-qPCR effectuées sur des échantillons de peau (Figure 4.4L). Conséquemment, il faudra éventuellement regarder dans d'autres organes tels que les testicules, le pancréas et idéalement, directement sur les populations de cellules souches susmentionnées. De plus, nous devrions mesurer le tout par northern-blot plutôt que par RT-qPCR, puisque les northern-blots permettent de voir chaque forme intermédiaire générée durant la maturation des ARNr, alors que la RT-qPCR mesure généralement plusieurs intermédiaires en même temps puisque les amorces couvrent souvent des sites partagés entre deux ou trois transcrits immatures. Enfin, nous montrons en Figure 4.7E que l'histologie du tissu adipeux brun (BAT) des souris *shRsl1d1* semble suggérer une thermogénèse et une β -oxydation des lipides accrues. Il est à mentionner que nous avons essayé de mesurer la température des souris avec un thermomètre à infrarouge, mais n'avons pas été en mesure de voir des différences significatives. Toutefois, le fait que les souris *shRsl1d1*

présentent une alopecie quasi-complète pourrait mener à une perte de chaleur accrue puisque le poil des animaux leur permet généralement de réguler leur température. Ainsi, il n'est pas à exclure que ces souris aient une thermogénèse accrue, mais qu'elle soit camouflée par ce biais. Conséquemment, il serait intéressant de valider ces observations en regardant des marqueurs de thermogénèse (*e.g.* Ucp1, Prdm16 et Elovl3) et de β -oxydation (*e.g.* Cpt1 α et AcadM) par RT-qPCR sur des échantillons de BAT de souris contrôles versus Rickdo.

Somme toute, les compartiments cellulaires affectés par le phénotype de vieillissement prématuré dans notre modèle transgénique suggèrent que nous aurions un modèle *in vivo* de sénescence prématurée des cellules souches (Figure 5.1). Advenant une confirmation de la sénescence des cellules souches lors des expériences susmentionnées, ce modèle pourrait éventuellement s'avérer utile pour tester le potentiel d'interventions pharmacologiques afin de ralentir la dégénérescence des cellules souches lors du vieillissement. Cependant, les résultats actuels en Figure 4.4 soulèvent également une question intrigante, soit : si les perturbations de la ribogénèse affectent principalement les compartiments de cellules souches, pourquoi n'observons-nous pas une accumulation de cellules sénescents dans tous les compartiments de cellules souches? Une possibilité serait que certains compartiments de cellules souches sont plus sollicités que d'autres au niveau basal. En effet, si l'on prend par exemple les spermatogonia (cellules souches en périphérie des tubules séminifères), celles-ci doivent constamment régénérer le bassin de spermatozoïdes durant la vie adulte de l'animal. De même, les HFSCs, les MSCs et les HSCs sont constamment sollicités durant la vie active de l'animal. Ainsi, une perturbation de la ribogénèse impose probablement un stress plus fort menant à un épuisement des cellules souches dans ces compartiments. Par opposition, si on prend par exemple les cellules souches satellites entrant en prolifération principalement lors de lésions musculaires, il est concevable qu'il faudrait probablement «forcer le système» en induisant un besoin en prolifération des cellules satellites afin de voir un épuisement prématuré de ce compartiment dans les souris Rickdo. Ainsi, il serait possible dans le futur de soumettre des souris contrôles et shRsl1d1 à un entraînement physique régulier (644) afin de voir si, dans ce contexte, on observe une accumulation de cellules sénescents dans les muscles squelettiques des souris shRsl1d1. Il faut toutefois dire que nous n'avons pas observé de différences significatives pour la coloration β -galactosidase associée à la sénescence dans les cryptes intestinales des souris shRsl1d1 comparativement aux souris contrôles. Or, l'épithélium intestinal est le tissu qui s'auto-renouvelle le plus rapidement chez les mammifères

adultes (645). Cependant, ceci pourrait potentiellement être explicable par le fait que les souris contrôles ont des niveaux plasmatiques de glucose et d'insuline beaucoup plus élevés à jeun que les souris Rickdo (Figure 4.7F-G). En effet, il a été montré que le glucose et l'insuline stimulent tous deux la prolifération des cellules souches des cryptes intestinales via une augmentation de la glycolyse médiée par la voie AKT (646,647). Conséquemment, à long terme, les cellules des cryptes des souris contrôles ont probablement été plus sollicitées que celles des souris Rickdo, menant à un potentiel épuisement/stress prématuré. Ainsi, il est possible que cela «camoufle» une éventuelle accumulation de signal β -Gal dans les cryptes des souris shRsl1d1.

Enfin, nous devrions éventuellement tester des thérapies de sénolyse sur notre modèle transgénique afin de confirmer que le phénotype de vieillissement prématuré que nous observons est bien dû à l'accumulation de cellules sénescents. De plus, une telle expérience nous permettrait d'évaluer si nous pouvons renverser certains phénotypes tels que l'alopécie, la kyphose et l'accumulation d'adipocytes dans la moelle osseuse. Toutefois, il faudrait probablement induire le transgène pour un maximum de 6 mois, puisqu'au-delà de ça, il serait possible qu'on commence à affecter la fonction des cellules souches indépendamment du transgène, simplement dû au vieillissement normal de l'animal. Somme toute, plusieurs études récentes dans le domaine de la thérapie cellulaire semblent montrer que l'utilisation de drogues sénolytiques permettrait d'améliorer la fonction des cellules souches dans divers compartiments (552,648-650). Finalement, le fait de tester des sénolytiques dans ce modèle transgénique permettrait aussi d'évaluer la faisabilité et l'innocuité d'une stratégie de type *one-two punch* basée sur l'induction de sénescence via une perturbation de la maturation des ARNr, une avenue probablement moins toxique que l'inhibition de la transcription, suivie d'un traitement sénolytique.

6. Conclusion

Lors du processus de tumorigénèse, l'activation de l'oncogène RAS peut mener à des destins cellulaires différents tels que la prolifération, la sénescence ou l'apoptose. Cependant, les mécanismes moléculaires régissant l'engagement vers la prolifération ou la sénescence demeuraient à ce jour inconnus. Ainsi, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse permet de mieux comprendre comment les cellules distinguent entre une signalisation pro-proliférative et pro-sénescence suivant l'activation de l'oncogène RAS. En effet, nous montrons que l'engagement vers la sénescence dépend de l'atteinte d'un point de restriction (SeRP) intégrant le niveau d'activation de la voie RAS-MAPK et la durée de signalisation. D'un point de vue moléculaire, cette intégration est effectuée par les kinases ERK en aval de RAS qui vont agir sur la chromatine en activant un réseau auto-régulé de TFs capables de relayer la signalisation MAPK même en absence du signal initial. Ce réseau comprenant entre autres ETV4 et RUNX1 va induire une augmentation d'accessibilité à la chromatine décisive pour l'engagement vers la sénescence. Au final, l'atteinte du SeRP sera définie par le statut d'accessibilité à la chromatine. De ce fait, nous avons montré que des signalisations oncogéniques antagonistes au point de vue de leurs effets sur le niveau absolu d'activation des kinases ERK (RAS+MYC) peuvent tout de même coopérer pour induire un phénotype de sénescence via leur action concertée au niveau de la chromatine.

Toutefois, notre modèle actuel nous porte à croire que la nature précise des loci génomiques décondensés serait tout aussi importante sinon plus que le seuil absolu d'ouverture de la chromatine. Ainsi, nous pensons que la décondensation de l'hétérochromatine périnucléolaire serait clé pour enclencher le phénotype sécrétoire et l'arrêt stable de prolifération, via l'induction de défauts de ribogénèse qui aideraient à stabiliser le phénotype de sénescence. Nous montrons ainsi dans un second temps que reproduire ces défauts de ribogénèse à long terme *in vivo* dans un modèle murin transgénique mène à un phénotype de vieillissement prématuré tel qu'attendu par l'accumulation de cellules sénescents à l'échelle systémique. Toutefois, le bassin de cellules étant sénescents dans ce modèle transgénique suggère une atteinte principale des cellules souches comme origine de ce phénotype de vieillissement prématuré. La dégénérescence fonctionnelle de la plupart des compartiments de cellules souches ayant été liée à la pathogénèse de plusieurs maladies associées au vieillissement dont le cancer, l'emploi d'un tel modèle murin transgénique

pourrait s'avérer utile dans le futur afin de tester des thérapies visant à améliorer la fonction des cellules souches lors du vieillissement.

De plus, l'ensemble des résultats présentés dans cette thèse nous pousse à repenser les stratégies thérapeutiques antitumorales actuelles visant à moduler directement l'amplitude de signalisation de la voie MAPK via des inhibiteurs ou agonistes de la voie. En effet, les kinases ERK ayant de multiples fonctions antagonistes dans la cellule, et leur niveau basal étant très variable entre différents types cellulaires, ce type de stratégie est voué à avoir des effets cytotoxiques indésirables. Ainsi, une stratégie alternative possiblement plus sécuritaire serait de tenter de reproduire la conséquence fonctionnelle suppresseur de tumeur associée au SeRP, *i.e.* une augmentation d'accessibilité de la chromatine, plutôt que d'essayer de moduler la signalisation en amont afin d'obtenir cet effet.

Au final, les concepts abordés dans cette thèse suggèrent que, dans un contexte de tumeurs mutées en RAS, l'utilisation d'inhibiteurs de HDACs pourrait être une option intéressante pour des thérapies néoadjuvantes en combinaison avec une chimiothérapie adaptée au cancer d'intérêt. Ceci permettrait d'augmenter la pénétrance du phénotype de sénescence au sein de la tumeur suivant la chimiothérapie, afin d'éliminer par la suite ces cellules cancéreuses sénescents via l'emploi de sénolytiques.

7. Bibliographie

1. Brenner, D. R., Poirier, A., Woods, R. R., Ellison, L. F., Billette, J. M., Demers, A. A., Zhang, S. X., Yao, C., Finley, C., Fitzgerald, N., Saint-Jacques, N., Shack, L., Turner, D., Holmes, E., and Canadian Cancer Statistics Advisory, C. (2022) Projected estimates of cancer in Canada in 2022. *CMAJ* **194**, E601-E607
2. Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Rutkowski, P., Lao, C. D., Cowey, C. L., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., Ferrucci, P. F., Smylie, M., Hogg, D., Hill, A., Marquez-Rodas, I., Haanen, J., Guidoboni, M., Maio, M., Schoffski, P., Carlino, M. S., Lebbe, C., McArthur, G., Ascierto, P. A., Daniels, G. A., Long, G. V., Bastholt, L., Rizzo, J. I., Balogh, A., Moshyk, A., Hodi, F. S., and Wolchok, J. D. (2019) Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* **381**, 1535-1546
3. Ellison, L. (2017) Age-specific patterns in the diagnosis of, and survival from, pancreatic cancer in Canada. Statistics Canada Catalogue, no 82-624-X
4. 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
5. 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
6. Palazzo, A., Hernandez-Vargas, H., Goehrig, D., Medard, J. J., Vindrieux, D., Flaman, J. M., and Bernard, D. (2022) Transformed cells after senescence give rise to more severe tumor phenotypes than transformed non-senescent cells. *Cancer Lett* **546**, 215850
7. Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* **14**, e1002533
8. Salzberg, S. L. (2018) Open questions: How many genes do we have? *BMC Biol* **16**, 94
9. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854
10. Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., Garcia, J. A., and Paz-Ares, J. (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* **39**, 1033-1037
11. Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., and Bozzoni, I. (2011) A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* **147**, 358-369

12. Nowell, P. C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-28
13. Choi, J., Shendrik, I., Peacocke, M., Peehl, D., Buttyan, R., Ikeguchi, E. F., Katz, A. E., and Benson, M. C. (2000) Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* **56**, 160-166
14. Castro, P., Giri, D., Lamb, D., and Ittmann, M. (2003) Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* **55**, 30-38
15. Lim, K. B. (2017) Epidemiology of clinical benign prostatic hyperplasia. *Asian J Urol* **4**, 148-151
16. Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2006) Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med* **355**, 1037-1046
17. Hanahan, D. (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **12**, 31-46
18. Mazur, P. K., and Siveke, J. T. (2012) Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology. *Gut* **61**, 1488-1500
19. Patra, K. C., Bardeesy, N., and Mizukami, Y. (2017) Diversity of Precursor Lesions For Pancreatic Cancer: The Genetics and Biology of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm. *Clin Transl Gastroenterol* **8**, e86
20. 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
21. Storz, P. (2017) Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 296-304
22. 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
23. Sethi, V., Giri, B., Saluja, A., and Dudeja, V. (2017) Insights into the Pathogenesis of Pancreatic Cystic Neoplasms. *Dig Dis Sci* **62**, 1778-1786
24. Tan, M. C., Basturk, O., Brannon, A. R., Bhanot, U., Scott, S. N., Bouvier, N., LaFemina, J., Jarnagin, W. R., Berger, M. F., Klimstra, D., and Allen, P. J. (2015) GNAS and KRAS Mutations Define Separate Progression Pathways in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm-Associated Carcinoma. *J Am Coll Surg* **220**, 845-854 e841
25. 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

26. Guerra, C., Collado, M., Navas, C., Schuhmacher, A. J., Hernandez-Porras, I., Canamero, M., Rodriguez-Justo, M., Serrano, M., and Barbacid, M. (2011) Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **19**, 728-739
27. 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
28. Miyasaka, Y., Nagai, E., Ohuchida, K., Fujita, H., Nakata, K., Hayashi, A., Mizumoto, K., Tsuneyoshi, M., and Tanaka, M. (2011) Senescence in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Hum Pathol* **42**, 2010-2017
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. Bardeesy, N., Cheng, K. H., Berger, J. H., Chu, G. C., Pahler, J., Olson, P., Hezel, A. F., Horner, J., Lauwers, G. Y., Hanahan, D., and DePinho, R. A. (2006) Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev* **20**, 3130-3146
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. 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
33. 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
34. Hosein, A. N., Dangol, G., Okumura, T., Roszik, J., Rajapakshe, K., Siemann, M., Zaid, M., Ghosh, B., Monberg, M., Guerrero, P. A., Singhi, A., Haymaker, C. L., Clevers, H., Abou-Elkacem, L., Woermann, S. M., and Maitra, A. (2022) Loss of Rnf43 Accelerates Kras-Mediated Neoplasia and Remodels the Tumor Immune Microenvironment in Pancreatic Adenocarcinoma. *Gastroenterology* **162**, 1303-1318 e1318
35. Basturk, O., Hong, S. M., Wood, L. D., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Brosens, L. A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R. H., Kato, Y., Klimstra, D. S., Kloppel, G., Krasinskas, A., Longnecker, D. S., Matthaei, H., Offerhaus, G. J., Shimizu, M., Takaori, K., Terris, B., Yachida, S., Esposito, I., Furukawa, T., and Baltimore

- Consensus, M. (2015) A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol* **39**, 1730-1741
36. Prior, I. A., Hood, F. E., and Hartley, J. L. (2020) The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res* **80**, 2969-2974
 37. Hancock, J. F., Paterson, H., and Marshall, C. J. (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**, 133-139
 38. Swarthout, J. T., Lobo, S., Farh, L., Croke, M. R., Greentree, W. K., Deschenes, R. J., and Linder, M. E. (2005) DHHC9 and GCP16 constitute a human protein fatty acyltransferase with specificity for H- and N-Ras. *J Biol Chem* **280**, 31141-31148
 39. Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* **11**, 507-517
 40. Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* **110**, 775-787
 41. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., and Kuriyan, J. (2006) An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**, 1137-1149
 42. 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
 43. 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
 44. Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., and Cooper, J. A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**, 205-214
 45. Koide, H., Satoh, T., Nakafuku, M., and Kaziro, Y. (1993) GTP-dependent association of Raf-1 with Ha-Ras: identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8683-8686
 46. Dumaz, N., and Marais, R. (2003) Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J Biol Chem* **278**, 29819-29823
 47. Jaumot, M., and Hancock, J. F. (2001) Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* **20**, 3949-3958

48. Noble, C., Mercer, K., Hussain, J., Carragher, L., Giblett, S., Hayward, R., Patterson, C., Marais, R., and Pritchard, C. A. (2008) CRAF autophosphorylation of serine 621 is required to prevent its proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* **31**, 862-872
49. Diaz, B., Barnard, D., Filson, A., MacDonald, S., King, A., and Marshall, M. (1997) Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol Cell Biol* **17**, 4509-4516
50. Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B. J., Anderson, D. J., Alvarado, R., Ludlam, M. J., Stokoe, D., Gloor, S. L., Vigers, G., Morales, T., Aliagas, I., Liu, B., Sideris, S., Hoeflich, K. P., Jaiswal, B. S., Seshagiri, S., Koeppen, H., Belvin, M., Friedman, L. S., and Malek, S. (2010) RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* **464**, 431-435
51. Douziech, M., Sahmi, M., Laberge, G., and Therrien, M. (2006) A KSR/CNK complex mediated by HYP, a novel SAM domain-containing protein, regulates RAS-dependent RAF activation in Drosophila. *Genes Dev* **20**, 807-819
52. McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M., and Franklin, R. A. (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1263-1284
53. Gardner, A. M., Vaillancourt, R. R., Lange-Carter, C. A., and Johnson, G. L. (1994) MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Mol Biol Cell* **5**, 193-201
54. 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
55. 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
56. Cargnello, M., and Roux, P. P. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**, 50-83
57. Deschenes-Simard, X., Kottakis, F., Meloche, S., and Ferbeyre, G. (2014) ERKs in cancer: friends or foes? *Cancer Res* **74**, 412-419
58. 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
59. Bulavin, D. V., Saito, S., Hollander, M. C., Sakaguchi, K., Anderson, C. W., Appella, E., and Fornace, A. J., Jr. (1999) Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-

- terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* **18**, 6845-6854
60. She, Q. B., Chen, N., and Dong, Z. (2000) ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem* **275**, 20444-20449
 61. Saha, R. N., Jana, M., and Pahan, K. (2007) MAPK p38 regulates transcriptional activity of NF-kappaB in primary human astrocytes via acetylation of p65. *J Immunol* **179**, 7101-7109
 62. Ventura, J. J., Hubner, A., Zhang, C., Flavell, R. A., Shokat, K. M., and Davis, R. J. (2006) Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* **21**, 701-710
 63. Coulombe, P., and Meloche, S. (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1376-1387
 64. Castellano, E., and Downward, J. (2010) Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Curr Top Microbiol Immunol* **346**, 143-169
 65. Cantley, L. C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657
 66. Fowler, T., Sen, R., and Roy, A. L. (2011) Regulation of primary response genes. *Mol Cell* **44**, 348-360
 67. Rivera, V. M., Miranti, C. K., Misra, R. P., Ginty, D. D., Chen, R. H., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1993) A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* **13**, 6260-6273
 68. Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V., and Nordheim, A. (1993) Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J* **12**, 5097-5104
 69. Liao, J., Hodge, C., Meyer, D., Ho, P. S., Rosenspire, K., and Schwartz, J. (1997) Growth hormone regulates ternary complex factors and serum response factor associated with the c-fos serum response element. *J Biol Chem* **272**, 25951-25958
 70. Hollenhorst, P. C., McIntosh, L. P., and Graves, B. J. (2011) Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annu Rev Biochem* **80**, 437-471
 71. Wang, G., Balamotis, M. A., Stevens, J. L., Yamaguchi, Y., Handa, H., and Berk, A. J. (2005) Mediator requirement for both recruitment and postrecruitment steps in transcription initiation. *Mol Cell* **17**, 683-694
 72. Balamotis, M. A., Pennella, M. A., Stevens, J. L., Wasylyk, B., Belmont, A. S., and Berk, A. J. (2009) Complexity in transcription control at the activation domain-mediator interface. *Sci Signal* **2**, ra20

