



**HAL**  
open science

# Caractérisation fonctionnelle d'un nouveau variant d'histone impliqué dans la sénescence des cellules humaines induite par des dommages persistants à l'ADN, et son rôle potentiel comme biomarqueur de stress lors du vieillissement

Clément Coudereau

## ► To cite this version:

Clément Coudereau. Caractérisation fonctionnelle d'un nouveau variant d'histone impliqué dans la sénescence des cellules humaines induite par des dommages persistants à l'ADN, et son rôle potentiel comme biomarqueur de stress lors du vieillissement. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS575 . tel-01559826

**HAL Id: tel-01559826**

**<https://theses.hal.science/tel-01559826>**

Submitted on 11 Jul 2017

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

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

NNT : 2016SACLS575

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A  
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N°577  
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)  
Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

**M. Clément Coudereau**

Caractérisation fonctionnelle d'un nouveau variant d'histone impliqué dans la sénescence des cellules humaines induite par des dommages persistants à l'ADN, et son rôle potentiel comme biomarqueur de stress lors du vieillissement

**Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 20 Décembre 2016 :**

**Composition du Jury :**

Mme Corinne Abbadie	Professeure, Université Lille 1	Rapporteur, Présidente du jury
M. Christian Bronner	Chargé de recherche, IGBMC	Rapporteur
M. Daan Noordermeer	Chargé de recherche, I2BC	Examineur
M. Carl Mann	Directeur de recherche, CEA Saclay	Directeur de thèse



*My friend, I wish you could see that terrible attachment for gain, that all engaging  
lucre, that lust for money and more money?  
Once caught in that trap there would be no way out for me.*

**Jagdish Chandra Bose**, dans une lettre à Rabindranath Tagore  
à propos du brevetage et du commerce autour  
de la connaissance scientifique.



## Remerciements

Dans un premier temps, je souhaiterais remercier mon directeur Carl Mann pour m'avoir fait confiance en me proposant de réaliser ma thèse dans son équipe. J'ai eu la chance de bénéficier d'un environnement propice à la réalisation de mon travail et de bénéficier de conseils et d'un encadrement de qualité.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du Jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer et de critiquer mon travail : Corinne Abaddie, Christian Bronner et Daan Noordemeer. Les échanges que nous avons eus furent très enrichissants et j'ai énormément apprécié la pertinence et la finesse de leurs remarques.

Je souhaite également remercier nos collaborateurs pour leurs nombreux apports au projet, notamment Oliver Bischof et Ricardo Zamudio. Grâce à eux, je pense que le ChIP-seq n'a plus beaucoup de secret pour moi.

Je tiens à remercier les membres de mon laboratoire et les gens qui ont partagé mon quotidien pendant ces trois ans, ceux qui m'ont supporté moi et mon humour désopilant. Ce serait mentir de dire que la thèse fut un parcours sans embûche mais grâce à toutes ces personnes, ce ne fut jamais un calvaire :

Jean-Yves Thuret, pour son professionnalisme, ses conseils avisés, sa bonne humeur et ses cannelés.

Régis Courbeyrette, pour son immense contribution au projet de recherche, tu étais mon MacGuyver, toujours disponible à la moindre question stupide, bref, *Régis, t'es le plus fort, t'es le meilleur et on t'adore.*

Cyril Carvalho, pour m'avoir supporté au quotidien, je ne sais pas comment tu as fait, même moi, je ne me supporte plus parfois. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse.

Gwendoline le Pavec et Agnès Delaunay-Moisan, pour toujours répondre présent quand on a besoin d'elles que ce soit pour une question scientifique ou simplement pour relâcher la pression.

Je ne peux oublier évidemment l'équipe « labarre » et « Gérard » : Jean Labarre, évidemment, toujours souriant. Stéphane Chédin, Jean-Christophe Aude, Matthieu Gérard, Hélène Humbertclaude, Michel De Chaldée et Gilles Lagniel. Merci à eux pour m'avoir aidé à relâcher la pression pendant les pauses café et pour leur aide que ce soit pour mes protocoles expérimentaux, d'analyses ou pour la préparation de ma thèse.

Evidemment, je ne peux oublier Théo, Alise et Cyril (oui, tu es cité deux fois, c'te chance), mes camarades d'infortune à qui je souhaite beaucoup de réussite dans leur avenir professionnel et une bonne fin de thèse aux deux larrons qui doivent encore soutenir. Je vous souhaite bon courage. Tenez-bon, c'est quasiment fini !

Merci également à tous les membres d'Ibithèse, aux anciens comme aux nouveaux qui ont repris le flambeau. Les réunions et les repas furent toujours de bons moments.

Un merci tout spécial à Catherine Doreau, toujours présente dès qu'on a besoin d'elle. Nos « courtes » discussions me manqueront.

Enfin, un grand merci à ma famille et mes amis qui m'ont soutenu et qui ont pu subir directement ou indirectement les conséquences de cet engagement doctoral. Dans le désordre, je remercie donc Jasmine, Léa, Sucrion, Pinpin et Ellie, Gautier, Didline, Guillaume, Erwann, Thomas, Claire, Gaëtan, Alexandre, Adrien, Romain, Stéphane, Yoann, Geoffrey, Bastien, Christian, Jeanine, Raymonde, Maurice, Lydia, Raymond et la multitude de personnes que j'ai sûrement oublié.

Pour conclure, un grand merci à celle qui a partagé ma thèse au quotidien et qui partage actuellement ma vie, celle qui a supporté mon humeur, mes hauts, mes bas (surtout les bas d'ailleurs). Merci Babette.

Et merci à vous de venir lire mes travaux, je n'ai pas la prétention de vous présenter un travail parfait mais j'espère que la qualité sera à la hauteur de vos attentes. Bonne lecture !

# Table des matières

Table des matières.....	3
Table des Illustrations .....	5
Abréviations .....	7
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
<b>Chapitre 1 : Mécanismes et contrôle de la sénescence.....</b>	<b>10</b>
1. Inducteurs de Sénescence .....	10
1.1 La Sénescence Réplicative .....	10
1.2 Sénescence prématurée.....	12
2. Caractéristiques des cellules sénescentes .....	15
2.1 Arrêt prolifératif .....	15
2.2 Changement morphologiques.....	15
2.3 Augmentation de l'activité B-Gal .....	16
2.4 Formation de structures d'hétérochromatines : les SAHFs.....	16
2.5 Résistance à l'apoptose.....	17
2.6 Augmentation de l'activité autophagique.....	17
2.7 Modification de l'expression génique.....	18
2.8 Autres marqueurs de reconnaissance d'une cellule sénescence .....	18
2.9 Processus dynamique.....	19
3. Principales voies de signalisation, d'induction et de contrôle .....	20
3.1 La voie p53 .....	21
3.4 Acteurs du maintien de la sénescence. ....	22
4. Composition, régulation et signalisation du SASP .....	24
4.2 Les voies de régulation du SASP .....	26
4.3 Effet autocrine et paracrine du SASP.....	28
5. Le rôle de la sénescence <i>in vivo</i> .....	30
5.1 La sénescence est un mécanisme suppresseur de tumeurs .....	30
5.2 La sénescence est un processus nécessaire à l'homéostasie et au développement .....	30
5.3 L'impact de la persistance des cellules sénescences dans les tissus.....	30
<b>Chapitre 2 : Dynamique de la chromatine .....</b>	<b>32</b>
1. La structure du nucléosome .....	32
1.1 La composition du cœur histone .....	33
1.2 Dynamique du nucléosome et accessibilité de l'ADN.....	34
2. Structure de la chromatine .....	36
2.1 L'euchromatine.....	36
2.2 L'hétérochromatine.....	37
2.3 Domaines chromatiniens et territoires chromosomiques .....	37
2.4 Le chromosome mitotique .....	38
3. Le code épigénétique .....	39
3.1 Modifications post-traductionnelles des histones.....	39
3.2 Le code histone .....	40
3.3 Communication croisée et combinaisons des modifications d'histones.....	44
4. Histones canoniques et variants.....	45
4.1 La famille des variants de l'histone H2A .....	48
4.2 Les variants de l'histone H2B.....	50
4.3 Les variants d'histones de H3 .....	50
<b>Chapitre 3 : Rôle du code nucléosome dans l'établissement et la maintenance de la sénescence. ....</b>	<b>53</b>
1. PTMs et variants d'histones dans la sénescence cellulaire.....	53
1.1 Méthylations et Acétylation d'histones .....	53
1.2 Les variants d'histones.....	54
2. Le variant H2A.J .....	56

2.1 Accumulation du variant H2AJ durant la sénescence cellulaire avec dommages persistants à l'ADN .....	56
2.2 Les spécificités du variant H2AJ.....	57
2.3 H2AJ dans la littérature. ....	59
<b>Description du projet de thèse.....</b>	<b>59</b>
<b>Stratégie d'analyse.....</b>	<b>61</b>
Création de lignées de fibroblastes immortalisées au gène H2AFJ inactivé .....	61
ARN interférence.....	61
Création et validation des lignées.....	62
Création d'un anticorps anti-H2AJ spécifique .....	63
<b>RESULTATS.....</b>	<b>64</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>64</b>
<b>PUBLICATIONS.....</b>	<b>65</b>
<b>RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....</b>	<b>66</b>
<b>Importance mécanistique des particularités de séquences de H2AJ .....</b>	<b>66</b>
Effets de H2AJ sur les gènes d'inflammation dans le contexte de la réponse inflammatoire. ...	69
<b>Effet de H2AJ dans un phénotype sénescence dépourvu de dommages à l'ADN mais induisant les voies des DDR. ....</b>	<b>71</b>
<b>Exploration de voies impliquées dans la dérépression du SASP .....</b>	<b>73</b>
<b>H2AJ dans les lignées cancéreuses.....</b>	<b>77</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>79</b>
<b>H2AJ est nécessaire à la dérépression effective des gènes d'inflammation .....</b>	<b>79</b>
<b>Réflexions sur les mécanismes d'action et d'accumulation de H2AJ.....</b>	<b>80</b>
<b>H2AJ, un potentiel marqueur de stress lié au vieillissement.....</b>	<b>84</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>85</b>
<b>H2AJ <i>in vivo</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>Etude du mécanisme d'action de H2AJ.....</b>	<b>87</b>
<b>Accumulation de H2AJ au cours de la sénescence.....</b>	<b>88</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>89</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>119</b>
Annexe 1. Liste des histone-acétyltransferases (HAT) .....	119
Annexe 2. Liste des histone-deacetylases (HDAC) .....	119
Annexe 3. Liste des histone-méthyltransferases (HMT) .....	120
Annexe 4. Mise en évidence de la phosphorylation de H2AJ.....	120
Annexe 5. Matériels et méthodes .....	121