73. 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
74. Wei, G. H., Badis, G., Berger, M. F., Kivioja, T., Palin, K., Enge, M., Bonke, M., Jolma, A., Varjosalo, M., Gehrke, A. R., Yan, J., Talukder, S., Turunen, M., Taipale, M., Stunnenberg, H. G., Ukkonen, E., Hughes, T. R., Bulyk, M. L., and Taipale, J. (2010) Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo. *EMBO J* **29**, 2147-2160
75. Kim, W. Y., Sieweke, M., Ogawa, E., Wee, H. J., Englmeier, U., Graf, T., and Ito, Y. (1999) Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *EMBO J* **18**, 1609-1620
76. Goetz, T. L., Gu, T. L., Speck, N. A., and Graves, B. J. (2000) Auto-inhibition of Ets-1 is counteracted by DNA binding cooperativity with core-binding factor alpha2. *Mol Cell Biol* **20**, 81-90
77. Currie, S. L., Doane, J. J., Evans, K. S., Bhachech, N., Madison, B. J., Lau, D. K. W., McIntosh, L. P., Skalicky, J. J., Clark, K. A., and Graves, B. J. (2017) ETV4 and AP1 Transcription Factors Form Multivalent Interactions with three Sites on the MED25 Activator-Interacting Domain. *J Mol Biol* **429**, 2975-2995
78. Ren, Y., Ouyang, Z., Hou, Z., Yan, Y., Zhi, Z., Shi, M., Du, M., Liu, H., Wen, Y., and Shao, Y. (2020) CIC Is a Mediator of the ERK1/2-DUSP6 Negative Feedback Loop. *iScience* **23**, 101635
79. Ekerot, M., Stavridis, M. P., Delavaine, L., Mitchell, M. P., Staples, C., Owens, D. M., Keenan, I. D., Dickinson, R. J., Storey, K. G., and Keyse, S. M. (2008) Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochem J* **412**, 287-298
80. Mason, J. M., Morrison, D. J., Basson, M. A., and Licht, J. D. (2006) Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* **16**, 45-54
81. Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002) Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* **4**, 850-858
82. Yusoff, P., Lao, D. H., Ong, S. H., Wong, E. S., Lim, J., Lo, T. L., Leong, H. F., Fong, C. W., and Guy, G. R. (2002) Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *J Biol Chem* **277**, 3195-3201
83. 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

84. Vatansever, S., Erman, B., and Gumus, Z. H. (2019) Oncogenic G12D mutation alters local conformations and dynamics of K-Ras. *Sci Rep* **9**, 11730
85. Hayflick, L. (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**, 614-636
86. Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460
87. Stanulis-Praeger, B. M. (1987) Cellular senescence revisited: a review. *Mech Ageing Dev* **38**, 1-48
88. McHugh, D., and Gil, J. (2018) Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol* **217**, 65-77
89. He, S., and Sharpless, N. E. (2017) Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000-1011
90. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2010) The essence of senescence. *Genes Dev* **24**, 2463-2479
91. Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. K., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P. P. (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725-730
92. Kovtonyuk, L. V., Fritsch, K., Feng, X., Manz, M. G., and Takizawa, H. (2016) Inflamm-Aging of Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cells, and the Bone Marrow Microenvironment. *Front Immunol* **7**, 502
93. 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
94. 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
95. 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
96. Villiard, E., Denis, J. F., Hashemi, F. S., Igelmann, S., Ferbeyre, G., and Roy, S. (2017) Senescence gives insights into the morphogenetic evolution of anamniotes. *Biol Open* **6**, 891-896

97. 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
98. 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
99. 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
100. Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D., and Serrano, M. (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**, 642
101. 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
102. Sun, Y., Campisi, J., Higano, C., Beer, T. M., Porter, P., Coleman, I., True, L., and Nelson, P. S. (2012) Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med* **18**, 1359-1368
103. 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
104. Zhang, B., Fu, D., Xu, Q., Cong, X., Wu, C., Zhong, X., Ma, Y., Lv, Z., Chen, F., Han, L., Qian, M., Chin, Y. E., Lam, E. W., Chiao, P., and Sun, Y. (2018) The senescence-associated secretory phenotype is potentiated by feedforward regulatory mechanisms involving Zscan4 and TAK1. *Nat Commun* **9**, 1723
105. Tuveson, D. A., Shaw, A. T., Willis, N. A., Silver, D. P., Jackson, E. L., Chang, S., Mercer, K. L., Grochow, R., Hock, H., Crowley, D., Hingorani, S. R., Zaks, T., King, C., Jacobetz, M. A., Wang, L., Bronson, R. T., Orkin, S. H., DePinho, R. A., and Jacks, T. (2004) Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* **5**, 375-387
106. Courtois-Cox, S., Genter Williams, S. M., Reczek, E. E., Johnson, B. W., McGillicuddy, L. T., Johannessen, C. M., Hollstein, P. E., MacCollin, M., and Cichowski, K. (2006) A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **10**, 459-472

107. 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
108. 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
109. 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
110. 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
111. Whitehurst, A. W., Robinson, F. L., Moore, M. S., and Cobb, M. H. (2004) The death effector domain protein PEA-15 prevents nuclear entry of ERK2 by inhibiting required interactions. *J Biol Chem* **279**, 12840-12847
112. Mace, P. D., Wallez, Y., Egger, M. F., Dobaczewska, M. K., Robinson, H., Pasquale, E. B., and Riedl, S. J. (2013) Structure of ERK2 bound to PEA-15 reveals a mechanism for rapid release of activated MAPK. *Nat Commun* **4**, 1681
113. 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
114. Lazzerini Denchi, E., Attwooll, C., Pasini, D., and Helin, K. (2005) Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland. *Mol Cell Biol* **25**, 2660-2672
115. Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L. V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V. C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Andersen, C. L., Dyrskjot, L., Orntoft, T., Lukas, J., Kittas, C., Helleday, T., Halazonetis, T. D., Bartek, J., and Gorgoulis, V. G. (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633-637
116. Astle, M. V., Hannan, K. M., Ng, P. Y., Lee, R. S., George, A. J., Hsu, A. K., Haupt, Y., Hannan, R. D., and Pearson, R. B. (2012) AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* **31**, 1949-1962
117. Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K., and McMahon, M. (2007) A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev* **21**, 379-384

118. Gire, V., and Dulic, V. (2015) Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle* **14**, 297-304
119. Suryadinata, R., Sadowski, M., and Sarcevic, B. (2010) Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci Rep* **30**, 243-255
120. Ohtani, K., DeGregori, J., and Nevins, J. R. (1995) Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12146-12150
121. Duronio, R. J., and O'Farrell, P. H. (1995) Developmental control of the G1 to S transition in *Drosophila*: cyclin E is a limiting downstream target of E2F. *Genes Dev* **9**, 1456-1468
122. Geng, Y., Eaton, E. N., Picon, M., Roberts, J. M., Lundberg, A. S., Gifford, A., Sardet, C., and Weinberg, R. A. (1996) Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* **12**, 1173-1180
123. Lundberg, A. S., and Weinberg, R. A. (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18**, 753-761
124. Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei Santi, A., Postigo, A. A., and Dean, D. C. (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**, 859-869
125. Kim, S., Leong, A., Kim, M., and Yang, H. W. (2022) CDK4/6 initiates Rb inactivation and CDK2 activity coordinates cell-cycle commitment and G1/S transition. *Sci Rep* **12**, 16810
126. Hateboer, G., Wobst, A., Petersen, B. O., Le Cam, L., Vigo, E., Sardet, C., and Helin, K. (1998) Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F. *Mol Cell Biol* **18**, 6679-6697
127. Ohtani, K., Iwanaga, R., Nakamura, M., Ikeda, M., Yabuta, N., Tsuruga, H., and Nojima, H. (1999) Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene* **18**, 2299-2309
128. Li, Q., Zhang, Y., Fu, J., Han, L., Xue, L., Lv, C., Wang, P., Li, G., and Tong, T. (2013) FOXA1 mediates p16(INK4a) activation during cellular senescence. *EMBO J* **32**, 858-873
129. Voncken, J. W., Niessen, H., Neufeld, B., Rennefahrt, U., Dahlmans, V., Kubben, N., Holzer, B., Ludwig, S., and Rapp, U. R. (2005) MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1. *J Biol Chem* **280**, 5178-5187
130. 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

131. Kotake, Y., Zeng, Y., and Xiong, Y. (2009) DDB1-CUL4 and MLL1 mediate oncogene-induced p16INK4a activation. *Cancer Res* **69**, 1809-1814
132. 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
133. 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
134. Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonja, 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
135. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299
136. Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N., and Liu, E. A. (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844-848
137. 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
138. Llanos, S., Clark, P. A., Rowe, J., and Peters, G. (2001) Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* **3**, 445-452
139. 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
140. Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. B., and Siliciano, J. D. (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**, 1677-1679
141. el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825
142. Waldman, T., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1995) p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* **55**, 5187-5190

143. Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. (1995) Mice lacking p21^{CIP1}/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675-684
144. Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-1501
145. Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J., Jr. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**, 587-597
146. Wang, X. W., Zhan, Q., Coursen, J. D., Khan, M. A., Kontny, H. U., Yu, L., Hollander, M. C., O'Connor, P. M., Fornace, A. J., Jr., and Harris, C. C. (1999) GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3706-3711
147. Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997) 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* **1**, 3-11
148. Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1999) 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**, 616-620
149. Innocente, S. A., Abrahamson, J. L., Cogswell, J. P., and Lee, J. M. (1999) p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2147-2152
150. de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R. V., Pandolfi, P. P., Ferbeyre, G., and Lowe, S. W. (2004) PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* **13**, 523-535
151. 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
152. 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
153. 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
154. Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L. J., and Ames, B. N. (1995) Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4337-4341

155. Nassour, J., Martien, S., Martin, N., Deruy, E., Tomellini, E., Malaquin, N., Bouali, F., Sabatier, L., Wernert, N., Pinte, S., Gilson, E., Pourtier, A., Pluquet, O., and Abbadie, C. (2016) Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nat Commun* **7**, 10399
156. Rai, P., Young, J. J., Burton, D. G., Giribaldi, M. G., Onder, T. T., and Weinberg, R. A. (2011) Enhanced elimination of oxidized guanine nucleotides inhibits oncogenic RAS-induced DNA damage and premature senescence. *Oncogene* **30**, 1489-1496
157. Ramdzan, Z. M., Vadnais, C., Pal, R., Vandal, G., Cadieux, C., Leduy, L., Davoudi, S., Hulea, L., Yao, L., Karnezis, A. N., Paquet, M., Dankort, D., and Nepveu, A. (2014) RAS transformation requires CUX1-dependent repair of oxidative DNA damage. *PLoS Biol* **12**, e1001807
158. Zhao, Z., Gad, H., Benitez-Buelga, C., Sanjiv, K., Xiangwei, H., Kang, H., Feng, M., Zhao, Z., Berglund, U. W., Xia, Q., and Helleday, T. (2021) NEIL3 Prevents Senescence in Hepatocellular Carcinoma by Repairing Oxidative Lesions at Telomeres during Mitosis. *Cancer Res* **81**, 4079-4093
159. Vickridge, E., Faraco, C. C. F., Tehrani, P. S., Ramdzan, Z. M., Rahimian, H., Leduy, L., Gingras, A. C., and Nepveu, A. (2022) The DNA repair function of BCL11A suppresses senescence and promotes continued proliferation of triple-negative breast cancer cells. *NAR Cancer* **4**, zcac028
160. Jackson, S. P., and Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-1078
161. 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
162. 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
163. d'Adda di Fagagna, F. (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* **8**, 512-522
164. Seoane, M., Costoya, J. A., and Arce, V. M. (2017) Uncoupling Oncogene-Induced Senescence (OIS) and DNA Damage Response (DDR) triggered by DNA hyper-replication: lessons from primary mouse embryo astrocytes (MEA). *Sci Rep* **7**, 12991
165. Ogrunc, M., Di Micco, R., Liontos, 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

166. 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
167. Passos, J. F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M. J., Harold, G., Schaeuble, K., Birch-Machin, M. A., Kirkwood, T. B., and von Zglinicki, T. (2007) Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* **5**, e110
168. 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
169. Weyemi, U., Lagente-Chevallier, O., Boufraquech, M., Prenois, F., Courtin, F., Caillou, B., Talbot, M., Dardalhon, M., Al Ghuzlan, A., Bidart, J. M., Schlumberger, M., and Dupuy, C. (2012) ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene* **31**, 1117-1129
170. Bittles, A. H., and Harper, N. (1984) Increased glycolysis in ageing cultured human diploid fibroblasts. *Biosci Rep* **4**, 751-756
171. 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
172. 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
173. Imai, S., and Guarente, L. (2014) NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol* **24**, 464-471
174. Hoshino, A., Mita, Y., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Iwai-Kanai, E., Ueyama, T., Ikeda, K., Ogata, T., and Matoba, S. (2013) Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. *Nat Commun* **4**, 2308
175. Ahmad, T., Sundar, I. K., Lerner, C. A., Gerloff, J., Tormos, A. M., Yao, H., and Rahman, I. (2015) Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J* **29**, 2912-2929
176. Manzella, N., Santin, Y., Maggiorani, D., Martini, H., Douin-Echinard, V., Passos, J. F., Lezoualc'h, F., Binda, C., Parini, A., and Mialet-Perez, J. (2018) Monoamine oxidase-A is

- a novel driver of stress-induced premature senescence through inhibition of parkin-mediated mitophagy. *Aging Cell* **17**, e12811
177. Yu, C. H., Davidson, S., Harapas, C. R., Hilton, J. B., Mlodzianoski, M. J., Laohamonthonkul, P., Louis, C., Low, R. R. J., Moecking, J., De Nardo, D., Balka, K. R., Calleja, D. J., Moghaddas, F., Ni, E., McLean, C. A., Samson, A. L., Tyebji, S., Tonkin, C. J., Bye, C. R., Turner, B. J., Pepin, G., Gantier, M. P., Rogers, K. L., McArthur, K., Crouch, P. J., and Masters, S. L. (2020) TDP-43 Triggers Mitochondrial DNA Release via mPTP to Activate cGAS/STING in ALS. *Cell* **183**, 636-649 e618
 178. Chung, K. W., Dhillon, P., Huang, S., Sheng, X., Shrestha, R., Qiu, C., Kaufman, B. A., Park, J., Pei, L., Baur, J., Palmer, M., and Susztak, K. (2019) Mitochondrial Damage and Activation of the STING Pathway Lead to Renal Inflammation and Fibrosis. *Cell Metab* **30**, 784-799 e785
 179. Huang, L. S., Hong, Z., Wu, W., Xiong, S., Zhong, M., Gao, X., Rehman, J., and Malik, A. B. (2020) mtDNA Activates cGAS Signaling and Suppresses the YAP-Mediated Endothelial Cell Proliferation Program to Promote Inflammatory Injury. *Immunity* **52**, 475-486 e475
 180. Takahashi, A., Loo, T. M., Okada, R., Kamachi, F., Watanabe, Y., Wakita, M., Watanabe, S., Kawamoto, S., Miyata, K., Barber, G. N., Ohtani, N., and Hara, E. (2018) Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun* **9**, 1249
 181. 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
 182. 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
 183. Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., and Hwang, E. S. (2006) Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187-195
 184. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., and Narita, M. (2014) Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev* **28**, 99-114
 185. Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J., and Jin, S. (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8204-8209
 186. Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A. K., Jin, S., Lowe, S., and Levine, A. J. (2007) The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell

- and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* **67**, 3043-3053
187. Budanov, A. V., and Karin, M. (2008) p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* **134**, 451-460
 188. Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P. R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K. M. (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**, 121-134
 189. Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., Nannmark, U., Samara, C., Pinton, P., Vicencio, J. M., Carnuccio, R., Moll, U. M., Madeo, F., Paterlini-Brechot, P., Rizzuto, R., Szabadkai, G., Pierron, G., Blomgren, K., Tavernarakis, N., Codogno, P., Cecconi, F., and Kroemer, G. (2008) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* **10**, 676-687
 190. Narita, M., Young, A. R., Arakawa, S., Samarajiwa, S. A., Nakashima, T., Yoshida, S., Hong, S., Berry, L. S., Reichelt, S., Ferreira, M., Tavare, S., Inoki, K., Shimizu, S., and Narita, M. (2011) Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science* **332**, 966-970
 191. 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
 192. 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 Biol* **6**, 2853-2868
 193. Lujambio, A., Akkari, L., Simon, J., Grace, D., Tschaharganeh, D. F., Bolden, J. E., Zhao, Z., Thapar, V., Joyce, J. A., Krizhanovskiy, V., and Lowe, S. W. (2013) Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell* **153**, 449-460
 194. Acosta, J. C., O'Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., Takatsu, Y., Melamed, J., d'Adda di Fagagna, F., Bernard, D., Hernando, E., and Gil, J. (2008) Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**, 1006-1018
 195. Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., 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
 196. Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K., and Campisi, J. (2009) Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17031-17036

197. Leon, K. E., Buj, R., Lesko, E., Dahl, E. S., Chen, C. W., Tangudu, N. K., Imamura-Kawasawa, Y., Kossenkov, A. V., Hobbs, R. P., and Aird, K. M. (2021) DOT1L modulates the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic regulation of IL1A. *J Cell Biol* **220**
198. Freitas-Rodriguez, S., Folgueras, A. R., and Lopez-Otin, C. (2017) The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1864**, 2015-2025
199. Kortlever, R. M., Higgins, P. J., and Bernards, R. (2006) Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* **8**, 877-884
200. Hsieh, H. H., Chen, Y. C., Jhan, J. R., and Lin, J. J. (2017) The serine protease inhibitor serpinB2 binds and stabilizes p21 in senescent cells. *J Cell Sci* **130**, 3272-3281
201. Yuan, L., Zhai, L., Qian, L., Huang, D., Ding, Y., Xiang, H., Liu, X., Thompson, J. W., Liu, J., He, Y. H., Chen, X. Q., Hu, J., Kong, Q. P., Tan, M., and Wang, X. F. (2018) Switching off IMMP2L signaling drives senescence via simultaneous metabolic alteration and blockage of cell death. *Cell Res* **28**, 625-643
202. Hamsanathan, S., and Gurkar, A. U. (2022) Lipids as Regulators of Cellular Senescence. *Front Physiol* **13**, 796850
203. Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M., and Green, M. R. (2008) Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* **132**, 363-374
204. Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S. W. (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656-660
205. 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 Dev* **31**, 172-183
206. 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
207. Takahashi, A., Okada, R., Nagao, K., Kawamata, Y., Hanyu, A., Yoshimoto, S., Takasugi, M., Watanabe, S., Kanemaki, M. T., Obuse, C., and Hara, E. (2017) Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun* **8**, 15287
208. Borghesan, M., Fafian-Labora, J., Eleftheriadou, O., Carpintero-Fernandez, P., Paez-Ribes, M., Vizcay-Barrena, G., Swisa, A., Kolodkin-Gal, D., Ximenez-Embun, P., Lowe, R., Martin-Martin, B., Peinado, H., Munoz, J., Fleck, R. A., Dor, Y., Ben-Porath, I., Vossenkamper, A., Munoz-Espin, D., and O'Loghlen, A. (2019) Small Extracellular