## Table des Illustrations

Figure 1. Inhibition de la voie de réponse aux dommages à l'ADN au niveau des télomères. ....	11
Figure 2. L'expression du gène HRAS-V12 dans des fibroblastes conduit à un burst prolifératif initial suivi d'un ralentissement et, à terme, d'un arrêt durable de la prolifération. ....	13
Figure 3. Morphologie des cellules sénescents. ....	16
Figure 4. Formation des SAHFs contribuant à l'arrêt prolifératif des cellules sénescents. ....	17
Figure 5. La sénescence est un phénomène dynamique. ....	20
Figure 6. Voie d'induction et effecteurs de la sénescence. ....	23
Figure 7. Représentation simplifié des différentes voies d'induction du SASP. ....	27
Figure 8. Photographie d'un conducteur de poids-lourds atteint de dermatoheliosis (ou photovieillissement) ....	31
Figure 9. Structure atomique du nucléosome de <i>Xenopus Laevis</i> . ....	32
Figure 10. Structure du coeur d'histones. ....	33
Figure 11. Structure d'une demi particule du coeur d'histone avec une résolution de 1,9 Angstrom. ....	34
Figure 12. Représentation schématique des modes de déplacement de l'octamère d'histone (cis ou trans) par un complexe de remodelage.(Perche & Robert-nicoud 2013) ....	35
Figure 13. Domaine de chromatine condensé. ....	38
Figure 14. Nouveau modèle de condensation du chromosome mitotique. ....	39
Figure 15. Formule développée des modifications post-translotionnelles les plus courantes : ....	40
Figure 16. Organisation génomique, transcription et séquences protéique des histones humaines du coeur du nucléosome ....	46
Figure 17. Alignement de séquences des variants d'histones H2A humaines. ....	47
Figure 18. Alignement de séquences des variants de H3 : H3.1, H3.2, H3.3, H3t et CENP-A. ....	51
Figure 19. Protocole d'analyse de la sénescence à différents temps et avec plusieurs inducteurs de sénescence. ....	56
Figure 20. H2AJ est enrichi avec le temps dans des conditions de sénescence à long terme induit par des dommages à l'ADN. ....	57
Figure 21. Quantification de l'ARNm des H2A en sénescence et en quiescence. ....	58
Figure 22. Alignement de séquences de l'histone H2A canonique de la levure <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> (Sc) et des histones H2AJ et H2AX humaines (Hs) ....	58
Figure 23. Schéma du système d'induction utilisé pour l'inactivation du gène H2AFJ. .	61
Figure 24. Spectres déconvolués des histones H2A2 pour les lignées NT et shH2AJ - Quantité relative d'ARNm obtenus par qPCR de H2AJ endogène (en blanc) et totale : endogène et ectopique (en noir) ....	62
Figure 25. Vérification de l'anticorps anti-H2AJ ....	63
Figure 26. Schéma de la double transfection dans nos lignées exprimant une version mutée de H2AJ. ....	66
Figure 27. Vérification des lignées exprimant une version mutée de H2A.J. ....	67

Figure 28. Quantités relatives d'ARNm obtenues par qPCR sur 4 gènes du SASP avec deux réplicats. ....	68
Figure 29. Voie de transduction du signal TLR .....	69
Figure 30. Quantité relative d'ARNm après traitement Poly(IC) pour les gènes OASL et CXCL 10.....	70
Figure 31. Induction de l'expression de gènes d'inflammation par un traitement NaButyrate .....	71
Figure 32. Quantification relative de H2AJ normalisée sur H3 à partir d'un Western Blot. ....	72
Figure 33. Accumulation de H2AJ avec ou sans traitement SB203580 dans des WI38hT NoTarget.....	73
Figure 34. Effets de la rapamycine sur l'expression de gènes d'inflammation (en haut) et sur l'accumulation d'H2AJ (en bas) .....	74
Figure 35. Quantité relative d'ARNm pour trois gènes d'inflammation sur les lignées de fibroblastes NT, sh3 et iKb-SR. ....	75
Figure 36. Immunoprécipitation de RelA à partir de fibroblastes en prolifération avec ou sans traitement TNF $\alpha$ .....	76
Figure 37. immunoprécipitation de RelA à partir de fibroblastes en prolifération et sénescence. (contrôle négatif) .....	76
Figure 38. Immunoprécipitation de RelA à partir de fibroblastes s en prolifération et sénescence. ....	77
Figure 39. Immunofluorescence anti-H2AJ sur lignées cancéreuses basales et lumineales et Western blot anti-H2AJ sur ces mêmes lignées.....	78
Figure 40. Immunohistochimies de plusieurs tissus humains adultes.....	78
Figure 41. Induction d'une réponse inflammatoire sur cellules 3T3 après traitement Poly(I:C). ....	86

## Abréviations

<b>53BP1</b> p53-binding protein 1	<b>HP1</b> heterochromatin protein 1
<b>ADN</b> acide désoxyribonucléique	<b>HPLC-MS</b> high performance liquid Chromatography – mass spectrometry
<b>ALT</b> alternative lengthening of telomeres	<b>hTERT</b> human telomerase reverse transcriptase
<b>ARN</b> acide ribonucléique	<b>HSP70</b> Heat Shock Protein 70
<b>ARNm</b> ARN messenger	<b>IGFBP7</b> insulin-like growth factor-binding protein 7
<b>ASF1</b> antisilencing function 1	<b>IL</b> interleukine
<b>ATM</b> ataxia telangiectasia mutated	<b>INK4</b> Inhibitor of CDK4
<b>ATR</b> ATM and RAD3-related	<b>INO80</b> inositol requiring 80
<b>ATRX</b> alpha-thalassemia/mental retardation X-linked syndrome protein	<b>ISWI</b> imitation switch
<b>BrdU</b> bromodeoxyuridine	<b>KDM</b> lysine demethylase
<b>CCF</b> chromatin Fragments	<b>LADs</b> lamina-associated domains
<b>CCL</b> chemokine C-C motif ligand	<b>MAPK</b> mitogen activated protein kinase
<b>CDKi</b> cyclin-dependant kinase inhibitor	<b>MCM</b> minichromosome maintenance
<b>CENP-A</b> centromere protein A	<b>MDC1</b> mediator of DNA-damage checkpoint 1
<b>ChIP-seq</b> chromatin immunoprecipitation - DNA sequencing	<b>MEF</b> mouse embryonic fibroblast
<b>CHK</b> checkpoint kinase	<b>MEK1</b> MAPK/ERK kinase 1
<b>CIP1</b> CDK-interacting protein 1	<b>MMP</b> matrix metalloproteinase
<b>CXCL</b> chemokine C-X-C motif ligand	<b>MOS</b> Moloney Murine Sarcoma
<b>DAPI</b> 4',6-diamidino-2-phenylindole	<b>MRE11</b> meiotic recombination 11
<b>DAXX</b> death domain-associated protein	<b>MRN</b> MRE11-RAD50-NBS1
<b>Dcr2</b> Decoy Receptor 2	<b>mTORC1</b> mammalian target of Rapamycin
<b>DDR</b> DNA damage response	<b>NAD</b> nicotinamide dinucléotide
<b>DEC1</b> Deleted oesophageal cancer 1	<b>NBS1</b> nijmegen breakage syndrome 1
<b>E2F</b> E2 factor	<b>NF1</b> neurofibromin 1
<b>DMSO</b> Diméthylsulfoxyde	<b>NFKB</b> nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells
<b>DNA-PK</b> DNA-Phosphokinases	<b>OASL</b> oligoadenylate synthetase-like
<b>ERK</b> extracellular signal-regulated kinase	<b>OIS</b> oncogene-induced senescence
<b>EZH2</b> enhancer of zeste homolog 2	<b>PCNA</b> proliferating cell nuclear antigen
<b>FACT</b> facilitates chromatin transcription	<b>PAI-1/2</b> plasminogen activator inhibitor-1/2
<b>GAPDH</b> Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	<b>PHD</b> plant homeodomain
<b>H3t</b> testis H3	<b>PKB</b> protéine kinase B
<b>HAT</b> histone acetyltransferase	<b>PML</b> promyelocytic leukemia nuclear
<b>HDAC</b> histone deacetylase	
<b>HDACi</b> histone deacetylase inhibitor	
<b>HFD</b> histone fold domain	

**PTM** post-transcriptional modification  
**Poly(IC)** polyinosinic:polycytidylic acid  
**POT1** protection of telomeres 1  
**PRC** polycomb repressive complex  
**PTEN** phosphatase and tensin homolog  
**RAD** radiation-sensitive mutation  
**RAF** rat fibrosarcoma. BRAF, CRAF.  
**RAP1** transcriptional repressor/activator protein 1  
**RAS** rat sarcoma. HRAS : Harvey.  
**Rb** retinoblastoma protein  
**RIG-1** retinoic acid-inducible gene 1  
**ROS** reactive oxygen species  
**SA-B-GAL** senescence-associated- $\beta$ -galactosidase  
**SAHFs** senescence-associated heterochromatin foci  
**SAPD** Senescence-associated protein degradation  
**SASP** senescence-associated secretory phenotype  
**SC2** scaffold protein 2  
**shRNA** short hairpin RNA  
**SLBP** stem-loop binding protein  
**SUV39** suppressor of variegation 3-9  
**SWI/SNF** switching defective/sucrose non fermenting  
**TIN2** TRF1 interacting nuclear factor 2  
**TLR** Toll-Like Receptor  
**TNF** tumor necrosis factor  
**TPP1=PTOP** POT1 and TIN2-organizing protein 1  
**TRAF** TNF receptor associated factor  
**TRF** TTAGGG repeats factor  
**TSA** trichostatin A  
**TSS** Transcription Start Site  
**UHPLC** ultra-high performance liquid chromatography  
**VEGF** vascular endothelial growth factor

Le vieillissement est un des risques majeurs pour la plupart des maladies chroniques chez l'homme mais les principaux mécanismes qui le régulent sont encore méconnus. La sénescence cellulaire, qui bloque la prolifération de cellules endommagées ou dysfonctionnelles, est un phénotype important dans ce contexte en contraignant la progression de tumeurs malignes. Avec l'âge, les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus et organes. Or, les facteurs sécrétés par les cellules sénescents peuvent perturber les capacités multipotentes des cellules souches humaines ainsi que la structure et la fonction des tissus en affectant la croissance et la migration cellulaire, l'architecture des tissus, la formation des vaisseaux sanguins et la différenciation. L'action paracrine de certains facteurs protéiques (IL6, IL8, VEGF, MMP3,...) semblerait contribuer à la promotion de tumeurs ainsi que la migration de cellules selon la théorie de la pléiotropie antagoniste.

Ainsi, des processus biologiques qui ont été sélectionnés pour favoriser les jeunes organismes (activité anti-tumorale de la sénescence) peuvent être délétères pour des individus âgés. Il a d'ailleurs été démontré que la destruction sélective de cellules sénescents *in-vivo* (ou la suppression de leurs effets néfastes tel que leur sécrétome à l'effet délétère) permettrait de lutter contre ces maladies liées au vieillissement et prolongerait la durée de vie.

Cependant, il est encore difficile à l'heure actuelle d'identifier facilement des cellules sénescents *in-vivo*, des marqueurs existent (SA-B-Gal, activation de réseaux suppresseur de tumeurs p16, p53 ou sécrétion du SASP) mais utilisés indépendamment, ces marqueurs ne sont pas spécifiques à la sénescence et c'est leur utilisation conjointe qui permet l'identification de cellules sénescents sans équivoque. De plus, les mécanismes liés à l'activation du phénotype sécrétoire de la sénescence sont encore peu connus et il en est donc difficile de contrer ses effets.