- Vesicles Are Key Regulators of Non-cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3. *Cell Rep* **27**, 3956-3971 e3956
209. Tkach, M., and They, C. (2016) Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **164**, 1226-1232
 210. 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
 211. 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
 212. Srikantan, S., Marasa, B. S., Becker, K. G., Gorospe, M., and Abdelmohsen, K. (2011) Paradoxical microRNAs: individual gene repressors, global translation enhancers. *Cell Cycle* **10**, 751-759
 213. 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
 214. 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
 215. Cockman, E., Anderson, P., and Ivanov, P. (2020) TOP mRNPs: Molecular Mechanisms and Principles of Regulation. *Biomolecules* **10**
 216. Payea, M. J., Anerillas, C., Tharakan, R., and Gorospe, M. (2021) Translational Control during Cellular Senescence. *Mol Cell Biol* **41**
 217. 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**
 218. 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
 219. 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

220. Moss, T., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., and Stefanovsky, V. (2007) A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* **64**, 29-49
221. Bohnsack, K. E., and Bohnsack, M. T. (2019) Uncovering the assembly pathway of human ribosomes and its emerging links to disease. *EMBO J* **38**, e100278
222. Klein, D. J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2004) The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* **340**, 141-177
223. Ferreira-Cerca, S., Poll, G., Gleizes, P. E., Tschochner, H., and Milkereit, P. (2005) Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell* **20**, 263-275
224. Parks, M. M., Kurylo, C. M., Dass, R. A., Bojmar, L., Lyden, D., Vincent, C. T., and Blanchard, S. C. (2018) Variant ribosomal RNA alleles are conserved and exhibit tissue-specific expression. *Sci Adv* **4**, eaao0665
225. Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2008) Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* **129**, 13-31
226. 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
227. 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
228. Correll, C. C., Bartek, J., and Dunder, M. (2019) The Nucleolus: A Multiphase Condensate Balancing Ribosome Synthesis and Translational Capacity in Health, Aging and Ribosomopathies. *Cells* **8**
229. 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
230. Caragine, C. M., Haley, S. C., and Zidovska, A. (2019) Nucleolar dynamics and interactions with nucleoplasm in living cells. *Elife* **8**
231. Politz, J. C., Scalzo, D., and Groudine, M. (2013) Something silent this way forms: the functional organization of the repressive nuclear compartment. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**, 241-270
232. Korgaonkar, C., Hagen, J., Tompkins, V., Frazier, A. A., Allamargot, C., Quelle, F. W., and Quelle, D. E. (2005) Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol* **25**, 1258-1271

233. 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
234. 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
235. Lessard, F., Morin, F., Ivanchuk, S., Langlois, F., Stefanovsky, V., Rutka, J., and Moss, T. (2010) The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I. *Mol Cell* **38**, 539-550
236. Marechal, V., Elenbaas, B., Piette, J., Nicolas, J. C., and Levine, A. J. (1994) The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol* **14**, 7414-7420
237. Lohrum, M. A., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H., Hanlon, M., and Vousden, K. H. (2003) Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* **3**, 577-587
238. Zhang, Y., Wolf, G. W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W. A., and Xiong, Y. (2003) Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* **23**, 8902-8912
239. Dai, M. S., and Lu, H. (2004) Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* **279**, 44475-44482
240. Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K., and Zhang, Y. (2004) Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol* **24**, 7669-7680
241. Hilton, J., Gelmon, K., Bedard, P. L., Tu, D., Xu, H., Tinker, A. V., Goodwin, R., Laurie, S. A., Jonker, D., Hansen, A. R., Veitch, Z. W., Renouf, D. J., Hagerman, L., Lui, H., Chen, B., Kellar, D., Li, I., Lee, S. E., Kono, T., Cheng, B. Y. C., Yap, D., Lai, D., Beatty, S., Soong, J., Pritchard, K. I., Soria-Bretones, I., Chen, E., Feilotter, H., Rushton, M., Seymour, L., Aparicio, S., and Cescon, D. W. (2022) Results of the phase I CCTG IND.231 trial of CX-5461 in patients with advanced solid tumors enriched for DNA-repair deficiencies. *Nat Commun* **13**, 3607
242. Meng, L., Yasumoto, H., and Tsai, R. Y. (2006) Multiple controls regulate nucleostemin partitioning between nucleolus and nucleoplasm. *J Cell Sci* **119**, 5124-5136
243. Drygin, D., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C. B., O'Brien, S. E., Proffitt, C., Omori, M., Haddach, M., Schwaebe, M. K., Siddiqui-Jain, A., Streiner, N., Quin, J. E., Sanij, E., Bywater, M. J., Hannan, R. D., Ryckman, D., Anderes, K., and Rice, W. G. (2011) Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res* **71**, 1418-1430
244. Wu, H. C., Rerolle, D., Berthier, C., Hleihel, R., Sakamoto, T., Quentin, S., Benhenda, S., Morganti, C., Wu, C., Conte, L., Rimsky, S., Sebert, M., Clappier, E., Souquere, S., Gachet,

- S., Soulier, J., Durand, S., Trowbridge, J. J., Benit, P., Rustin, P., El Hajj, H., Raffoux, E., Ades, L., Itzykson, R., Dombret, H., Fenaux, P., Espeli, O., Kroemer, G., Brunetti, L., Mak, T. W., Lallemand-Breitenbach, V., Bazarbachi, A., Falini, B., Ito, K., Martelli, M. P., and de The, H. (2021) Actinomycin D Targets NPM1c-Primed Mitochondria to Restore PML-Driven Senescence in AML Therapy. *Cancer Discov* **11**, 3198-3213
245. 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
246. Lessard, F., Brakier-Gingras, L., and Ferbeyre, G. (2019) Ribosomal Proteins Control Tumor Suppressor Pathways in Response to Nucleolar Stress. *Bioessays* **41**, e1800183
247. Piovesan, A., Pelleri, M. C., Antonaros, F., Strippoli, P., Caracausi, M., and Vitale, L. (2019) On the length, weight and GC content of the human genome. *BMC Res Notes* **12**, 106
248. Hewish, D. R., and Burgoyne, L. A. (1973) Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun* **52**, 504-510
249. Olins, A. L., and Olins, D. E. (1974) Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* **183**, 330-332
250. Kornberg, R. D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871
251. Van Holde, K. E., Sahasrabudde, C. G., and Shaw, B. R. (1974) A model for particulate structure in chromatin. *Nucleic Acids Res* **1**, 1579-1586
252. Fyodorov, D. V., Zhou, B. R., Skoultchi, A. I., and Bai, Y. (2018) Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 192-206
253. Zorn, C., Cremer, C., Cremer, T., and Zimmer, J. (1979) Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. *Exp Cell Res* **124**, 111-119
254. Zink, D., Cremer, T., Saffrich, R., Fischer, R., Trendelenburg, M. F., Ansorge, W., and Stelzer, E. H. (1998) Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum Genet* **102**, 241-251
255. Meaburn, K. J., and Misteli, T. (2007) Cell biology: chromosome territories. *Nature* **445**, 379-781
256. Rocha, P. P., Raviram, R., Bonneau, R., and Skok, J. A. (2015) Breaking TADs: insights into hierarchical genome organization. *Epigenomics* **7**, 523-526

257. Ji, X., Dadon, D. B., Powell, B. E., Fan, Z. P., Borges-Rivera, D., Shachar, S., Weintraub, A. S., Hnisz, D., Pegoraro, G., Lee, T. I., Misteli, T., Jaenisch, R., and Young, R. A. (2016) 3D Chromosome Regulatory Landscape of Human Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* **18**, 262-275
258. Lupianez, D. G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J. M., Laxova, R., Santos-Simarro, F., Gilbert-Dussardier, B., Wittler, L., Borschiwer, M., Haas, S. A., Osterwalder, M., Franke, M., Timmermann, B., Hecht, J., Spielmann, M., Visel, A., and Mundlos, S. (2015) Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* **161**, 1012-1025
259. Narendra, V., Rocha, P. P., An, D., Raviram, R., Skok, J. A., Mazzoni, E. O., and Reinberg, D. (2015) CTCF establishes discrete functional chromatin domains at the Hox clusters during differentiation. *Science* **347**, 1017-1021
260. Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., and Mirny, L. A. (2016) Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion. *Cell Rep* **15**, 2038-2049
261. Pugacheva, E. M., Kubo, N., Loukinov, D., Tajmul, M., Kang, S., Kovalchuk, A. L., Strunnikov, A. V., Zentner, G. E., Ren, B., and Lobanenko, V. V. (2020) CTCF mediates chromatin looping via N-terminal domain-dependent cohesin retention. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 2020-2031
262. Lee, R., Kang, M. K., Kim, Y. J., Yang, B., Shim, H., Kim, S., Kim, K., Yang, C. M., Min, B. G., Jung, W. J., Lee, E. C., Joo, J. S., Park, G., Cho, W. K., and Kim, H. P. (2022) CTCF-mediated chromatin looping provides a topological framework for the formation of phase-separated transcriptional condensates. *Nucleic Acids Res* **50**, 207-226
263. Chung, J. H., Whiteley, M., and Felsenfeld, G. (1993) A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* **74**, 505-514
264. Splinter, E., Heath, H., Kooren, J., Palstra, R. J., Klous, P., Grosveld, F., Galjart, N., and de Laat, W. (2006) CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes Dev* **20**, 2349-2354
265. Whyte, W. A., Orlando, D. A., Hnisz, D., Abraham, B. J., Lin, C. Y., Kagey, M. H., Rahl, P. B., Lee, T. I., and Young, R. A. (2013) Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* **153**, 307-319
266. Hnisz, D., Abraham, B. J., Lee, T. I., Lau, A., Saint-Andre, V., Sigova, A. A., Hoke, H. A., and Young, R. A. (2013) Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* **155**, 934-947
267. Chapuy, B., McKeown, M. R., Lin, C. Y., Monti, S., Roemer, M. G., Qi, J., Rahl, P. B., Sun, H. H., Yeda, K. T., Doench, J. G., Reichert, E., Kung, A. L., Rodig, S. J., Young, R. A., Shipp, M. A., and Bradner, J. E. (2013) Discovery and characterization of super-

- enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* **24**, 777-790
268. Tasdemir, N., Banito, A., Roe, J. S., Alonso-Curbelo, D., Camiolo, M., Tschaharganeh, D. F., Huang, C. H., Aksoy, O., Bolden, J. E., Chen, C. C., Fennell, M., Thapar, V., Chicas, A., Vakoc, C. R., and Lowe, S. W. (2016) BRD4 Connects Enhancer Remodeling to Senescence Immune Surveillance. *Cancer Discov* **6**, 612-629
269. Sen, P., Lan, Y., Li, C. Y., Sidoli, S., Donahue, G., Dou, Z., Frederick, B., Chen, Q., Luense, L. J., Garcia, B. A., Dang, W., Johnson, F. B., Adams, P. D., Schultz, D. C., and Berger, S. L. (2019) Histone Acetyltransferase p300 Induces De Novo Super-Enhancers to Drive Cellular Senescence. *Mol Cell* **73**, 684-698 e688
270. Nikolov, D. B., and Burley, S. K. (1997) RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 15-22
271. Green, M. R. (2000) TBP-associated factors (TAFIIIs): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends Biochem Sci* **25**, 59-63
272. Lundin, M., Nehlin, J. O., and Ronne, H. (1994) Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol Cell Biol* **14**, 1979-1985
273. Mantovani, R. (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239**, 15-27
274. Allen, B. L., and Taatjes, D. J. (2015) The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 155-166
275. Weintraub, A. S., Li, C. H., Zamudio, A. V., Sigova, A. A., Hannett, N. M., Day, D. S., Abraham, B. J., Cohen, M. A., Nabet, B., Buckley, D. L., Guo, Y. E., Hnisz, D., Jaenisch, R., Bradner, J. E., Gray, N. S., and Young, R. A. (2017) YY1 Is a Structural Regulator of Enhancer-Promoter Loops. *Cell* **171**, 1573-1588 e1528
276. Kubo, N., Ishii, H., Xiong, X., Bianco, S., Meitinger, F., Hu, R., Hocker, J. D., Conte, M., Gorkin, D., Yu, M., Li, B., Dixon, J. R., Hu, M., Nicodemi, M., Zhao, H., and Ren, B. (2021) Promoter-proximal CTCF binding promotes distal enhancer-dependent gene activation. *Nat Struct Mol Biol* **28**, 152-161
277. Kim, T. K., Hemberg, M., Gray, J. M., Costa, A. M., Bear, D. M., Wu, J., Harmin, D. A., Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., Markenscoff-Papadimitriou, E., Kuhl, D., Bito, H., Worley, P. F., Kreiman, G., and Greenberg, M. E. (2010) Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**, 182-187
278. De Santa, F., Barozzi, I., Mietton, F., Ghisletti, S., Polletti, S., Tusi, B. K., Muller, H., Ragoussis, J., Wei, C. L., and Natoli, G. (2010) A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol* **8**, e1000384

279. Jin, B., and Robertson, K. D. (2013) DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol* **754**, 3-29
280. Biswas, S., and Rao, C. M. (2018) Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *Eur J Pharmacol* **837**, 8-24
281. Le, L. T., Vu, H. L., Nguyen, C. H., and Molla, A. (2013) Basal aurora kinase B activity is sufficient for histone H3 phosphorylation in prophase. *Biol Open* **2**, 379-386
282. Lowndes, N. F., and Toh, G. W. (2005) DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr Biol* **15**, R99-R102
283. Pinto, D. M., and Flaus, A. (2010) Structure and function of histone H2AX. *Subcell Biochem* **50**, 55-78
284. Mattioli, F., Vissers, J. H., van Dijk, W. J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., Martijn, J. A., and Sixma, T. K. (2012) RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell* **150**, 1182-1195
285. Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., and Zhang, Y. (2004) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873-878
286. de Napoles, M., Mermoud, J. E., Wakao, R., Tang, Y. A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T. B., Silva, J., Otte, A. P., Vidal, M., Koseki, H., and Brockdorff, N. (2004) Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* **7**, 663-676
287. Kasinath, V., Beck, C., Sauer, P., Poepsel, S., Kosmatka, J., Faini, M., Toso, D., Aebersold, R., and Nogales, E. (2021) JARID2 and AEBP2 regulate PRC2 in the presence of H2AK119ub1 and other histone modifications. *Science* **371**
288. Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R. S., and Zhang, Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039-1043
289. Bernstein, E., Duncan, E. M., Masui, O., Gil, J., Heard, E., and Allis, C. D. (2006) Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol* **26**, 2560-2569
290. Roth, S. Y., Denu, J. M., and Allis, C. D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**, 81-120
291. Cosgrove, M. S., Boeke, J. D., and Wolberger, C. (2004) Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1037-1043
292. Winston, F., and Allis, C. D. (1999) The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat Struct Biol* **6**, 601-604

293. Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B. R. (2002) Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes Dev* **16**, 2120-2134
294. Whitehouse, I., Stockdale, C., Flaus, A., Szczelkun, M. D., and Owen-Hughes, T. (2003) Evidence for DNA translocation by the ISWI chromatin-remodeling enzyme. *Mol Cell Biol* **23**, 1935-1945
295. Cirillo, L. A., Lin, F. R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M., and Zaret, K. S. (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* **9**, 279-289
296. Zaret, K. S., Caravaca, J. M., Tulin, A., and Sekiya, T. (2010) Nuclear mobility and mitotic chromosome binding: similarities between pioneer transcription factor FoxA and linker histone H1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **75**, 219-226
297. Oldfield, A. J., Yang, P., Conway, A. E., Cinghu, S., Freudenberg, J. M., Yellaboina, S., and Jothi, R. (2014) Histone-fold domain protein NF-Y promotes chromatin accessibility for cell type-specific master transcription factors. *Mol Cell* **55**, 708-722
298. Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y. C., Laslo, P., Cheng, J. X., Murre, C., Singh, H., and Glass, C. K. (2010) Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell* **38**, 576-589
299. Sekiya, T., and Zaret, K. S. (2007) Repression by Groucho/TLE/Grg proteins: genomic site recruitment generates compacted chromatin in vitro and impairs activator binding in vivo. *Mol Cell* **28**, 291-303
300. Zaret, K. S. (2008) Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet* **9**, 329-340
301. Carroll, J. S., Liu, X. S., Brodsky, A. S., Li, W., Meyer, C. A., Szary, A. J., Eeckhoute, J., Shao, W., Hestermann, E. V., Geistlinger, T. R., Fox, E. A., Silver, P. A., and Brown, M. (2005) Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* **122**, 33-43
302. Lupien, M., Eeckhoute, J., Meyer, C. A., Wang, Q., Zhang, Y., Li, W., Carroll, J. S., Liu, X. S., and Brown, M. (2008) FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription. *Cell* **132**, 958-970
303. Sahu, B., Laakso, M., Ovaska, K., Mirtti, T., Lundin, J., Rannikko, A., Sankila, A., Turunen, J. P., Lundin, M., Konsti, J., Vesterinen, T., Nordling, S., Kallioniemi, O., Hautaniemi, S., and Janne, O. A. (2011) Dual role of FoxA1 in androgen receptor binding to chromatin, androgen signalling and prostate cancer. *EMBO J* **30**, 3962-3976
304. Tewari, A. K., Yardimci, G. G., Shibata, Y., Sheffield, N. C., Song, L., Taylor, B. S., Georgiev, S. G., Coetzee, G. A., Ohler, U., Furey, T. S., Crawford, G. E., and Febbo, P. G.