Dans ce contexte, je me suis intéressé au cours de ma thèse à un variant d'histone s'accumulant spécifiquement lors de la sénescence cellulaire accompagnée de dommages persistants à l'ADN. Pour cela, nous avons grâce à une stratégie utilisant l'interférence par ARN afin de déterminer le rôle de H2AJ dans la dérepression des gènes d'inflammation. Par la suite, je me suis attelé à identifier la localisation de cette histone sur la chromatine. J'ai pu également remarquer que le rôle de H2AJ ne semble pas se limiter à la sénescence. Il m'a été possible de m'intéresser aux mécanismes liés à son mode d'action de H2AJ et à son accumulation spécifique en sénescence. Enfin, grâce à plusieurs collaborations, nous avons pu identifier une répartition non-homogène de H2AJ *in vivo* et établir un lien entre cellules sécrétrices et accumulation de cette histone.

Avant de présenter mes résultats, je commencerai par introduire le phénomène que représente la sénescence cellulaire et notamment l'impact biologique de ce phénotype. Je poursuivrai en présentant l'importance de l'information épigénétique en insistant sur le rôle des variants d'histones. Enfin, je présenterai les travaux préliminaires qui ont débouché sur la création de ce projet de thèse.



# INTRODUCTION

---

## Chapitre 1 : Mécanismes et contrôle de la sénescence

La sénescence est le plus souvent définie comme un arrêt prolifératif cellulaire irréversible en réponse à un stress. Bien que sorties du cycle cellulaire, les cellules sénescents restent métaboliquement très actives. Cela se traduit par l'apparition de nombreuses caractéristiques phénotypiques. A l'époque de sa découverte et lors des premières années de recherches, la sénescence fut perçue comme liée à la suppression des tumeurs et capable de favoriser le vieillissement. Par la suite, l'utilisation de modèles murins a permis de confirmer que les cellules sénescents s'accumulent dans l'organisme au fil des années et l'importance de la sénescence dans la tumorigénèse.

Dans ce chapitre, je commencerai par décrire les différents inducteurs de la sénescence, les caractéristiques des cellules sénescents ainsi que les voies de signalisation impliquées. Je m'attarderai notamment sur le sécrétome des cellules sénescents et l'implication de ce dernier dans les différents rôles que peuvent jouer les cellules sénescents dans les tissus.

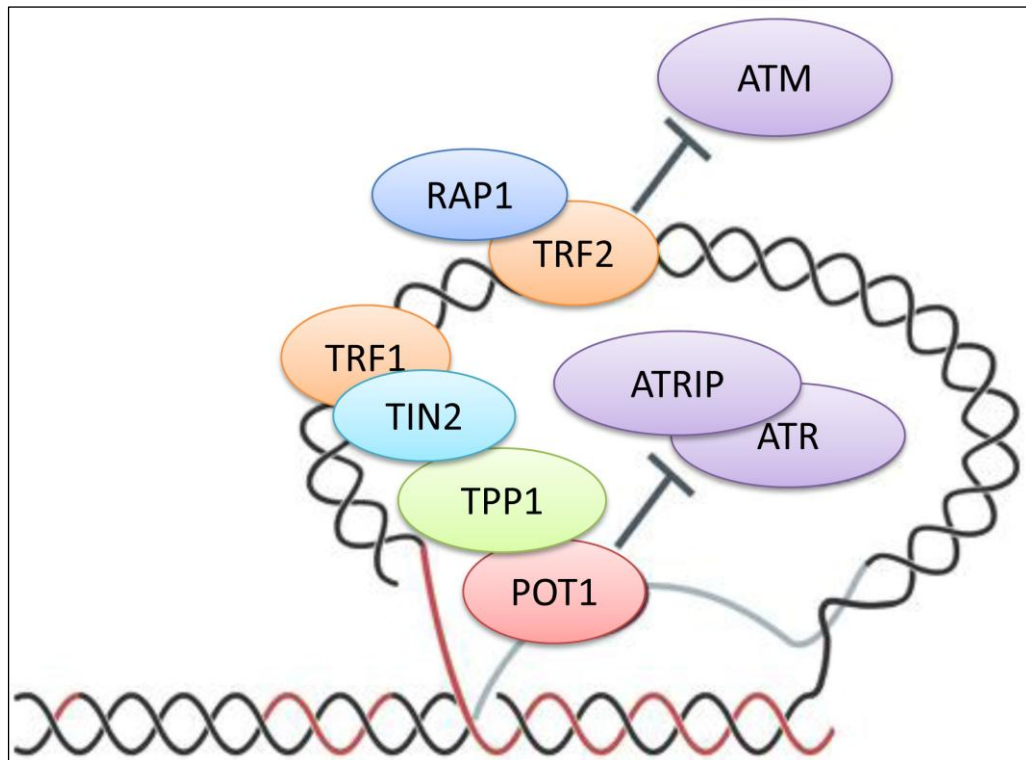
### 1. Inducteurs de Sénescence

La sénescence cellulaire est une réponse à un stress. Nous verrons dans cette partie que nous pouvons différencier plusieurs types de sénescence en fonction des stimuli d'induction.

#### 1.1 La Sénescence Répllicative

La sénescence cellulaire fut mise en évidence il y a un peu plus de cinquante ans par Hayflick et Moorhead (Hayflick & Moorhead 1961) dans un contexte de culture de fibroblastes proliférant *in vitro*. Les fibroblastes, comme la majorité des cellules humaines, font face à un problème en raison de la structure même des télomères (extrémité des chromosomes) qui sont constitués d'une séquence répétitive 5'-TTAGGG-3' pour les vertébrés (Moyzis et al. 1988). La présence d'une extrémité physique devrait permettre la fixation de senseurs de dommages à l'ADN ( $\gamma$ H2AX, NBS1, MRE11, RAD50) or cette fixation est rendue impossible par la présence de facteurs associés aux télomères inhibant cette réponse aux dommages à l'ADN. (Palm & de Lange 2008) Des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence des facteurs protéiques : TRF1, TRF2 (telomeric repeat-binding factor 1 et 2), POT1

(protection of telomeres 1), TPP1 (ou PTO1 : POT1 and TIN2-organizing protein 1), TIN2 (TRF1 interacting protein) et RAP1 (transcriptional repressor/activator protein 1) capable de former une structure circulaire protégeant les télomères de leur reconnaissance par les voies de réparation des dommages à l'ADN (**figure 1**). (Karlseder J et al, 2004; Denchi EL & de Lange T, 2007).



**Figure 1. Inhibition de la voie de réponse aux dommages à l'ADN au niveau des télomères.**  
Adapté de d'Adda di Fagagna, 2008.

En revanche, l'ADN polymérase est incapable de copier correctement les derniers nucléotides lors de la réplication d'un chromosome. Par conséquent, au cours de chaque phase S, les télomères raccourcissent. La perte de séquences aux régions télomériques ne provoque pas immédiatement une perte d'information génétique car un télomère est une région *a priori* non codante. Cependant, lorsque les télomères atteignent une taille minimale critique, cela pose un problème de maintenance de l'ADN car les extrémités désormais nues des chromosomes sont reconnues comme des cassures double-brin sur l'ADN. Ce qui peut aboutir à une fusion aberrante entre chromosomes par les voies de réparation de l'ADN. C'est pourquoi est enclenchée la cascade de réponse aux dommages à l'ADN. Cette cascade implique l'activation des kinases ATR et ATM (ataxia-telangiectasia Rad3 related et ataxia-telangiectasia mutated) qui vont phosphoryler le variant d'histone H2AX, nommé  $\gamma$ H2AX. Cette voie est renforcée par une boucle de rétroaction positive formée par d'autres médiateurs de la réponse aux dommages à l'ADN : HUS1, MDC1, 53BP1, TOPBP1, RPA, RAD1, RAD9 qui vont activer les kinases de contrôle CHK1 et CHK2 aboutissant éventuellement à

l'activation du régulateur p53. Son activation provoque celle de la CDKI p21 et un arrêt durable du cycle cellulaire. En temps normal, cela permet à la cellule de réparer ses cassures avant de se diviser. Toutefois, dans le cas de la sénescence répliquative, les cellules ne reprennent pas le cycle cellulaire dans la mesure où les dommages à l'ADN ne peuvent être réparés. Cela assure donc l'intégrité des chromosomes des cellules en prolifération (Fumagalli et al. 2012).

Le lien entre raccourcissement des télomères et sénescence est d'ailleurs confirmé par la possibilité de s'abroger de ce phénotype sénescence en exprimant l'holoenzyme hTERT (human telomerase reverse transcriptase), ce qui rallonge indéfiniment la durée de vie des cellules *in vitro* en absence de stress exogènes (Bodnar et al. 1998). En outre, nombre de cancers expriment hTERT (Shay & Bacchetti 1997) ou utilisent un système alternatif ALT permettant de rallonger les télomères par recombinaison homologue ((Varley et al. 2002; Muntoni & Reddel 2005; Cesare & Reddel 2010)) afin de leur donner un potentiel répliquatif infini.

## **1.2 Sénescence prématurée**

Dans de nombreux autres cas, hTERT ne bloque pas l'entrée en sénescence en raison de plusieurs autres stimuli capables d'induire la sénescence sans impliquer un raccourcissement télomérique. C'est le cas de certains stress de culture. On parle alors de sénescence prématurée car elle est déclenchée avant l'entrée en sénescence répliquative. De nombreux facteurs sont capables de bloquer la prolifération et d'induire un phénotype sénescence, ils peuvent être divisés en plusieurs catégories en fonction des voies de signalisation impliquées et des caractéristiques phénotypiques émergentes.

### **1.2.1 Les stress de culture *in vitro***

Des conditions de culture *in vitro* non adéquates peuvent induire la sénescence (Coppé et al. 2010). Une absence de tapis cellulaire nourricier (Ramirez et al. 2001), une absence de composés de la matrice extracellulaire ou plus majoritairement un stress oxydant (Parrinello et al. 2003) peuvent induire un choc. S'ensuit une sénescence que l'on qualifie d'induite par des stress de culture (ou SIPS) (Suzuki & Boothman 2008; Toussaint et al. 2000)

A titre d'exemple, des niveaux subléthaux de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sont de puissants inducteurs de sénescence (Chen & Ames 1994; Parrinello et al. 2003). En réduisant la quantité de dioxygène en culture jusqu'à un niveau physiologique de 5%, il est d'ailleurs possible d'allonger la durée de vie de ces cellules (PACKER & FUEHR 1977; Parrinello et al. 2003).

### **1.2.2 Les dommages à l'ADN**

A l'instar du raccourcissement des télomères, l'irradiation  $\gamma$  (Di Leonardo et al. 1994), UV (Lewis et al. 2008) ou l'usage d'agents génotoxiques (Leontieva & Blagosklonny 2010) peuvent déclencher la cascade réactionnelle de réponse aux dommages à l'ADN.