- (2012) Chromatin accessibility reveals insights into androgen receptor activation and transcriptional specificity. *Genome Biol* **13**, R88
305. 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
306. Swanson, E. C., Manning, B., Zhang, H., and Lawrence, J. B. (2013) Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. *J Cell Biol* **203**, 929-942
307. 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
308. Chan, M., Yuan, H., Soifer, I., Maile, T. M., Wang, R. Y., Ireland, A., O'Brien, J. J., Goudeau, J., Chan, L. J. G., Vijay, T., Freund, A., Kenyon, C., Bennett, B. D., McAllister, F. E., Kelley, D. R., Roy, M., Cohen, R. L., Levinson, A. D., Botstein, D., and Hendrickson, D. G. (2022) Novel insights from a multiomics dissection of the Hayflick limit. *Elife* **11**
309. De Cecco, M., Ito, T., Petrashen, A. P., Elias, A. E., Skvir, N. J., Criscione, S. W., Caligiana, A., Broccoli, G., Adney, E. M., Boeke, J. D., Le, O., Beausejour, C., Ambati, J., Ambati, K., Simon, M., Seluanov, A., Gorbunova, V., Slagboom, P. E., Helfand, S. L., Neretti, N., and Sedivy, J. M. (2019) L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* **566**, 73-78
310. Miyata, K., Imai, Y., Hori, S., Nishio, M., Loo, T. M., Okada, R., Yang, L., Nakadai, T., Maruyama, R., Fujii, R., Ueda, K., Jiang, L., Zheng, H., Toyokuni, S., Sakata, T., Shirahige, K., Kojima, R., Nakayama, M., Oshima, M., Nagayama, S., Seimiya, H., Hirota, T., Saya, H., Hara, E., and Takahashi, A. (2021) Pericentromeric noncoding RNA changes DNA binding of CTCF and inflammatory gene expression in senescence and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**
311. Hou, Y., Song, Q., Gao, S., Zhang, X., Wang, Y., Liu, J., Fu, J., Cao, M., and Wang, P. (2021) CTCF Mediates Replicative Senescence Through POLD1. *Front Cell Dev Biol* **9**, 618586
312. Lehman, B. J., Lopez-Diaz, F. J., Santisakultarm, T. P., Fang, L., Shokhirev, M. N., Diffenderfer, K. E., Manor, U., and Emerson, B. M. (2021) Dynamic regulation of CTCF stability and sub-nuclear localization in response to stress. *PLoS Genet* **17**, e1009277
313. Zirkel, A., Nikolic, M., Sofiadis, K., Mallm, J. P., Brackley, C. A., Gothe, H., Drechsel, O., Becker, C., Altmüller, J., Josipovic, N., Georgomanolis, T., Brant, L., Franzen, J., Koker, M., Gusmao, E. G., Costa, I. G., Ullrich, R. T., Wagner, W., Roukos, V., Nurnberg, P., Marenduzzo, D., Rippe, K., and Papantonis, A. (2018) HMGB2 Loss upon Senescence Entry Disrupts Genomic Organization and Induces CTCF Clustering across Cell Types. *Mol Cell* **70**, 730-744 e736

314. Sidler, C., Woycicki, R., Li, D., Wang, B., Kovalchuk, I., and Kovalchuk, O. (2014) A role for SUV39H1-mediated H3K9 trimethylation in the control of genome stability and senescence in WI38 human diploid lung fibroblasts. *Aging (Albany NY)* **6**, 545-563
315. Sidler, C., Li, D., Wang, B., Kovalchuk, I., and Kovalchuk, O. (2014) SUV39H1 downregulation induces deheterochromatinization of satellite regions and senescence after exposure to ionizing radiation. *Front Genet* **5**, 411
316. Djeghloul, D., Kuranda, K., Kuzniak, I., Barbieri, D., Naguibneva, I., Choisy, C., Bories, J. C., Dosquet, C., Pla, M., Vanneaux, V., Socie, G., Porteu, F., Garrick, D., and Goodhardt, M. (2016) Age-Associated Decrease of the Histone Methyltransferase SUV39H1 in HSC Perturbs Heterochromatin and B Lymphoid Differentiation. *Stem Cell Reports* **6**, 970-984
317. Ito, T., Teo, Y. V., Evans, S. A., Neretti, N., and Sedivy, J. M. (2018) Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage- and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Rep* **22**, 3480-3492
318. Fan, T., Jiang, S., Chung, N., Alikhan, A., Ni, C., Lee, C. C., and Hornyak, T. J. (2011) EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression. *Mol Cancer Res* **9**, 418-429
319. Zhang, B., Long, Q., Wu, S., Xu, Q., Song, S., Han, L., Qian, M., Ren, X., Liu, H., Jiang, J., Guo, J., Zhang, X., Chang, X., Fu, Q., Lam, E. W., Campisi, J., Kirkland, J. L., and Sun, Y. (2021) KDM4 Orchestrates Epigenomic Remodeling of Senescent Cells and Potentiates the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Nat Aging* **1**, 454-472
320. Chicas, A., Kapoor, A., Wang, X., Aksoy, O., Evertts, A. G., Zhang, M. Q., Garcia, B. A., Bernstein, E., and Lowe, S. W. (2012) H3K4 demethylation by Jarid1a and Jarid1b contributes to retinoblastoma-mediated gene silencing during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8971-8976
321. 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
322. 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
323. 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
324. Narita, M. (2007) Cellular senescence and chromatin organisation. *Br J Cancer* **96**, 686-691

325. 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
326. Narita, M., Narita, M., Krizhanovsky, V., Nunez, S., Chicas, A., Hearn, S. A., Myers, M. P., and Lowe, S. W. (2006) A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* **126**, 503-514
327. Zheng, H., Seit-Nebi, A., Han, X., Aslanian, A., Tat, J., Liao, R., Yates, J. R., 3rd, and Sun, P. (2013) A posttranslational modification cascade involving p38, Tip60, and PRAK mediates oncogene-induced senescence. *Mol Cell* **50**, 699-710
328. Huang, B., Zhong, D., Zhu, J., An, Y., Gao, M., Zhu, S., Dang, W., Wang, X., Yang, B., and Xie, Z. (2020) Inhibition of histone acetyltransferase GCN5 extends lifespan in both yeast and human cell lines. *Aging Cell* **19**, e13129
329. Scolnick, D. M., Chehab, N. H., Stavridi, E. S., Lien, M. C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S. L., and Halazonetis, T. D. (1997) CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* **57**, 3693-3696
330. Gu, W., and Roeder, R. G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595-606
331. Lill, N. L., Grossman, S. R., Ginsberg, D., DeCaprio, J., and Livingston, D. M. (1997) Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**, 823-827
332. Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (1999) p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **19**, 1202-1209
333. Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., and Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**, 2831-2841
334. Gu, W., Shi, X. L., and Roeder, R. G. (1997) Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**, 819-823
335. Love, I. M., Sekaric, P., Shi, D., Grossman, S. R., and Androphy, E. J. (2012) The histone acetyltransferase PCAF regulates p21 transcription through stress-induced acetylation of histone H3. *Cell Cycle* **11**, 2458-2466
336. Sheikh, B. N., Phipson, B., El-Saafin, F., Vanyai, H. K., Downer, N. L., Bird, M. J., Kueh, A. J., May, R. E., Smyth, G. K., Voss, A. K., and Thomas, T. (2015) MOZ (MYST3, KAT6A) inhibits senescence via the INK4A-ARF pathway. *Oncogene* **34**, 5807-5820

337. Baell, J. B., Leaver, D. J., Hermans, S. J., Kelly, G. L., Brennan, M. S., Downer, N. L., Nguyen, N., Wichmann, J., McRae, H. M., Yang, Y., Cleary, B., Lagiakos, H. R., Mieruszynski, S., Pacini, G., Vanyai, H. K., Bergamasco, M. I., May, R. E., Davey, B. K., Morgan, K. J., Sealey, A. J., Wang, B., Zamudio, N., Wilcox, S., Garnham, A. L., Sheikh, B. N., Aubrey, B. J., Doggett, K., Chung, M. C., de Silva, M., Bentley, J., Pilling, P., Hattarki, M., Dolezal, O., Dennis, M. L., Falk, H., Ren, B., Charman, S. A., White, K. L., Rautela, J., Newbold, A., Hawkins, E. D., Johnstone, R. W., Huntington, N. D., Peat, T. S., Heath, J. K., Strasser, A., Parker, M. W., Smyth, G. K., Street, I. P., Monahan, B. J., Voss, A. K., and Thomas, T. (2018) Inhibitors of histone acetyltransferases KAT6A/B induce senescence and arrest tumour growth. *Nature* **560**, 253-257
338. Di Giorgio, E., Paluvai, H., Dalla, E., Ranzino, L., Renzini, A., Moresi, V., Minisini, M., Picco, R., and Brancolini, C. (2021) HDAC4 degradation during senescence unleashes an epigenetic program driven by AP-1/p300 at selected enhancers and super-enhancers. *Genome Biol* **22**, 129
339. 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
340. Aird, K. M., Iwasaki, O., Kossenkov, A. V., Tanizawa, H., Fatkhutdinov, N., Bitler, B. G., Le, L., Alicea, G., Yang, T. L., Johnson, F. B., Noma, K. I., and Zhang, R. (2016) HMGB2 orchestrates the chromatin landscape of senescence-associated secretory phenotype gene loci. *J Cell Biol* **215**, 325-334
341. Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., and Baker, D. J. (2018) Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* **562**, 578-582
342. Musi, N., Valentine, J. M., Sickora, K. R., Baeuerle, E., Thompson, C. S., Shen, Q., and Orr, M. E. (2018) Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging Cell* **17**, e12840
343. Zhang, P., Kishimoto, Y., Grammatikakis, I., Gottimukkala, K., Cutler, R. G., Zhang, S., Abdelmohsen, K., Bohr, V. A., Misra Sen, J., Gorospe, M., and Mattson, M. P. (2019) Senolytic therapy alleviates Aβ-associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* **22**, 719-728
344. Kwon, O. C., Song, J. J., Yang, Y., Kim, S. H., Kim, J. Y., Seok, M. J., Hwang, I., Yu, J. W., Karmacharya, J., Maeng, H. J., Kim, J., Jho, E. H., Ko, S. Y., Son, H., Chang, M. Y., and Lee, S. H. (2021) SGK1 inhibition in glia ameliorates pathologies and symptoms in Parkinson disease animal models. *EMBO Mol Med* **13**, e13076
345. Miller, S. J., Campbell, C. E., Jimenez-Corea, H. A., Wu, G. H., and Logan, R. (2022) Neuroglial Senescence, alpha-Synucleinopathy, and the Therapeutic Potential of Senolytics in Parkinson's Disease. *Front Neurosci* **16**, 824191

346. Childs, B. G., Baker, D. J., Wijshake, T., Conover, C. A., Campisi, J., and van Deursen, J. M. (2016) Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* **354**, 472-477
347. Schafer, M. J., White, T. A., Iijima, K., Haak, A. J., Ligresti, G., Atkinson, E. J., Oberg, A. L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., Mazula, D. L., Brooks, R. W., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Pirtskhalava, T., Prakash, Y. S., Tchkonina, T., Robbins, P. D., Aubry, M. C., Passos, J. F., Kirkland, J. L., Tschumperlin, D. J., Kita, H., and LeBrasseur, N. K. (2017) Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* **8**, 14532
348. Farr, J. N., Xu, M., Weivoda, M. M., Monroe, D. G., Fraser, D. G., Onken, J. L., Negley, B. A., Sfeir, J. G., Ogrodnik, M. B., Hachfeld, C. M., LeBrasseur, N. K., Drake, M. T., Pignolo, R. J., Pirtskhalava, T., Tchkonina, T., Oursler, M. J., Kirkland, J. L., and Khosla, S. (2017) Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med* **23**, 1072-1079
349. Jeon, O. H., Kim, C., Laberge, R. M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A. P., Chung, J. W., Kim, D. H., Poon, Y., David, N., Baker, D. J., van Deursen, J. M., Campisi, J., and Elisseeff, J. H. (2017) Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med* **23**, 775-781
350. Palmer, A. K., Tchkonina, T., LeBrasseur, N. K., Chini, E. N., Xu, M., and Kirkland, J. L. (2015) Cellular Senescence in Type 2 Diabetes: A Therapeutic Opportunity. *Diabetes* **64**, 2289-2298
351. Tchkonina, T., Morbeck, D. E., Von Zglinicki, T., Van Deursen, J., Lustgarten, J., Scoble, H., Khosla, S., Jensen, M. D., and Kirkland, J. L. (2010) Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* **9**, 667-684
352. Oubaha, M., Miloudi, K., Dejda, A., Guber, V., Mawambo, G., Germain, M. A., Bourdel, G., Popovic, N., Rezende, F. A., Kaufman, R. J., Mallette, F. A., and Sapienza, P. (2016) Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological angiogenesis in retinopathy. *Sci Transl Med* **8**, 362ra144
353. Binet, F., Cagnone, G., Crespo-Garcia, S., Hata, M., Neault, M., Dejda, A., Wilson, A. M., Buscarlet, M., Mawambo, G. T., Howard, J. P., Diaz-Marin, R., Parinot, C., Guber, V., Pilon, F., Juneau, R., Laflamme, R., Sawchyn, C., Boulay, K., Leclerc, S., Abu-Thuraia, A., Cote, J. F., Andelfinger, G., Rezende, F. A., Sennlaub, F., Joyal, J. S., Mallette, F. A., and Sapienza, P. (2020) Neutrophil extracellular traps target senescent vasculature for tissue remodeling in retinopathy. *Science* **369**
354. Crespo-Garcia, S., Tsuruda, P. R., Dejda, A., Ryan, R. D., Fournier, F., Chaney, S. Y., Pilon, F., Dogan, T., Cagnone, G., Patel, P., Buscarlet, M., Dasgupta, S., Girouard, G., Rao, S. R., Wilson, A. M., O'Brien, R., Juneau, R., Guber, V., Dubrac, A., Beausejour, C., Armstrong, S., Mallette, F. A., Yohn, C. B., Joyal, J. S., Marquess, D., Beltran, P. J., and Sapienza, P. (2021) Pathological angiogenesis in retinopathy engages cellular senescence

- and is amenable to therapeutic elimination via BCL-xL inhibition. *Cell Metab* **33**, 818-832 e817
355. Ho, N. P., and Takizawa, H. (2022) Inflammation Regulates Haematopoietic Stem Cells and Their Niche. *Int J Mol Sci* **23**
356. Lepperdinger, G. (2011) Inflammation and mesenchymal stem cell aging. *Curr Opin Immunol* **23**, 518-524
357. Lei, Q., Liu, T., Gao, F., Xie, H., Sun, L., Zhao, A., Ren, W., Guo, H., Zhang, L., Wang, H., Chen, Z., Guo, A. Y., and Li, Q. (2017) Microvesicles as Potential Biomarkers for the Identification of Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells. *Theranostics* **7**, 2673-2689
358. Conley, S. M., Hickson, L. J., Kellogg, T. A., McKenzie, T., Heimbach, J. K., Taner, T., Tang, H., Jordan, K. L., Saadiq, I. M., Woollard, J. R., Isik, B., Afarideh, M., Tchkonja, T., Kirkland, J. L., and Lerman, L. O. (2020) Human Obesity Induces Dysfunction and Early Senescence in Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *Front Cell Dev Biol* **8**, 197
359. Kim, M., Kim, C., Choi, Y. S., Kim, M., Park, C., and Suh, Y. (2012) Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects. *Mech Ageing Dev* **133**, 215-225
360. Zhou, S., Greenberger, J. S., Epperly, M. W., Goff, J. P., Adler, C., Leboff, M. S., and Glowacki, J. (2008) Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell* **7**, 335-343
361. Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P. L., Hauschka, P. V., Fahey, F., and Daley, G. Q. (2009) Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460**, 259-263
362. Kennedy, D. E., and Knight, K. L. (2015) Inhibition of B Lymphopoiesis by Adipocytes and IL-1-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J Immunol* **195**, 2666-2674
363. Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H. E., Saito, Y., Waring, M. T., Dombkowski, D. M., Cheng, T., DePinho, R. A., Sharpless, N. E., and Scadden, D. T. (2006) Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* **443**, 421-426
364. Gabrilovich, D. I., and Nagaraj, S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162-174
365. Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Cingarlini, S., Dolcetti, L., Gallina, G., Zanovello, P., and Bronte, V. (2004) Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* **53**, 64-72

366. Mitchell, C. A., Verovskaya, E. V., Calero-Nieto, F. J., Olson, O. C., Swann, J. W., Wang, X., Herault, A., Dellorusso, P. V., Zhang, S. Y., Svendsen, A. F., Pietras, E. M., Bakker, S. T., Ho, T. T., Gottgens, B., and Passegue, E. (2023) Stromal niche inflammation mediated by IL-1 signalling is a targetable driver of haematopoietic ageing. *Nat Cell Biol* **25**, 30-41
367. Yun, J., Hansen, S., Morris, O., Madden, D. T., Libeu, C. P., Kumar, A. J., Wehrfritz, C., Nile, A. H., Zhang, Y., Zhou, L., Liang, Y., Modrusan, Z., Chen, M. B., Overall, C. C., Garfield, D., Campisi, J., Schilling, B., Hannoush, R. N., and Jasper, H. (2023) Senescent cells perturb intestinal stem cell differentiation through Ptk7 induced noncanonical Wnt and YAP signaling. *Nat Commun* **14**, 156
368. Bernet, J. D., Doles, J. D., Hall, J. K., Kelly Tanaka, K., Carter, T. A., and Olwin, B. B. (2014) p38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice. *Nat Med* **20**, 265-271
369. Cosgrove, B. D., Gilbert, P. M., Porpiglia, E., Mourkioti, F., Lee, S. P., Corbel, S. Y., Llewellyn, M. E., Delp, S. L., and Blau, H. M. (2014) Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nat Med* **20**, 255-264
370. Schultz, M. B., and Sinclair, D. A. (2016) When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development* **143**, 3-14
371. Shi, C., Wang, L., and Sen, P. (2020) The eroding chromatin landscape of aging stem cells. *Transl Med Aging* **4**, 121-131
372. Rossi, D. J., Bryder, D., Zahn, J. M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A. J., and Weissman, I. L. (2005) Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9194-9199
373. Palmer, A. K., Xu, M., Zhu, Y., Pirtskhalava, T., Weivoda, M. M., Hachfeld, C. M., Prata, L. G., van Dijk, T. H., Verkade, E., Casaclang-Verzosa, G., Johnson, K. O., Cubro, H., Doornebal, E. J., Ogrodnik, M., Jurk, D., Jensen, M. D., Chini, E. N., Miller, J. D., Matveyenko, A., Stout, M. B., Schafer, M. J., White, T. A., Hickson, L. J., Demaria, M., Garovic, V., Grande, J., Arriaga, E. A., Kuipers, F., von Zglinicki, T., LeBrasseur, N. K., Campisi, J., Tchkonja, T., and Kirkland, J. L. (2019) Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell* **18**, e12950
374. Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., Inman, C. L., Ogrodnik, M. B., Hachfeld, C. M., Fraser, D. G., Onken, J. L., Johnson, K. O., Verzosa, G. C., Langhi, L. G. P., Weigl, M., Giorgadze, N., LeBrasseur, N. K., Miller, J. D., Jurk, D., Singh, R. J., Allison, D. B., Ejima, K., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Cubro, H., Garovic, V. D., Hou, X., Weroha, S. J., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J., Khosla, S., Tchkonja, T., and Kirkland, J. L. (2018) Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* **24**, 1246-1256
375. Yousefzadeh, M. J., Zhu, Y., McGowan, S. J., Angelini, L., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Xu, M., Ling, Y. Y., Melos, K. I., Pirtskhalava, T., Inman, C. L., McGuckian, C., Wade, E. A., Kato, J. I., Grassi, D., Wentworth, M., Burd, C. E., Arriaga, E. A., Ladiges, W. L.,