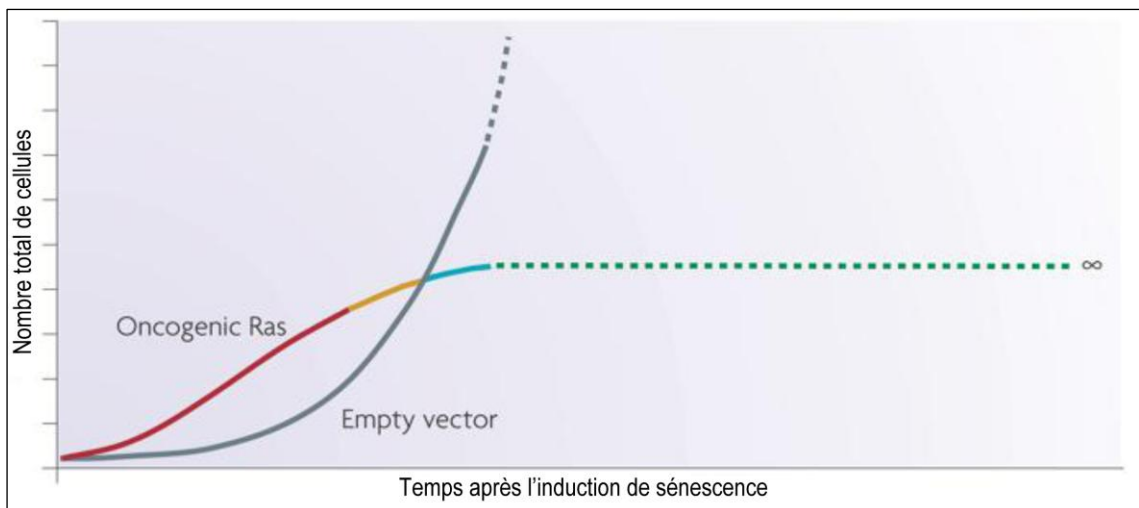
De surcroît, ce type d'induction a été décrit suite à l'utilisation de molécules de chimiothérapie telles que l'étoposide. Ce phénomène est connu sous le nom de « Therapy-Induced Senescence » (TIS) (Roninson 2003). Ces cellules sénescentes qui apparaissent au voisinage du tissu tumoral ont d'ailleurs un rôle important à jouer dans la progression tumorale à cause de la modification qu'elles induisent dans leur environnement. L'importance de la sénescence dans la progression tumorale est développée dans la partie 4.3.1 du chapitre 1.

### 1.2.3 Sénescence induite par des oncogènes

Des études menées sur un mutant de HRAS (HRAS<sup>V12</sup>) introduit grâce à un retrovirus dans des cellules primaires (et une lignée murine immortalisée hTERT) montrent que l'activation de cet oncogène engendre un arrêt prolifératif et un phénotype semblable à celui des cellules sénescentes (Kamijo et al. 1997; Serrano, Athena W Lin, et al. 1997; Wei et al. 1999). Une quantité importante d'oncogènes est en mesure d'induire ce type de sénescence : RAS (Di Micco et al. 2006), RAF1 (Zhu et al. 1998), BRAF (Michaloglou et al. 2005), MEK (Lin et al. 1998), MOS (Bartkova et al. 2006), RAC1 (Debidda et al. 2006), PML (Pearson et al. 2000; Bischof et al. 2002) et  $\beta$ -catenin (Xu et al. 2008).

Afin de faciliter l'étude de ce modèle d'entrée en sénescence, a été créé plusieurs systèmes d'induction conditionnelle de la sénescence tel que HRAS activé (Young et al. 2009), MEK1 activé (Treinies et al. 1999).

L'induction d'oncogène provoque l'entrée dans une phase hyperproliférative temporaire suivie d'un ralentissement de la prolifération et de l'entrée en sénescence. Cette réponse biphasique se retrouve suite à l'activation de HRAS, BRAF, ou encore MYC (**figure 2**) (d'Adda di Fagagna 2008).



**Figure 2.** L'expression du gène HRAS-V12 dans des fibroblastes conduit à un burst prolifératif initial suivi d'un ralentissement et, à terme, d'un arrêt durable de la prolifération.

Adapté de d'Adda di Fagagna, 2008.

Il est à noter que la fin de la phase hyperproliférative s'accompagne parfois d'une activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN (Di Micco et al. 2006; Bartkova et al. 2006). Cette activation des DDR (Dna Damage Response) peut provenir du stress répliatif causé par l'oncogène qui entraîne la formation de multiples fourches de réplication dont la progression est défectueuse (Bartkova et al. 2006; Di Micco et al. 2006; Mallette et al. 2007) ou l'altération de la structure et de la fonction des télomères qui n'ont pas d'activité télomérase (Suram & Herbig 2014). Il a également été montré que l'activation de RAS peut générer de grande quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) dans la cellule pouvant être à l'origine de dommages à l'ADN (Lee et al. 1999). Mais la présence de ces dommages n'est pas toujours observée (Hemann & Narita 2007; Efeyan et al. 2009). Ainsi, d'autres facteurs sont potentiellement nécessaires pour permettre l'arrêt prolifératif durable (Courtois-Cox et al. 2008).

Comme beaucoup de réponses physiologiques, l'entrée en sénescence, à la suite de l'activation d'un oncogène, est dépendante du type cellulaire et de l'intensité du signal oncogénique. Une forte induction de Ras dans des fibroblastes induit la sénescence (Serrano, Athena W Lin, et al. 1997) tandis qu'une faible induction dans des MEFs favorise la prolifération ou la tumorigénèse (Tuveson et al. 2004). Cette réponse dose-dépendante a également été observée dans des tissus mammaires (Sarkisian et al. 2007).

#### **1.2.4 Sénescence induite par la perte de suppresseurs de tumeurs**

A l'instar de la surexpression d'oncogènes, certains suppresseurs de tumeurs peuvent jouer le rôle d'inducteur de sénescence. Il n'est pas surprenant de constater que l'expression ectopique de suppresseurs de tumeurs tel que p16<sup>ink4a</sup> de la protéine p21 peut conduire à l'induction de sénescence (Coppé et al. 2011). D'ailleurs, leur expression est corrélée avec l'âge (Zindy et al. 1997; Krishnamurthy et al. 2004).