- Tchkonia, T., Kirkland, J. L., Robbins, P. D., and Niedernhofer, L. J. (2018) Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine* **36**, 18-28
376. Xu, Q., Fu, Q., Li, Z., Liu, H., Wang, Y., Lin, X., He, R., Zhang, X., Ju, Z., Campisi, J., Kirkland, J. L., and Sun, Y. (2021) The flavonoid procyanidin C1 has senotherapeutic activity and increases lifespan in mice. *Nat Metab* **3**, 1706-1726
377. Rudin, C. M., Hann, C. L., Garon, E. B., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P. D., Camidge, D. R., Chu, Q., Giaccone, G., Khaira, D., Ramalingam, S. S., Ranson, M. R., Dive, C., McKeegan, E. M., Chyla, B. J., Dowell, B. L., Chakravarty, A., Nolan, C. E., Rudersdorf, N., Busman, T. A., Mabry, M. H., Krivoschik, A. P., Humerickhouse, R. A., Shapiro, G. I., and Gandhi, L. (2012) Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **18**, 3163-3169
378. Kaefer, A., Yang, J., Noertersheuser, P., Mensing, S., Humerickhouse, R., Awni, W., and Xiong, H. (2014) Mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis of navitoclax (ABT-263) induced thrombocytopenia. *Cancer Chemother Pharmacol* **74**, 593-602
379. Hickson, L. J., Langhi Prata, L. G. P., Bobart, S. A., Evans, T. K., Giorgadze, N., Hashmi, S. K., Herrmann, S. M., Jensen, M. D., Jia, Q., Jordan, K. L., Kellogg, T. A., Khosla, S., Koerber, D. M., Lagnado, A. B., Lawson, D. K., LeBrasseur, N. K., Lerman, L. O., McDonald, K. M., McKenzie, T. J., Passos, J. F., Pignolo, R. J., Pirtskhalava, T., Saadiq, I. M., Schaefer, K. K., Textor, S. C., Victorelli, S. G., Volkman, T. L., Xue, A., Wentworth, M. A., Wissler Gerdes, E. O., Zhu, Y., Tchkonia, T., and Kirkland, J. L. (2019) Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine* **47**, 446-456
380. Chaib, S., Tchkonia, T., and Kirkland, J. L. (2022) Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nat Med* **28**, 1556-1568
381. Zhu, Y., Tchkonia, 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., Dorronsoro, 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
382. Zhu, Y., Tchkonia, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H. M., Ling, Y. Y., Stout, M. B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K. O., Giles, C. B., Wren, J. D., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., and Kirkland, J. L. (2016) Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* **15**, 428-435
383. Fuhrmann-Stroissnigg, H., Ling, Y. Y., Zhao, J., McGowan, S. J., Zhu, Y., Brooks, R. W., Grassi, D., Gregg, S. Q., Stripay, J. L., Dorronsoro, A., Corbo, L., Tang, P., Bukata, C., Ring, N., Giacca, M., Li, X., Tchkonia, T., Kirkland, J. L., Niedernhofer, L. J., and Robbins,

- P. D. (2017) Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun* **8**, 422
384. Troiani, M., Colucci, M., D'Ambrosio, M., Guccini, I., Pasquini, E., Varesi, A., Valdata, A., Mosole, S., Revandkar, A., Attanasio, G., Rinaldi, A., Rinaldi, A., Bolis, M., Cippa, P., and Alimonti, A. (2022) Single-cell transcriptomics identifies Mcl-1 as a target for senolytic therapy in cancer. *Nat Commun* **13**, 2177
385. Zhu, Y., Doornebal, E. J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., Tchkonja, T., and Kirkland, J. L. (2017) New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-X(L) inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)* **9**, 955-963
386. Guo, J., Liu, J., and Wei, W. (2019) Degrading proteins in animals: "PROTAC"tion goes in vivo. *Cell Res* **29**, 179-180
387. Fischer, E. S., Bohm, K., Lydeard, J. R., Yang, H., Stadler, M. B., Cavadini, S., Nagel, J., Serluca, F., Acker, V., Lingaraju, G. M., Tichkule, R. B., Schebesta, M., Forrester, W. C., Schirle, M., Hassiepen, U., Ottl, J., Hild, M., Beckwith, R. E., Harper, J. W., Jenkins, J. L., and Thoma, N. H. (2014) Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. *Nature* **512**, 49-53
388. Cecchini, C., Pannilunghi, S., Tardy, S., and Scapozza, L. (2021) From Conception to Development: Investigating PROTACs Features for Improved Cell Permeability and Successful Protein Degradation. *Front Chem* **9**, 672267
389. Sun, X., Wang, J., Yao, X., Zheng, W., Mao, Y., Lan, T., Wang, L., Sun, Y., Zhang, X., Zhao, Q., Zhao, J., Xiao, R. P., Zhang, X., Ji, G., and Rao, Y. (2019) A chemical approach for global protein knockdown from mice to non-human primates. *Cell Discov* **5**, 10
390. 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., Elisseff, 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
391. Amor, C., Feucht, J., Leibold, J., Ho, Y. J., Zhu, C., Alonso-Curbelo, D., Mansilla-Soto, J., Boyer, J. A., Li, X., Giavridis, T., Kulick, A., Houlihan, S., Peerschke, E., Friedman, S. L., Ponomarev, V., Piersigilli, A., Sadelain, M., and Lowe, S. W. (2020) Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies. *Nature* **583**, 127-132
392. Wang, T. W., Johmura, Y., Suzuki, N., Omori, S., Migita, T., Yamaguchi, K., Hatakeyama, S., Yamazaki, S., Shimizu, E., Imoto, S., Furukawa, Y., Yoshimura, A., and Nakanishi, M. (2022) Blocking PD-L1-PD-1 improves senescence surveillance and ageing phenotypes. *Nature* **611**, 358-364
393. Laberge, R. M., Zhou, L., Sarantos, M. R., Rodier, F., Freund, A., de Keizer, P. L., Liu, S., Demaria, M., Cong, Y. S., Kapahi, P., Desprez, P. Y., Hughes, R. E., and Campisi, J. (2012)

- Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell* **11**, 569-578
394. Moiseeva, O., Deschenes-Simard, X., St-Germain, E., Igelmann, S., Huot, G., Cadar, A. E., Bourdeau, V., Pollak, M. N., and Ferbeyre, G. (2013) Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappaB activation. *Aging Cell* **12**, 489-498
395. Freund, A., Patil, C. K., and Campisi, J. (2011) p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* **30**, 1536-1548
396. Loo, T. M., Miyata, K., Tanaka, Y., and Takahashi, A. (2020) Cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype via the cGAS-STING signaling pathway in cancer. *Cancer Sci* **111**, 304-311
397. Decout, A., Katz, J. D., Venkatraman, S., and Ablasser, A. (2021) The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* **21**, 548-569
398. Nacarelli, T., Lau, L., Fukumoto, T., Zundell, J., Fatkhutdinov, N., Wu, S., Aird, K. M., Iwasaki, O., Kossenkov, A. V., Schultz, D., Noma, K. I., Baur, J. A., Schug, Z., Tang, H. Y., Speicher, D. W., David, G., and Zhang, R. (2019) NAD(+) metabolism governs the proinflammatory senescence-associated secretome. *Nat Cell Biol* **21**, 397-407
399. Victorelli, S., Lagnado, A., Halim, J., Moore, W., Talbot, D., Barrett, K., Chapman, J., Birch, J., Ogrodnik, M., Meves, A., Pawlikowski, J. S., Jurk, D., Adams, P. D., van Heemst, D., Beekman, M., Slagboom, P. E., Gunn, D. A., and Passos, J. F. (2019) Senescent human melanocytes drive skin ageing via paracrine telomere dysfunction. *EMBO J* **38**, e101982
400. Vizioli, M. G., Liu, T., Miller, K. N., Robertson, N. A., Gilroy, K., Lagnado, A. B., Perez-Garcia, A., Kiourtis, C., Dasgupta, N., Lei, X., Kruger, P. J., Nixon, C., Clark, W., Jurk, D., Bird, T. G., Passos, J. F., Berger, S. L., Dou, Z., and Adams, P. D. (2020) Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence. *Genes Dev* **34**, 428-445
401. Gu, J., Wang, J., Liu, X., Sai, K., Mai, J., Xing, F., Chen, Z., Yang, X., Lu, W., Guo, C., Liu, W., Xu, Y., Xie, S., Hu, C., Yan, G., and Zhu, W. (2021) IL-6 derived from therapy-induced senescence facilitates the glycolytic phenotype in glioblastoma cells. *Am J Cancer Res* **11**, 458-478
402. Lau, L., Porciuncula, A., Yu, A., Iwakura, Y., and David, G. (2019) Uncoupling the Senescence-Associated Secretory Phenotype from Cell Cycle Exit via Interleukin-1 Inactivation Unveils Its Protumorigenic Role. *Mol Cell Biol* **39**
403. 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

404. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444
405. Waaijer, M. E., Parish, W. E., Strongitharm, B. H., van Heemst, D., Slagboom, P. E., de Craen, A. J., Sedivy, J. M., Westendorp, R. G., Gunn, D. A., and Maier, A. B. (2012) The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age. *Aging Cell* **11**, 722-725
406. Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D., and Sedivy, J. M. (2006) Cellular senescence in aging primates. *Science* **311**, 1257
407. Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonina, T., Tiniakos, D., Wilson, C. L., Lahat, A., Day, C. P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q. M., Grellescheid, S. N., Hoeijmakers, J. H. J., Barnhoorn, S., Mann, D. A., Bird, T. G., Vermeij, W. P., Kirkland, J. L., Passos, J. F., von Zglinicki, T., and Jurk, D. (2017) Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun* **8**, 15691
408. Xu, M., Palmer, A. K., Ding, H., Weivoda, M. M., Pirtskhalava, T., White, T. A., Sepe, A., Johnson, K. O., Stout, M. B., Giorgadze, N., Jensen, M. D., LeBrasseur, N. K., Tchkonina, T., and Kirkland, J. L. (2015) Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *eLife* **4**, e12997
409. Surks, M. I., and DeFesi, C. R. (1977) Determination of the cell number of each cell type in the anterior pituitary of euthyroid and hypothyroid rats. *Endocrinology* **101**, 946-958
410. Rodier, F., and Campisi, J. (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **192**, 547-556
411. Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., Ishikawa, F., and Komuro, I. (2009) A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* **15**, 1082-1087
412. Jun, J. I., and Lau, L. F. (2010) The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol* **12**, 676-685
413. Yun, M. H., Davaapil, H., and Brockes, J. P. (2015) Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *eLife* **4**
414. Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., Premssirut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C. S., Kogan, S. C., and Lowe, S. W. (2011) Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* **25**, 2125-2136
415. Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., Saltness, R. A., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D., and van Deursen, J. M. (2016) Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184-189

416. Campisi, J. (2013) Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* **75**, 685-705
417. Bavik, C., Coleman, I., Dean, J. P., Knudsen, B., Plymate, S., and Nelson, P. S. (2006) The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res* **66**, 794-802
418. Yang, G., Rosen, D. G., Zhang, Z., Bast, R. C., Jr., Mills, G. B., Colacino, J. A., Mercado-Uribe, I., and Liu, J. (2006) The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16472-16477
419. Coppe, J. P., Kauser, K., Campisi, J., and Beausejour, C. M. (2006) Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* **281**, 29568-29574
420. Rodier, F., Coppe, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Munoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., and Campisi, J. (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**, 973-979
421. Sun, Y., Campisi, J., Higano, C., Beer, T. M., Porter, P., Coleman, I., True, L., and Nelson, P. S. (2012) Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med*
422. Gilbert, L. A., and Hemann, M. T. (2010) DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell* **143**, 355-366
423. 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
424. Tsukada, J., Yoshida, Y., Kominato, Y., and Auron, P. E. (2011) The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* **54**, 6-19
425. Sebastian, T., Malik, R., Thomas, S., Sage, J., and Johnson, P. F. (2005) C/EBPbeta cooperates with RB:E2F to implement Ras(V12)-induced cellular senescence. *Embo J* **24**, 3301-3312
426. Basu, S. K., Malik, R., Huggins, C. J., Lee, S., Sebastian, T., Sakchaisri, K., Quinones, O. A., Alvord, W. G., and Johnson, P. F. (2011) 3'UTR elements inhibit Ras-induced C/EBPbeta post-translational activation and senescence in tumour cells. *EMBO J* **30**, 3714-3728

427. Huggins, C. J., Malik, R., Lee, S., Salotti, J., Thomas, S., Martin, N., Quinones, O. A., Alvord, W. G., Olanich, M. E., Keller, J. R., and Johnson, P. F. (2013) C/EBPgamma suppresses senescence and inflammatory gene expression by heterodimerizing with C/EBPbeta. *Mol Cell Biol* **33**, 3242-3258
428. Jing, H., Kase, J., Dorr, J. R., Milanovic, M., Lenze, D., Grau, M., Beuster, G., Ji, S., Reimann, M., Lenz, P., Hummel, M., Dorken, B., Lenz, G., Scheidereit, C., Schmitt, C. A., and Lee, S. (2011) Opposing roles of NF-kappaB in anti-cancer treatment outcome unveiled by cross-species investigations. *Genes Dev* **25**, 2137-2146
429. De Donatis, G. M., Le Pape, E., Pierron, A., Cheli, Y., Hofman, V., Hofman, P., Allegra, M., Zahaf, K., Bahadoran, P., Rocchi, S., Bertolotto, C., Ballotti, R., and Passeron, T. (2016) NF-kB2 induces senescence bypass in melanoma via a direct transcriptional activation of EZH2. *Oncogene* **35**, 2735-2745
430. Kang, C., Xu, Q., Martin, T. D., Li, M. Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B. A., Campisi, J., and Elledge, S. J. (2015) The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* **349**, aaa5612
431. Wang, P., Han, L., Shen, H., Wang, P., Lv, C., Zhao, G., Niu, J., Xue, L., Wang, Q. J., Tong, T., and Chen, J. (2014) Protein kinase D1 is essential for Ras-induced senescence and tumor suppression by regulating senescence-associated inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 7683-7688
432. Moiseeva, O., Deschenes-Simard, X., Pollak, M., and Ferbeyre, G. (2013) Metformin, aging and cancer. *Aging (Albany NY)* **5**, 330-331
433. Chong, M., Yin, T., Chen, R., Xiang, H., Yuan, L., Ding, Y., Pan, C. C., Tang, Z., Alexander, P. B., Li, Q. J., and Wang, X. F. (2018) CD36 initiates the secretory phenotype during the establishment of cellular senescence. *EMBO Rep* **19**
434. Capell, B. C., Drake, A. M., Zhu, J., Shah, P. P., Dou, Z., Dorsey, J., Simola, D. F., Donahue, G., Sammons, M., Rai, T. S., Natale, C., Ridky, T. W., Adams, P. D., and Berger, S. L. (2016) MLL1 is essential for the senescence-associated secretory phenotype. *Genes Dev* **30**, 321-336
435. Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q., and Chen, Z. J. (2017) cGAS is essential for cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E4612-E4620
436. Dou, Z., Ghosh, K., Vizioli, M. G., Zhu, J., Sen, P., Wangenstein, K. J., Simithy, J., Lan, Y., Lin, Y., Zhou, Z., Capell, B. C., Xu, C., Xu, M., Kieckhaefer, 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
437. Dunphy, G., Flannery, S. M., Almine, J. F., Connolly, D. J., Paulus, C., Jonsson, K. L., Jakobsen, M. R., Nevels, M. M., Bowie, A. G., and Unterholzner, L. (2018) Non-canonical

- Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-kappaB Signaling after Nuclear DNA Damage. *Mol Cell* **71**, 745-760 e745
438. Mallette, F. A., and Ferbeyre, G. (2007) The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **6**, 1831-1836
439. Martin, C., Chevrot, M., Poirier, H., Passilly-Degrace, P., Niot, I., and Besnard, P. (2011) CD36 as a lipid sensor. *Physiol Behav* **105**, 36-42
440. Zhang, Y., Zhao, L., Wu, Z., Chen, X., and Ma, T. (2017) Galantamine alleviates senescence of U87 cells induced by beta-amyloid through decreasing ROS production. *Neurosci Lett* **653**, 183-188
441. Zhang, J. J., Liu, W. Q., Peng, J. J., Ma, Q. L., Peng, J., and Luo, X. J. (2017) miR-21-5p/203a-3p promote ox-LDL-induced endothelial cell senescence through down-regulation of mitochondrial fission protein Drp1. *Mech Ageing Dev* **164**, 8-19
442. Coppe, J. P., Rodier, F., Patil, C. K., Freund, A., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2011) Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem* **286**, 36396-36403
443. Correia-Melo, C., Marques, F. D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B. M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., Rushton, M. D., Charles, M., Jurk, D., Tait, S. W., Czapiewski, R., Greaves, L., Nelson, G., Bohlooly, Y. M., Rodriguez-Cuenca, S., Vidal-Puig, A., Mann, D., Saretzki, G., Quarato, G., Green, D. R., Adams, P. D., von Zglinicki, T., Korolchuk, V. I., and Passos, J. F. (2016) Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J* **35**, 724-742
444. Pribluda, A., Elyada, E., Wiener, Z., Hamza, H., Goldstein, R. E., Biton, M., Burstain, I., Morgenstern, Y., Brachya, G., Billauer, H., Biton, S., Snir-Alkalay, I., Vucic, D., Schlereth, K., Mernberger, M., Stiewe, T., Oren, M., Alitalo, K., Pikarsky, E., and Ben-Neriah, Y. (2013) A senescence-inflammatory switch from cancer-inhibitory to cancer-promoting mechanism. *Cancer Cell* **24**, 242-256
445. Bielenberg, D. R., Hida, Y., Shimizu, A., Kaipainen, A., Kreuter, M., Kim, C. C., and Klagsbrun, M. (2004) Semaphorin 3F, a chemorepellent for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J Clin Invest* **114**, 1260-1271
446. Futamura, M., Kamino, H., Miyamoto, Y., Kitamura, N., Nakamura, Y., Ohnishi, S., Masuda, Y., and Arakawa, H. (2007) Possible role of semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression. *Cancer Res* **67**, 1451-1460
447. Wiley, C. D., Schaum, N., Alimirah, F., Lopez-Dominguez, J. A., Orjalo, A. V., Scott, G., Desprez, P. Y., Benz, C., Davalos, A. R., and Campisi, J. (2018) Small-molecule MDM2 antagonists attenuate the senescence-associated secretory phenotype. *Sci Rep* **8**, 2410

448. Calabrese, V., Mallette, F. A., Deschenes-Simard, X., Ramanathan, S., Gagnon, J., Moores, A., Ilangumaran, S., and Ferbeyre, G. (2009) SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell* **36**, 754-767
449. Kinjyo, I., Hanada, T., Inagaki-Ohara, K., Mori, H., Aki, D., Ohishi, M., Yoshida, H., Kubo, M., and Yoshimura, A. (2002) SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* **17**, 583-591
450. Saint-Germain, E., Mignacca, L., Vernier, M., Bobbala, D., Ilangumaran, S., and Ferbeyre, G. (2017) SOCS1 regulates senescence and ferroptosis by modulating the expression of p53 target genes. *Aging (Albany NY)* **9**, 2137-2162
451. Ron, D., and Habener, J. F. (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* **6**, 439-453
452. Shah, P. P., Donahue, G., Otte, G. L., Capell, B. C., Nelson, D. M., Cao, K., Aggarwala, V., Cruickshanks, H. A., Rai, T. S., McBryan, T., Gregory, B. D., Adams, P. D., and Berger, S. L. (2013) Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes Dev* **27**, 1787-1799
453. Rai, T. S., Cole, J. J., Nelson, D. M., Dikovskaya, D., Faller, W. J., Vizioli, M. G., Hewitt, R. N., Anannya, O., McBryan, T., Manoharan, I., van Tuyn, J., Morrice, N., Pchelintsev, N. A., Ivanov, A., Brock, C., Drotar, M. E., Nixon, C., Clark, W., Sansom, O. J., Anderson, K. I., King, A., Blyth, K., and Adams, P. D. (2014) HIRA orchestrates a dynamic chromatin landscape in senescence and is required for suppression of neoplasia. *Genes Dev* **28**, 2712-2725
454. Takahashi, A., Imai, Y., Yamakoshi, K., Kuninaka, S., Ohtani, N., Yoshimoto, S., Hori, S., Tachibana, M., Anderton, E., Takeuchi, T., Shinkai, Y., Peters, G., Saya, H., and Hara, E. (2012) DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C(Cdh1) in senescent cells. *Mol Cell* **45**, 123-131
455. Chen, H., Ruiz, P. D., McKimpson, W. M., Novikov, L., Kitsis, R. N., and Gamble, M. J. (2015) MacroH2A1 and ATM Play Opposing Roles in Paracrine Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Mol Cell* **59**, 719-731
456. Kim, B. J., Chan, D. W., Jung, S. Y., Chen, Y., Qin, J., and Wang, Y. (2017) The Histone Variant MacroH2A1 Is a BRCA1 Ubiquitin Ligase Substrate. *Cell reports* **19**, 1758-1766
457. Eagen, K. P. (2018) Principles of Chromosome Architecture Revealed by Hi-C. *Trends in biochemical sciences* **43**, 469-478
458. Ozcan, S., Alessio, N., Acar, M. B., Mert, E., Omerli, F., Peluso, G., and Galderisi, U. (2016) Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging (Albany NY)* **8**, 1316-1329

459. McQuibban, G. A., Gong, J. H., Wong, J. P., Wallace, J. L., Clark-Lewis, I., and Overall, C. M. (2002) Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* **100**, 1160-1167
460. Liu, D., and Hornsby, P. J. (2007) Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* **67**, 3117-3126
461. Hogquist, K. A., Nett, M. A., Unanue, E. R., and Chaplin, D. D. (1991) Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8485-8489
462. Hazuda, D. J., Strickler, J., Kueppers, F., Simon, P. L., and Young, P. R. (1990) Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease. *J Biol Chem* **265**, 6318-6322
463. Omoto, Y., Tokime, K., Yamanaka, K., Habe, K., Morioka, T., Kurokawa, I., Tsutsui, H., Yamanishi, K., Nakanishi, K., and Mizutani, H. (2006) Human mast cell chymase cleaves pro-IL-18 and generates a novel and biologically active IL-18 fragment. *J Immunol* **177**, 8315-8319
464. Huang, J., Xie, Y., Sun, X., Zeh, H. J., 3rd, Kang, R., Lotze, M. T., and Tang, D. (2015) DAMPs, ageing, and cancer: The 'DAMP Hypothesis'. *Ageing Res Rev* **24**, 3-16
465. Davalos, A. R., Kawahara, M., Malhotra, G. K., Schaum, N., Huang, J., Ved, U., Beausejour, C. M., Coppe, J. P., Rodier, F., and Campisi, J. (2013) p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J Cell Biol* **201**, 613-629
466. Pandolfi, F., Altamura, S., Frosali, S., and Conti, P. (2016) Key Role of DAMP in Inflammation, Cancer, and Tissue Repair. *Clin Ther* **38**, 1017-1028
467. Ni, C., Narzt, M. S., Nagelreiter, I. M., Zhang, C. F., Larue, L., Rossiter, H., Grillari, J., Tschachler, E., and Gruber, F. (2016) Autophagy deficient melanocytes display a senescence associated secretory phenotype that includes oxidized lipid mediators. *Int J Biochem Cell Biol* **81**, 375-382
468. Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., and Bianchi, M. E. (2003) Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* **22**, 5551-5560
469. Tang, D., Kang, R., Zeh, H. J., 3rd, and Lotze, M. T. (2011) High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 1315-1335
470. Fusco, S., Maulucci, G., and Pani, G. (2012) Sirt1: def-eating senescence? *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **11**, 4135-4146
471. Rabadi, M. M., Xavier, S., Vasko, R., Kaur, K., Goligorsky, M. S., and Ratliff, B. B. (2015) High-mobility group box 1 is a novel deacetylation target of Sirtuin1. *Kidney Int* **87**, 95-108

472. Tang, D., Kang, R., Livesey, K. M., Kroemer, G., Billiar, T. R., Van Houten, B., Zeh, H. J., 3rd, and Lotze, M. T. (2011) High-mobility group box 1 is essential for mitochondrial quality control. *Cell metabolism* **13**, 701-711
473. Polanska, E., Dobsakova, Z., Dvorackova, M., Fajkus, J., and Stros, M. (2012) HMGB1 gene knockout in mouse embryonic fibroblasts results in reduced telomerase activity and telomere dysfunction. *Chromosoma* **121**, 419-431
474. Feldman, N., Rotter-Maskowitz, A., and Okun, E. (2015) DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev* **24**, 29-39
475. Harizi, H., Corcuff, J. B., and Gualde, N. (2008) Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* **14**, 461-469
476. Catalano, A., Rodilossi, S., Caprari, P., Coppola, V., and Procopio, A. (2005) 5-Lipoxygenase regulates senescence-like growth arrest by promoting ROS-dependent p53 activation. *EMBO J* **24**, 170-179
477. Zdanov, S., Bernard, D., Debacq-Chainiaux, F., Martien, S., Gosselin, K., Vercamer, C., Chelli, F., Toussaint, O., and Abbadie, C. (2007) Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity. *Exp Cell Res* **313**, 3046-3056
478. Han, J. H., Roh, M. S., Park, C. H., Park, K. C., Cho, K. H., Kim, K. H., Eun, H. C., and Chung, J. H. (2004) Selective COX-2 inhibitor, NS-398, inhibits the replicative senescence of cultured dermal fibroblasts. *Mech Ageing Dev* **125**, 359-366
479. Kim, S. R., Park, J. H., Lee, M. E., Park, J. S., Park, S. C., and Han, J. A. (2008) Selective COX-2 inhibitors modulate cellular senescence in human dermal fibroblasts in a catalytic activity-independent manner. *Mech Ageing Dev* **129**, 706-713
480. Wu, D., Mura, C., Beharka, A. A., Han, S. N., Paulson, K. E., Hwang, D., and Meydani, S. N. (1998) Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *Am J Physiol* **275**, C661-668
481. Kim, H. J., Kim, K. W., Yu, B. P., and Chung, H. Y. (2000) The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-kappaB activation and IkappaBalpha degradation. *Free Radic Biol Med* **28**, 683-692
482. Melk, A., Schmidt, B. M., Takeuchi, O., Sawitzki, B., Rayner, D. C., and Halloran, P. F. (2004) Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* **65**, 510-520
483. Kim, J., Vaish, V., Feng, M., Field, K., Chatzistamou, I., and Shim, M. (2016) Transgenic expression of cyclooxygenase-2 (COX2) causes premature aging phenotypes in mice. *Aging (Albany NY)* **8**, 2392-2406

484. James, E. L., Lane, J. A., Michalek, R. D., Karoly, E. D., and Parkinson, E. K. (2016) Replicatively senescent human fibroblasts reveal a distinct intracellular metabolic profile with alterations in NAD⁺ and nicotinamide metabolism. *Sci Rep* **6**, 38489
485. Shelton, D. N., Chang, E., Whittier, P. S., Choi, D., and Funk, W. D. (1999) Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* **9**, 939-945
486. Yang, H. H., Kim, C., Jung, B., Kim, K. S., and Kim, J. R. (2011) Involvement of IGF binding protein 5 in prostaglandin E(2)-induced cellular senescence in human fibroblasts. *Biogerontology* **12**, 239-252
487. Martien, S., Pluquet, O., Vercamer, C., Malaquin, N., Martin, N., Gosselin, K., Pourtier, A., and Abbadie, C. (2013) Cellular senescence involves an intracrine prostaglandin E2 pathway in human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 1217-1227
488. Cormenier, J., Martin, N., Desle, J., Salazar-Cardozo, C., Pourtier, A., Abbadie, C., and Pluquet, O. (2018) The ATF6 α arm of the Unfolded Protein Response mediates replicative senescence in human fibroblasts through a COX2/prostaglandin E2 intracrine pathway. *Mech Ageing Dev* **170**, 82-91
489. Chou, J. P., Ramirez, C. M., Ryba, D. M., Koduri, M. P., and Effros, R. B. (2014) Prostaglandin E2 promotes features of replicative senescence in chronically activated human CD8⁺ T cells. *PloS one* **9**, e99432
490. Zelenay, S., van der Veen, A. G., Bottcher, J. P., Snelgrove, K. J., Rogers, N., Acton, S. E., Chakravarty, P., Girotti, M. R., Marais, R., Quezada, S. A., Sahai, E., and Reis e Sousa, C. (2015) Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell* **162**, 1257-1270
491. Loo, T. M., Kamachi, F., Watanabe, Y., Yoshimoto, S., Kanda, H., Arai, Y., Nakajima-Takagi, Y., Iwama, A., Koga, T., Sugimoto, Y., Ozawa, T., Nakamura, M., Kumagai, M., Watashi, K., Taketo, M. M., Aoki, T., Narumiya, S., Oshima, M., Arita, M., Hara, E., and Ohtani, N. (2017) Gut Microbiota Promotes Obesity-Associated Liver Cancer through PGE2-Mediated Suppression of Antitumor Immunity. *Cancer Discov* **7**, 522-538
492. Kumar, M., Seeger, W., and Voswinckel, R. (2014) Senescence-associated secretory phenotype and its possible role in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **51**, 323-333
493. Dvash, E., Har-Tal, M., Barak, S., Meir, O., and Rubinstein, M. (2015) Leukotriene C4 is the major trigger of stress-induced oxidative DNA damage. *Nat Commun* **6**, 10112
494. Wei, J., Chen, S., Guo, W., Feng, B., Yang, S., Huang, C., and Chu, J. (2018) Leukotriene D4 induces cellular senescence in osteoblasts. *International immunopharmacology* **58**, 154-159

495. Song, W., Zhang, Y., Wang, J., Ma, T., Hao, L., and Wang, K. (2018) Antagonism of cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLTR1) by montelukast suppresses cell senescence of chondrocytes. *Cytokine* **103**, 83-89
496. Yuan, L., Zhai, L., Qian, L., Huang, Ding, Y., Xiang, H., Liu, X., Thompson, J. W., Liu, J., He, Y. H., Chen, X. Q., Hu, J., Kong, Q. P., Tan, M., and Wang, X. F. (2018) Switching off IMMP2L signaling drives senescence via simultaneous metabolic alteration and blockage of cell death. *Cell Res* **28**, 625-643
497. Silverman, G. A., Whisstock, J. C., Askew, D. J., Pak, S. C., Luke, C. J., Cataltepe, S., Irving, J. A., and Bird, P. I. (2004) Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. *Cell Mol Life Sci* **61**, 301-325
498. Moiseeva, O., Lopes-Paciencia, S., Huot, G., Lessard, F., and Ferbeyre, G. (2016) Permanent farnesylation of lamin A mutants linked to progeria impairs its phosphorylation at serine 22 during interphase. *Aging (Albany NY)* **8**, 366-381
499. Cao, K., Blair, C. D., Faddah, D. A., Kieckhaefer, J. E., Olive, M., Erdos, M. R., Nabel, E. G., and Collins, F. S. (2011) Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J Clin Invest* **121**, 2833-2844
500. Varela, I., Cadinanos, J., Pendas, A. M., Gutierrez-Fernandez, A., Folgueras, A. R., Sanchez, L. M., Zhou, Z., Rodriguez, F. J., Stewart, C. L., Vega, J. A., Tryggvason, K., Freije, J. M., and Lopez-Otin, C. (2005) Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* **437**, 564-568
501. Lee, J. Y., Yu, K. R., Lee, B. C., Kang, I., Kim, J. J., Jung, E. J., Kim, H. S., Seo, Y., Choi, S. W., and Kang, K. S. (2018) GATA4-dependent regulation of the secretory phenotype via MCP-1 underlies lamin A-mediated human mesenchymal stem cell aging. *Experimental & molecular medicine* **50**, 63
502. Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marion, R. M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernandez-Marcos, P. J., Munoz-Martin, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., Gomez-Lopez, G., De Martino, A., Blasco, M. A., Abad, M., and Serrano, M. (2016) Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* **354**
503. Soria-Valles, C., Osorio, F. G., Gutierrez-Fernandez, A., De Los Angeles, A., Bueno, C., Menendez, P., Martin-Subero, J. I., Daley, G. Q., Freije, J. M., and Lopez-Otin, C. (2015) NF-kappaB activation impairs somatic cell reprogramming in ageing. *Nat Cell Biol* **17**, 1004-1013
504. Hoare, M., Ito, Y., Kang, T. W., Weekes, M. P., Matheson, N. J., Patten, D. A., Shetty, S., Parry, A. J., Menon, S., Salama, R., Antrobus, R., Tomimatsu, K., Howat, W., Lehner, P. J., Zender, L., and Narita, M. (2016) NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat Cell Biol* **18**, 979-992

505. Schwitalla, S., Fingerle, A. A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Goktuna, S. I., Ziegler, P. K., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D. J., Moreaux, G., Rupec, R. A., Gerhard, M., Schmid, R., Barker, N., Clevers, H., Lang, R., Neumann, J., Kirchner, T., Taketo, M. M., van den Brink, G. R., Sansom, O. J., Arkan, M. C., and Greten, F. R. (2013) Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* **152**, 25-38
506. 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
507. Kim, K. M., Noh, J. H., Bodogai, M., Martindale, J. L., Pandey, P. R., Yang, X., Biragyn, A., Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2018) SCAMP4 enhances the senescent cell secretome. *Genes Dev* **32**, 909-914
508. Su, Y., Wang, P., Shen, H., Sun, Z., Xu, C., Li, G., Tong, T., and Chen, J. (2018) The protein kinase D1-mediated classical protein secretory pathway regulates the Ras oncogene-induced senescence response. *J Cell Sci* **131**
509. Georgilis, A., Klotz, S., Hanley, C. J., Herranz, N., Weirich, B., Morancho, B., Leote, A. C., D'Artista, L., Gallage, S., Seehawer, M., Carroll, T., Dharmalingam, G., Wee, K. B., Mellone, M., Pombo, J., Heide, D., Guccione, E., Arribas, J., Barbosa-Morais, N. L., Heikenwalder, M., Thomas, G. J., Zender, L., and Gil, J. (2018) PTBP1-Mediated Alternative Splicing Regulates the Inflammatory Secretome and the Pro-tumorigenic Effects of Senescent Cells. *Cancer Cell* **34**, 85-102 e109
510. Xu, M., Tchkonina, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E. R., Pirtskhalava, T., White, T. A., Johnson, K. O., Stout, M. B., Mezera, V., Giorgadze, N., Jensen, M. D., LeBrasseur, N. K., and Kirkland, J. L. (2015) JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E6301-6310
511. Camorani, S., Cerchia, L., Fedele, M., Erba, E., D'Incalci, M., and Crescenzi, E. (2018) Trabectedin modulates the senescence-associated secretory phenotype and promotes cell death in senescent tumor cells by targeting NF-kappaB. *Oncotarget* **9**, 19929-19944
512. Pardee, A. B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1286-1290
513. Sherr, C. J., Beach, D., and Shapiro, G. I. (2016) Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discov* **6**, 353-367
514. Santos, S. D., Verveer, P. J., and Bastiaens, P. I. (2007) Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol* **9**, 324-330
515. Xiong, W., and Ferrell, J. E., Jr. (2003) A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell fate decision. *Nature* **426**, 460-465

516. Mojtahedi, M., Skupin, A., Zhou, J., Castano, I. G., Leong-Quong, R. Y., Chang, H., Trachana, K., Giuliani, A., and Huang, S. (2016) Cell Fate Decision as High-Dimensional Critical State Transition. *PLoS Biol* **14**, e2000640
517. Pomerening, J. R., Sontag, E. D., and Ferrell, J. E., Jr. (2003) Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2. *Nat Cell Biol* **5**, 346-351
518. Nie, Z., Hu, G., Wei, G., Cui, K., Yamane, A., Resch, W., Wang, R., Green, D. R., Tessarollo, L., Casellas, R., Zhao, K., and Levens, D. (2012) c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* **151**, 68-79
519. Esnault, C., Gualdrini, F., Horswell, S., Kelly, G., Stewart, A., East, P., Matthews, N., and Treisman, R. (2017) ERK-Induced Activation of TCF Family of SRF Cofactors Initiates a Chromatin Modification Cascade Associated with Transcription. *Mol Cell* **65**, 1081-1095 e1085
520. Ruley, H. E. (1983) Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**, 602-606
521. Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* **12**, 2424-2433
522. Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506
523. Kim, Y. C., Gerlitz, G., Furusawa, T., Catez, F., Nussenzweig, A., Oh, K. S., Kraemer, K. H., Shiloh, Y., and Bustin, M. (2009) Activation of ATM depends on chromatin interactions occurring before induction of DNA damage. *Nat Cell Biol* **11**, 92-96
524. Ji, S., Zhu, L., Gao, Y., Zhang, X., Yan, Y., Cen, J., Li, R., Zeng, R., Liao, L., Hou, C., Gao, Y., Gao, S., Wei, G., and Hui, L. (2017) Baf60b-mediated ATM-p53 activation blocks cell identity conversion by sensing chromatin opening. *Cell Res* **27**, 642-656
525. Yao, G., Lee, T. J., Mori, S., Nevins, J. R., and You, L. (2008) A bistable Rb-E2F switch underlies the restriction point. *Nat Cell Biol* **10**, 476-482
526. Qi, T., Qu, Q., Li, G., Wang, J., Zhu, H., Yang, Z., Sun, Y., Lu, Q., and Qu, J. (2020) Function and regulation of the PEA3 subfamily of ETS transcription factors in cancer. *Am J Cancer Res* **10**, 3083-3105
527. Lin, T. C. (2022) RUNX1 and cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1877**, 188715
528. Milanovic, M., Fan, D. N. Y., Belenki, D., Dabritz, J. H. M., Zhao, Z., Yu, Y., Dorr, J. R., Dimitrova, L., Lenze, D., Monteiro Barbosa, I. A., 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**, 96-100

529. Carriere, C., Gore, A. J., Norris, A. M., Gunn, J. R., Young, A. L., Longnecker, D. S., and Korc, M. (2011) Deletion of Rb accelerates pancreatic carcinogenesis by oncogenic Kras and impairs senescence in premalignant lesions. *Gastroenterology* **141**, 1091-1101
530. 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
531. Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., D'Agati, V., Orkin, S. H., and Costantini, F. (1991) Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* **349**, 257-260
532. Hoppe, P. S., Schwarzfischer, M., Loeffler, D., Kokkaliaris, K. D., Hilsenbeck, O., Moritz, N., Endele, M., Filipczyk, A., Gambardella, A., Ahmed, N., Etzrodt, M., Coutu, D. L., Rieger, M. A., Marr, C., Strasser, M. K., Schaubberger, B., Burtscher, I., Ermakova, O., Burger, A., Lickert, H., Nerlov, C., Theis, F. J., and Schroeder, T. (2016) Early myeloid lineage choice is not initiated by random PU.1 to GATA1 protein ratios. *Nature* **535**, 299-302
533. 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
534. Lowe, S. W., Cepero, E., and Evan, G. (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307-315
535. Consortium, F., Suzuki, H., Forrest, A. R., van Nimwegen, E., Daub, C. O., Balwierz, P. J., Irvine, K. M., Lassmann, T., Ravasi, T., Hasegawa, Y., de Hoon, M. J., Katayama, S., Schroder, K., Carninci, P., Tomaru, Y., Kanamori-Katayama, M., Kubosaki, A., Akalin, A., Ando, Y., Arner, E., Asada, M., Asahara, H., Bailey, T., Bajic, V. B., Bauer, D., Beckhouse, A. G., Bertin, N., Bjorkegren, J., Brombacher, F., Bulger, E., Chalk, A. M., Chiba, J., Cloonan, N., Dawe, A., Dostie, J., Engstrom, P. G., Essack, M., Faulkner, G. J., Fink, J. L., Fredman, D., Fujimori, K., Furuno, M., Gojobori, T., Gough, J., Grimmond, S. M., Gustafsson, M., Hashimoto, M., Hashimoto, T., Hatakeyama, M., Heinzl, S., Hide, W., Hofmann, O., Hornquist, M., Huminiecki, L., Ikeo, K., Imamoto, N., Inoue, S., Inoue, Y., Ishihara, R., Iwayanagi, T., Jacobsen, A., Kaur, M., Kawaji, H., Kerr, M. C., Kimura, R., Kimura, S., Kimura, Y., Kitano, H., Koga, H., Kojima, T., Kondo, S., Konno, T., Krogh, A., Kruger, A., Kumar, A., Lenhard, B., Lennartsson, A., Lindow, M., Lizio, M., Macpherson, C., Maeda, N., Maher, C. A., Maqungo, M., Mar, J., Matigian, N. A., Matsuda, H., Mattick, J. S., Meier, S., Miyamoto, S., Miyamoto-Sato, E., Nakabayashi, K., Nakachi, Y., Nakano, M., Nygaard, S., Okayama, T., Okazaki, Y., Okuda-Yabukami, H., Orlando, V., Otomo, J., Pachkov, M., Petrovsky, N., Plessy, C., Quackenbush, J., Radovanovic, A., Rehli, M., Saito, R., Sandelin, A., Schmeier, S., Schonbach, C., Schwartz, A. S., Semple, C. A., Sera, M., Severin, J., Shirahige, K., Simons, C., St Laurent, G., Suzuki, M., Suzuki, T., Sweet, M. J., Taft, R. J., Takeda, S., Takenaka, Y., Tan, K., Taylor, M. S., Teasdale, R. D., Tegner, J., Teichmann, S., Valen, E., Wahlestedt, C., Waki, K.,

- Waterhouse, A., Wells, C. A., Winther, O., Wu, L., Yamaguchi, K., Yanagawa, H., Yasuda, J., Zavolan, M., Hume, D. A., Riken Omics Science, C., Arakawa, T., Fukuda, S., Imamura, K., Kai, C., Kaiho, A., Kawashima, T., Kawazu, C., Kitazume, Y., Kojima, M., Miura, H., Murakami, K., Murata, M., Ninomiya, N., Nishiyori, H., Noma, S., Ogawa, C., Sano, T., Simon, C., Tagami, M., Takahashi, Y., Kawai, J., and Hayashizaki, Y. (2009) The transcriptional network that controls growth arrest and differentiation in a human myeloid leukemia cell line. *Nat Genet* **41**, 553-562
536. Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M. F., Huot, G., and Ferbeyre, G. (2007) Myc down-regulation as a mechanism to activate the Rb pathway in STAT5A-induced senescence. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 34938-34944
537. Diao, Z., Ji, Q., Wu, Z., Zhang, W., Cai, Y., Wang, Z., Hu, J., Liu, Z., Wang, Q., Bi, S., Huang, D., Ji, Z., Liu, G. H., Wang, S., Song, M., and Qu, J. (2021) SIRT3 consolidates heterochromatin and counteracts senescence. *Nucleic Acids Res* **49**, 4203-4219
538. 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
539. Agger, K., Cloos, P. A., Rudkjaer, L., Williams, K., Andersen, G., Christensen, J., and Helin, K. (2009) The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev* **23**, 1171-1176
540. Xia, L., Huang, W., Bellani, M., Seidman, M. M., Wu, K., Fan, D., Nie, Y., Cai, Y., Zhang, Y. W., Yu, L. R., Li, H., Zahnow, C. A., Xie, W., Chiu Yen, R. W., Rassool, F. V., and Baylin, S. B. (2017) CHD4 Has Oncogenic Functions in Initiating and Maintaining Epigenetic Suppression of Multiple Tumor Suppressor Genes. *Cancer Cell* **31**, 653-668 e657
541. Baumann, C., Zhang, X., and De La Fuente, R. (2020) Loss of CBX2 induces genome instability and senescence-associated chromosomal rearrangements. *J Cell Biol* **219**
542. Paddison, P. J., Cleary, M., Silva, J. M., Chang, K., Sheth, N., Sachidanandam, R., and Hannon, G. J. (2004) Cloning of short hairpin RNAs for gene knockdown in mammalian cells. *Nat Methods* **1**, 163-167
543. Gillotin, S., Davies, J. D., and Philpott, A. (2018) Subcellular localisation modulates ubiquitylation and degradation of Ascl1. *Sci Rep* **8**, 4625
544. 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

545. Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114-2120
546. Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15-21
547. Li, B., and Dewey, C. N. (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics* **12**, 323
548. Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550
549. Biran, A., Zada, L., Karam, P. A., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., Porat, Z., and Krizhanovsky, V. (2017) Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell* **16**, 661-671
550. Keyes, W. M., Wu, Y., Vogel, H., Guo, X., Lowe, S. W., and Mills, A. A. (2005) p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev* **19**, 1986-1999
551. Baker, D. J., Jeganathan, K. B., Cameron, J. D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., Kumar, R., Jenkins, R. B., de Groen, P. C., Roche, P., and van Deursen, J. M. (2004) BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet* **36**, 744-749
552. Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., Ben-Porath, I., and Krizhanovsky, V. (2016) Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* **7**, 11190
553. Baar, M. P., Brandt, R. M. C., Putavet, D. A., Klein, J. D. D., Derks, K. W. J., Bourgeois, B. R. M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D. A., van der Pluijm, I., Essers, J., van Cappellen, W. A., van, I. W. F., Houtsmuller, A. B., Pothof, J., de Bruin, R. W. F., Madl, T., Hoeijmakers, J. H. J., Campisi, J., and de Keizer, P. L. J. (2017) Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **169**, 132-147 e116
554. Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., and Baker, D. J. (2018) Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*
555. Roos, C. M., Zhang, B., Palmer, A. K., Ogrodnik, M. B., Pirtskhalava, T., Thalji, N. M., Hagler, M., Jurk, D., Smith, L. A., Casclang-Verzosa, G., Zhu, Y., Schafer, M. J., Tchkonja, T., Kirkland, J. L., and Miller, J. D. (2016) Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell* **15**, 973-977
556. Patil, P., Dong, Q., Wang, D., Chang, J., Wiley, C., Demaria, M., Lee, J., Kang, J., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., Sowa, G., Campisi, J., Zhou, D., and Vo, N. (2019)

- Systemic clearance of p16(INK4a) -positive senescent cells mitigates age-associated intervertebral disc degeneration. *Aging Cell* **18**, e12927
557. Rossiello, F., Jurk, D., Passos, J. F., and d'Adda di Fagagna, F. (2022) Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Cell Biol* **24**, 135-147
558. Choudhury, S., Huang, A. Y., Kim, J., Zhou, Z., Morillo, K., Maury, E. A., Tsai, J. W., Miller, M. B., Lodato, M. A., Araten, S., Hilal, N., Lee, E. A., Chen, M. H., and Walsh, C. A. (2022) Somatic mutations in single human cardiomyocytes reveal age-associated DNA damage and widespread oxidative genotoxicity. *Nat Aging* **2**, 714-725
559. Copp, M. E., Chubinskaya, S., Bracey, D. N., Shine, J., Sessions, G., Loeser, R. F., and Diekman, B. O. (2022) Comet assay for quantification of the increased DNA damage burden in primary human chondrocytes with aging and osteoarthritis. *Aging Cell* **21**, e13698
560. Yu, T., Slone, J., Liu, W., Barnes, R., Opresko, P. L., Wark, L., Mai, S., Horvath, S., and Huang, T. (2022) Premature aging is associated with higher levels of 8-oxoguanine and increased DNA damage in the Polg mutator mouse. *Aging Cell* **21**, e13669
561. Soto-Palma, C., Niedernhofer, L. J., Faulk, C. D., and Dong, X. (2022) Epigenetics, DNA damage, and aging. *J Clin Invest* **132**
562. Ovadya, Y., Landsberger, T., Leins, H., Vadai, E., Gal, H., Biran, A., Yosef, R., Sagiv, A., Agrawal, A., Shapira, A., Windheim, J., Tsoory, M., Schirmbeck, R., Amit, I., Geiger, H., and Krizhanovsky, V. (2018) Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nat Commun* **9**, 5435
563. Udrouiu, I. (2020) On the correlation between telomere shortening rate and life span. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 2248-2249
564. Blagosklonny, M. V. (2021) DNA- and telomere-damage does not limit lifespan: evidence from rapamycin. *Aging (Albany NY)* **13**, 3167-3175
565. Robinson, P. S., Thomas, L. E., Abascal, F., Jung, H., Harvey, L. M. R., West, H. D., Olafsson, S., Lee, B. C. H., Coorens, T. H. H., Lee-Six, H., Butlin, L., Lander, N., Truscott, R., Sanders, M. A., Lensing, S. V., Buczacki, S. J. A., Ten Hoopen, R., Coleman, N., Brunton-Sim, R., Rushbrook, S., Saeb-Parsy, K., Laloo, F., Campbell, P. J., Martincorena, I., Sampson, J. R., and Stratton, M. R. (2022) Inherited MUTYH mutations cause elevated somatic mutation rates and distinctive mutational signatures in normal human cells. *Nat Commun* **13**, 3949
566. Nishimura, K., Kumazawa, T., Kuroda, T., Katagiri, N., Tsuchiya, M., Goto, N., Furumai, R., Murayama, A., Yanagisawa, J., and Kimura, K. (2015) Perturbation of Ribosome Biogenesis Drives Cells into Senescence through 5S RNP-Mediated p53 Activation. *Cell reports* **10**, 1310-1323

567. Yuan, F., Zhang, Y., Ma, L., Cheng, Q., Li, G., and Tong, T. (2017) Enhanced NOLC1 promotes cell senescence and represses hepatocellular carcinoma cell proliferation by disturbing the organization of nucleolus. *Aging Cell* **16**, 726-737
568. Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J. L., Mullineux, S. T., Stamatopoulou, V., Mullier, R., Wacheul, L., and Lafontaine, D. L. (2013) The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. *Mol Cell* **51**, 539-551
569. Xie, N., Ma, L., Zhu, F., Zhao, W., Tian, F., Yuan, F., Fu, J., Huang, D., Lv, C., and Tong, T. (2016) Regulation of the MDM2-p53 pathway by the nucleolar protein CSIG in response to nucleolar stress. *Sci Rep* **6**, 36171
570. Catez, F., Dalla Venezia, N., Marcel, V., Zorbas, C., Lafontaine, D. L. J., and Diaz, J. J. (2019) Ribosome biogenesis: An emerging druggable pathway for cancer therapeutics. *Biochemical pharmacology* **159**, 74-81
571. Gupta, S., and Santoro, R. (2020) Regulation and Roles of the Nucleolus in Embryonic Stem Cells: From Ribosome Biogenesis to Genome Organization. *Stem Cell Reports* **15**, 1206-1219
572. Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly, Y. M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H. T., and Larsson, N. G. (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417-423
573. Lessard-Beaudoin, M., Laroche, M., Demers, M. J., Grenier, G., and Graham, R. K. (2015) Characterization of age-associated changes in peripheral organ and brain region weights in C57BL/6 mice. *Exp Gerontol* **63**, 27-34
574. Moerman, E. J., Teng, K., Lipschitz, D. A., and Lecka-Czernik, B. (2004) Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell* **3**, 379-389
575. Cotsarelis, G., Sun, T. T., and Lavker, R. M. (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* **61**, 1329-1337
576. Malik, S., Wong, N. D., Franklin, S. S., Kamath, T. V., L'Italien, G. J., Pio, J. R., and Williams, G. R. (2004) Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* **110**, 1245-1250
577. Denys, K., Cankurtaran, M., Janssens, W., and Petrovic, M. (2009) Metabolic syndrome in the elderly: an overview of the evidence. *Acta Clin Belg* **64**, 23-34

578. Vieira-Lara, M. A., Dommerholt, M. B., Zhang, W., Blankestijn, M., Wolters, J. C., Abegaz, F., Gerding, A., van der Veen, Y. T., Thomas, R., van Os, R. P., Reijngoud, D. J., Jonker, J. W., Kruit, J. K., and Bakker, B. M. (2021) Age-related susceptibility to insulin resistance arises from a combination of CPT1B decline and lipid overload. *BMC Biol* **19**, 154
579. Singh, L., Brennan, T. A., Russell, E., Kim, J. H., Chen, Q., Brad Johnson, F., and Pignolo, R. J. (2016) Aging alters bone-fat reciprocity by shifting in vivo mesenchymal precursor cell fate towards an adipogenic lineage. *Bone* **85**, 29-36
580. Takeshita, S., Fumoto, T., Naoe, Y., and Ikeda, K. (2014) Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. *J Biol Chem* **289**, 16699-16710
581. Ambrosi, T. H., Scialdone, A., Graja, A., Gohlke, S., Jank, A. M., Bocian, C., Woelk, L., Fan, H., Logan, D. W., Schurmann, A., Saraiva, L. R., and Schulz, T. J. (2017) Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell stem cell* **20**, 771-784 e776
582. Kim, K. M., Noh, J. H., Bodogai, M., Martindale, J. L., Yang, X., Indig, F. E., Basu, S. K., Ohnuma, K., Morimoto, C., Johnson, P. F., Biragyn, A., Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2017) Identification of senescent cell surface targetable protein DPP4. *Genes Dev* **31**, 1529-1534
583. Ambrosi, T. H., Marecic, O., McArdle, A., Sinha, R., Gulati, G. S., Tong, X., Wang, Y., Steininger, H. M., Hoover, M. Y., Koepke, L. S., Murphy, M. P., Sokol, J., Seo, E. Y., Tevlin, R., Lopez, M., Brewer, R. E., Mascharak, S., Lu, L., Ajanaku, O., Conley, S. D., Seita, J., Morri, M., Neff, N. F., Sahoo, D., Yang, F., Weissman, I. L., Longaker, M. T., and Chan, C. K. F. (2021) Aged skeletal stem cells generate an inflammatory degenerative niche. *Nature* **597**, 256-262
584. Tsai, R. Y., and McKay, R. D. (2002) A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev* **16**, 2991-3003
585. Romanova, L., Grand, A., Zhang, L., Rayner, S., Katoku-Kikyo, N., Kellner, S., and Kikyo, N. (2009) Critical role of nucleostemin in pre-rRNA processing. *J Biol Chem* **284**, 4968-4977
586. Zhang, Q., Shalaby, N. A., and Buszczak, M. (2014) Changes in rRNA transcription influence proliferation and cell fate within a stem cell lineage. *Science* **343**, 298-301
587. You, K. T., Park, J., and Kim, V. N. (2015) Role of the small subunit processome in the maintenance of pluripotent stem cells. *Genes Dev* **29**, 2004-2009
588. Facchini, F. S., Hua, N., Abbasi, F., and Reaven, G. M. (2001) Insulin resistance as a predictor of age-related diseases. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**, 3574-3578

589. Templeman, N. M., Flibotte, S., Chik, J. H. L., Sinha, S., Lim, G. E., Foster, L. J., Nislow, C., and Johnson, J. D. (2017) Reduced Circulating Insulin Enhances Insulin Sensitivity in Old Mice and Extends Lifespan. *Cell reports* **20**, 451-463
590. Moller, N., Gormsen, L., Fuglsang, J., and Gjedsted, J. (2003) Effects of ageing on insulin secretion and action. *Hormone research* **60**, 102-104
591. Shrestha, S., Erikson, G., Lyon, J., Spigelman, A. F., Bautista, A., Manning Fox, J. E., Dos Santos, C., Shokhirev, M., Cartailier, J. P., Hetzer, M. W., MacDonald, P. E., and Arrojo, E. D. R. (2022) Aging compromises human islet beta cell function and identity by decreasing transcription factor activity and inducing ER stress. *Sci Adv* **8**, eabo3932
592. Luck, H., Khan, S., Kim, J. H., Copeland, J. K., Revelo, X. S., Tsai, S., Chakraborty, M., Cheng, K., Tao Chan, Y., Nohr, M. K., Clemente-Casares, X., Perry, M. C., Ghazarian, M., Lei, H., Lin, Y. H., Coburn, B., Okrainec, A., Jackson, T., Poutanen, S., Gaisano, H., Allard, J. P., Guttman, D. S., Conner, M. E., Winer, S., and Winer, D. A. (2019) Gut-associated IgA(+) immune cells regulate obesity-related insulin resistance. *Nat Commun* **10**, 3650
593. Trott, D. W., Islam, M. T., Buckley, D. J., Donato, A. J., Dutson, T., Sorensen, E. S., Cai, J., Gogulamudi, V. R., Phuong, T. T. T., and Lesniewski, L. A. (2021) T lymphocyte depletion ameliorates age-related metabolic impairments in mice. *Geroscience* **43**, 1331-1347
594. Mattison, J. A., Roth, G. S., Beasley, T. M., Tilmont, E. M., Handy, A. M., Herbert, R. L., Longo, D. L., Allison, D. B., Young, J. E., Bryant, M., Barnard, D., Ward, W. F., Qi, W., Ingram, D. K., and de Cabo, R. (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* **489**, 318-321
595. Premsrirut, P. K., Dow, L. E., Kim, S. Y., Camiolo, M., Malone, C. D., Miething, C., Scuoppo, C., Zuber, J., Dickins, R. A., Kogan, S. C., Shroyer, K. R., Sordella, R., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2011) A rapid and scalable system for studying gene function in mice using conditional RNA interference. *Cell* **145**, 145-158
596. Kolodkin-Gal, D., Roitman, L., Ovadya, Y., Azazmeh, N., Assouline, B., Schlesinger, Y., Kalifa, R., Horwitz, S., Khalatnik, Y., Hochner-Ger, A., Imam, A., Demma, J. A., Winter, E., Benyamini, H., Elgavish, S., Khatib, A. A., Meir, K., Atlan, K., Pikarsky, E., Parnas, O., Dor, Y., Zamir, G., Ben-Porath, I., and Krizhanovsky, V. (2022) Senolytic elimination of Cox2-expressing senescent cells inhibits the growth of premalignant pancreatic lesions. *Gut* **71**, 345-355
597. Hodge, R. G., Schaefer, A., Howard, S. V., and Der, C. J. (2020) RAS and RHO family GTPase mutations in cancer: twin sons of different mothers? *Crit Rev Biochem Mol Biol* **55**, 386-407
598. 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

599. Tsompana, M., and Buck, M. J. (2014) Chromatin accessibility: a window into the genome. *Epigenetics Chromatin* **7**, 33
600. 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
601. Beausejour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* **22**, 4212-4222
602. Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S. J., and Mak, T. W. (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**, 1824-1827
603. Saretzki, G., Murphy, M. P., and von Zglinicki, T. (2003) MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress. *Aging Cell* **2**, 141-143
604. Kotsantis, P., Silva, L. M., Irscher, S., Jones, R. M., Folkes, L., Gromak, N., and Petermann, E. (2016) Increased global transcription activity as a mechanism of replication stress in cancer. *Nat Commun* **7**, 13087
605. Skourti-Stathaki, K., and Proudfoot, N. J. (2014) A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes Dev* **28**, 1384-1396
606. Xiao, H., Hasegawa, T., Miyaishi, O., Ohkusu, K., and Isobe, K. (1997) Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21WAF/CIP1 in p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 457-460
607. Candido, E. P., Reeves, R., and Davie, J. R. (1978) Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* **14**, 105-113
608. Romanov, V. S., Abramova, M. V., Svetlikova, S. B., Bykova, T. V., Zubova, S. G., Aksenov, N. D., Fornace, A. J., Jr., Pospelova, T. V., and Pospelov, V. A. (2010) p21(Waf1) is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate. *Cell Cycle* **9**, 3945-3955
609. Gurdon, J. B., Javed, K., Vodnala, M., and Garrett, N. (2020) Long-term association of a transcription factor with its chromatin binding site can stabilize gene expression and cell fate commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 15075-15084
610. Ghози, M. C., Bernstein, Y., Negreanu, V., Levanon, D., and Groner, Y. (1996) Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1935-1940

611. Yan, J., Qiu, Y., Ribeiro Dos Santos, A. M., Yin, Y., Li, Y. E., Vinckier, N., Nariai, N., Benaglio, P., Raman, A., Li, X., Fan, S., Chiou, J., Chen, F., Frazer, K. A., Gaulton, K. J., Sander, M., Taipale, J., and Ren, B. (2021) Systematic analysis of binding of transcription factors to noncoding variants. *Nature* **591**, 147-151
612. Hollenhorst, P. C., Ferris, M. W., Hull, M. A., Chae, H., Kim, S., and Graves, B. J. (2011) Oncogenic ETS proteins mimic activated RAS/MAPK signaling in prostate cells. *Genes Dev* **25**, 2147-2157
613. Xiao, J., Yang, S., Shen, P., Wang, Y., Sun, H., Ji, F., and Zhou, D. (2017) Phosphorylation of ETV4 at Ser73 by ERK kinase could block ETV4 ubiquitination degradation in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **486**, 1062-1068
614. Tanaka, T., Kurokawa, M., Ueki, K., Tanaka, K., Imai, Y., Mitani, K., Okazaki, K., Sagata, N., Yazaki, Y., Shibata, Y., Kadowaki, T., and Hirai, H. (1996) The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability. *Mol Cell Biol* **16**, 3967-3979
615. Gertz, J., Savic, D., Varley, K. E., Partridge, E. C., Safi, A., Jain, P., Cooper, G. M., Reddy, T. E., Crawford, G. E., and Myers, R. M. (2013) Distinct properties of cell-type-specific and shared transcription factor binding sites. *Mol Cell* **52**, 25-36
616. Rodriguez, A. C., Vahrenkamp, J. M., Berrett, K. C., Clark, K. A., Guillen, K. P., Scherer, S. D., Yang, C. H., Welm, B. E., Janat-Amsbury, M. M., Graves, B. J., and Gertz, J. (2020) ETV4 Is Necessary for Estrogen Signaling and Growth in Endometrial Cancer Cells. *Cancer Res* **80**, 1234-1245
617. Chavez, A., Scheiman, J., Vora, S., Pruitt, B. W., Tuttle, M., E, P. R. I., Lin, S., Kiani, S., Guzman, C. D., Wiegand, D. J., Ter-Ovanesyan, D., Braff, J. L., Davidsohn, N., Housden, B. E., Perrimon, N., Weiss, R., Aach, J., Collins, J. J., and Church, G. M. (2015) Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods* **12**, 326-328
618. Jensen, T. I., Mikkelsen, N. S., Gao, Z., Fosselteder, J., Pabst, G., Axelgaard, E., Laustsen, A., Konig, S., Reinisch, A., and Bak, R. O. (2021) Targeted regulation of transcription in primary cells using CRISPRa and CRISPRi. *Genome Res* **31**, 2120-2130
619. Ishak, C. A., Marshall, A. E., Passos, D. T., White, C. R., Kim, S. J., Cecchini, M. J., Ferwati, S., MacDonald, W. A., Howlett, C. J., Welch, I. D., Rubin, S. M., Mann, M. R. W., and Dick, F. A. (2016) An RB-EZH2 Complex Mediates Silencing of Repetitive DNA Sequences. *Mol Cell* **64**, 1074-1087
620. Lossaint, G., Horvat, A., Gire, V., Bacevic, K., Mrouj, K., Charrier-Savournin, F., Georget, V., Fisher, D., and Dulic, V. (2022) Reciprocal regulation of p21 and Chk1 controls the cyclin D1-RB pathway to mediate senescence onset after G2 arrest. *J Cell Sci* **135**
621. Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., Dickins, R. A., Narita, M., Zhang, M., and Lowe, S. W. (2010) Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell* **17**, 376-387

622. 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
623. van Koningsbruggen, S., Gierlinski, M., Schofield, P., Martin, D., Barton, G. J., Ariyurek, Y., den Dunnen, J. T., and Lamond, A. I. (2010) High-resolution whole-genome sequencing reveals that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli. *Mol Biol Cell* **21**, 3735-3748
624. Deschenes-Simard, X., Roy, S., Ferbeyre, G. (2016) Genome reprogramming in cells that escape from senescence. *Bionatura* **1**, 54-61
625. Yu, H., Sun, Z., Tan, T., Pan, H., Zhao, J., Zhang, L., Chen, J., Lei, A., Zhu, Y., Chen, L., Xu, Y., Liu, Y., Chen, M., Sheng, J., Xu, Z., Qian, P., Li, C., Gao, S., Daley, G. Q., and Zhang, J. (2021) rRNA biogenesis regulates mouse 2C-like state by 3D structure reorganization of peri-nucleolar heterochromatin. *Nat Commun* **12**, 6365
626. 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
627. Bersaglieri, C., and Santoro, R. (2019) Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells* **8**
628. Lee, T., Di Paola, D., Malina, A., Mills, J. R., Kreps, A., Grosse, F., Tang, H., Zannis-Hadjopoulos, M., Larsson, O., and Pelletier, J. (2014) Suppression of the DHX9 helicase induces premature senescence in human diploid fibroblasts in a p53-dependent manner. *J Biol Chem* **289**, 22798-22814
629. Mota, A., Berezicki, S., Wernersson, E., Harbers, L., Li-Wang, X., Gradin, K., Peuckert, C., Crosetto, N., and Bienko, M. (2022) FRET-FISH probes chromatin compaction at individual genomic loci in single cells. *Nat Commun* **13**, 6680
630. Dhara, S., Chhangawala, S., Chintalapudi, H., Askan, G., Aveson, V., Massa, A. L., Zhang, L., Torres, D., Makohon-Moore, A. P., Lecomte, N., Melchor, J. P., Bermeo, J., Cardenas, A., 3rd, Sinha, S., Glassman, D., Nicolle, R., Moffitt, R., Yu, K. H., Leppanen, S., Laderman, S., Curry, B., Gui, J., Balachandran, V. P., Iacobuzio-Donahue, C., Chandwani, R., Leslie, C. S., and Leach, S. D. (2021) Pancreatic cancer prognosis is predicted by an ATAC-array technology for assessing chromatin accessibility. *Nat Commun* **12**, 3044
631. Cosi, I., Pellicchia, A., De Lorenzo, E., Torre, E., Sica, M., Nesi, G., Notaro, R., and De Angioletti, M. (2020) ETV4 promotes late development of prostatic intraepithelial neoplasia and cell proliferation through direct and p53-mediated downregulation of p21. *J Hematol Oncol* **13**, 112
632. Larson, D. E., Xie, W., Glibetic, M., O'Mahony, D., Sells, B. H., and Rothblum, L. I. (1993) Coordinated decreases in rRNA gene transcription factors and rRNA synthesis during muscle cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7933-7936

633. Gayraud-Morel, B., Le Bouteiller, M., Commere, P. H., Cohen-Tannoudji, M., and Tajbakhsh, S. (2018) Notchless defines a stage-specific requirement for ribosome biogenesis during lineage progression in adult skeletal myogenesis. *Development* **145**
634. Sharifi, S., da Costa, H. F. R., and Bierhoff, H. (2020) The circuitry between ribosome biogenesis and translation in stem cell function and ageing. *Mech Ageing Dev* **189**, 111282
635. Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A., and Feinglos, M. N. (1988) Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* **37**, 1163-1167
636. Surwit, R. S., Seldin, M. F., Kuhn, C. M., Cochrane, C., and Feinglos, M. N. (1991) Control of expression of insulin resistance and hyperglycemia by different genetic factors in diabetic C57BL/6J mice. *Diabetes* **40**, 82-87
637. Chortis, V., Taylor, A. E., Doig, C. L., Walsh, M. D., Meimaridou, E., Jenkinson, C., Rodriguez-Blanco, G., Ronchi, C. L., Jafri, A., Metherell, L. A., Hebenstreit, D., Dunn, W. B., Arlt, W., and Foster, P. A. (2018) Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase as a Novel Treatment Target in Adrenocortical Carcinoma. *Endocrinology* **159**, 2836-2849
638. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* **114**, 1752-1761
639. Lee, H., Lee, Y. J., Choi, H., Ko, E. H., and Kim, J. W. (2009) Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem* **284**, 10601-10609
640. Goh, K. J., Chen, J. H., Rocha, N., and Semple, R. K. (2020) Human pluripotent stem cell-based models suggest preadipocyte senescence as a possible cause of metabolic complications of Werner and Bloom Syndromes. *Sci Rep* **10**, 7490
641. Oda, A., Tezuka, T., Ueno, Y., Hosoda, S., Amemiya, Y., Notsu, C., Kasahara, T., Nishiyama, C., and Goitsuka, R. (2018) Niche-induced extramedullary hematopoiesis in the spleen is regulated by the transcription factor Tlx1. *Sci Rep* **8**, 8308
642. Nousbeck, J., Spiegel, R., Ishida-Yamamoto, A., Indelman, M., Shani-Adir, A., Adir, N., Lipkin, E., Bercovici, S., Geiger, D., van Steensel, M. A., Steijlen, P. M., Bergman, R., Bindereif, A., Choder, M., Shalev, S., and Sprecher, E. (2008) Alopecia, neurological defects, and endocrinopathy syndrome caused by decreased expression of RBM28, a nucleolar protein associated with ribosome biogenesis. *Am J Hum Genet* **82**, 1114-1121
643. Bryant, C. J., Lorea, C. F., de Almeida, H. L., Jr., Weinert, L., Vedolin, L., Pinto, E. V. F., and Baserga, S. J. (2021) Biallelic splicing variants in the nucleolar 60S assembly factor RBM28 cause the ribosomopathy ANE syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**
644. Darr, K. C., and Schultz, E. (1987) Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* **63**, 1816-1821

645. Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., and Clevers, H. (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* **449**, 1003-1007
646. Zhou, W., Ramachandran, D., Mansouri, A., and Dailey, M. J. (2018) Glucose stimulates intestinal epithelial crypt proliferation by modulating cellular energy metabolism. *J Cell Physiol* **233**, 3465-3475
647. Zhou, W., Rowitz, B. M., and Dailey, M. J. (2018) Insulin/IGF-1 enhances intestinal epithelial crypt proliferation through PI3K/Akt, and not ERK signaling in obese humans. *Exp Biol Med (Maywood)* **243**, 911-916
648. Zhou, Y., Xin, X., Wang, L., Wang, B., Chen, L., Liu, O., Rowe, D. W., and Xu, M. (2021) Senolytics improve bone forming potential of bone marrow mesenchymal stem cells from aged mice. *NPJ Regen Med* **6**, 34
649. Miura, Y., Endo, K., Komori, K., and Sekiya, I. (2022) Clearance of senescent cells with ABT-263 improves biological functions of synovial mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients. *Stem Cell Res Ther* **13**, 222
650. Fatt, M. P., Tran, L. M., Vetere, G., Storer, M. A., Simonetta, J. V., Miller, F. D., Frankland, P. W., and Kaplan, D. R. (2022) Restoration of hippocampal neural precursor function by ablation of senescent cells in the aging stem cell niche. *Stem Cell Reports* **17**, 259-275

8. Annexe

Annexe 1

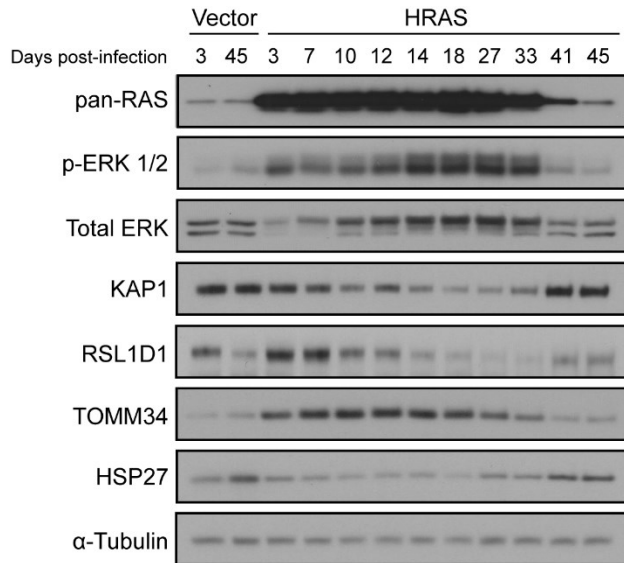


Figure 8.1. Niveaux de quelques cibles du SAPD à différents temps suivant l'activation de l'oncogène RAS.

Western-blot effectué sur des lysats totaux d'IMR90 ayant été infectés avec un vecteur vide contrôle ou un vecteur exprimant l'oncogène HRAS_G12V, puis récoltés aux temps indiqués (jours post-infection). RAS et ERK servent de contrôles pour l'expression du transgène. n=2

Annexe 2

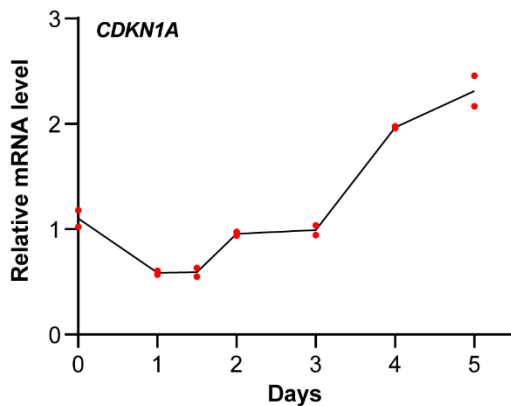


Figure 8.2. Niveaux d'ARNm de CDKN1A / P21 à différents temps suivant l'activation de l'oncogène RAS.

Des IMR90 ont été infectés avec un vecteur ER contrôle ou un vecteur exprimant l'oncogène ER-HRAS_G12V, puis traités avec 100nM de 4OHT ou le Veh (EtOH) pour les temps indiqués. Les résultats représentent les niveaux dans les cellules ER-RAS normalisés par ceux dans les cellules ER pour chacun des temps mesurés. Chaque réplicat biologique est représenté par un point rouge. n=2

Annexe 3

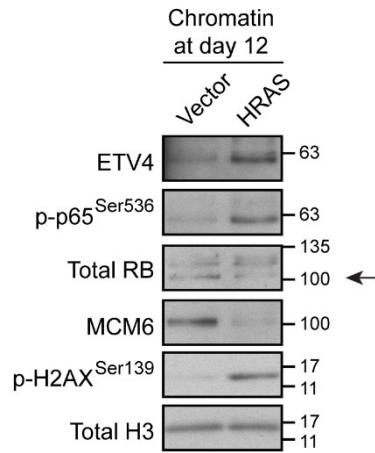


Figure 8.3. RB n'est pas enrichi dans la chromatine des cellules induites en sénescence par RAS.

Western-blot effectué sur des fractions de chromatine isolées à partir d'IMR90 ayant été infectés avec un vecteur vide contrôle ou un vecteur exprimant l'oncogène HRAS_G12V, puis fractionnées au jour 12 post-infection. n=2