Paradoxalement à ce constat, la perte d'autres suppresseurs de tumeurs : PTEN (phosphatase and tensin homolog), NF1 (neurofibromin 1) ou VHL peuvent causer l'entrée en sénescence. (Z. Chen et al. 2005; Stéphanie Courtois-Cox et al. 2006; A. P. Young et al. 2008) en fonction du type cellulaire. Dans le cas de PTEN, l'activation de p53 par la voie mTORC1 (mammalian Target of Rapamycin 1) et la régulation de p16<sup>ink4A</sup> par le complexe APC/Cdh1 sont responsables de l'entrée en sénescence. (Nardella et al. 2011)

#### **1.2.5 Autres inducteurs possibles**

Les études récentes sur la sénescence ont suggéré que d'autres facteurs favorisent ou provoquent l'entrée en sénescence. A été mis en évidence la possibilité d'induire la sénescence de manière paracrine par les molécules de signalisation sécrétées par les cellules sénescents elles-mêmes : IL6, IL8, IGFBP7 ou des cytokines à l'action anti-

proliférante comme IFN- $\beta$  (Moiseeva et al. 2006) ou TGF- $\beta$  (Katakura et al. 1999; Reimann et al. 2010).

L'utilisation d'inhibiteurs d'histone deacetylases (HDAC) comme le Butyrate de Sodium (NaB) ou la trichostatine A (TSA) induit l'hyperacétylation provoquant un stress chromatinien. S'ensuit l'apparition d'un phénotype sénescents : morphologie aplatie, activité SA-B-Gal, expression de p21, etc. (Place et al. 2005). Tandis qu'un traitement similaire sur cellules sénescents n'amplifie pas les effets de l'entrée en sénescence.

Enfin, les niveaux de HDAC-1 décroissent avec le nombre de passages de fibroblastes proliférants (Bandyopadhyay et al. 2002). Ces résultats soulignent l'importance des modifications de la chromatine lors de la sénescence et son impact sur le phénotype sénescents.

## 2. Caractéristiques des cellules sénescents

### 2.1 Arrêt prolifératif

La première caractéristique des cellules sénescents qui fut décrite fut l'arrêt de la prolifération. Les cellules sénescents sont incapables de se diviser. C'est une caractéristique indispensable mais non suffisante à l'identification de la sénescence. En effet, des cellules telles que les cellules en différenciation terminale ou les cellules en quiescence (phase G0) présentent un arrêt stable de la prolifération. La différence réside dans l'absence d'activation des voies de signalisations impliquées dans la suppression de tumeurs chez les cellules différenciées ou en quiescence.

La plupart du temps, les cellules sénescents sont arrêtées en phase G1 (Di Leonardo et al. 1994; Herbig et al. 2004; Ogryzko et al. 1996; Serrano, Athena W Lin, et al. 1997) mais il a été montré qu'un arrêt en phase G2 par l'activation de certains oncogènes ou en réponse à des agents chimiotoxiques est possible (Shay & Roninson 2004).

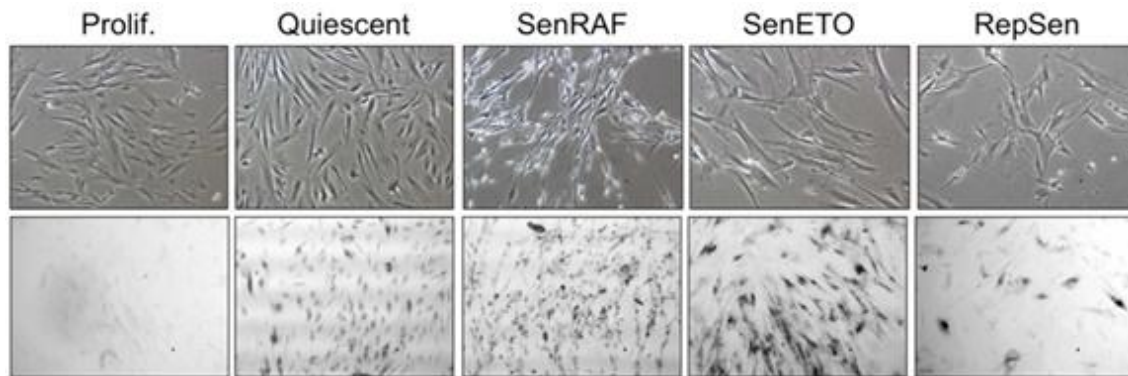
L'arrêt prolifératif des cellules sénescents est considéré comme permanent mais il est possible de l'outrepasser par des manipulations génétiques (M Beauséjour et al. 2003; Dirac & Bernards 2003; Jeanblanc et al. 2012) ou la déplétion de protéines de signalisation (Kuilman & Peeper 2009).

### 2.2 Changement morphologiques

Les cellules sénescents sont également caractérisées par de marquants changements morphologiques. Les cellules peuvent s'élargir, s'aplanir ou s'allonger. On peut également voir leur réticulum endoplasmique se vacuoliser (Denoyelle et al. 2006) et voir s'accroître la masse lysosomale. (**figure 3**)

Il est intéressant de remarquer que ces changements diffèrent selon le type et le stress cellulaire : l'aplatissement s'observe suite à l'activation de HRAS (Serrano, Athena W Lin, et al. 1997), suite à un stress de culture *in vitro* (Parrinello et al. 2003) ou suite à l'activation des voies de signalisation de dommages à l'ADN (Korotchkina et al. 2010) tandis que l'activation des kinases RAF (Zhu et al. 1998) ou MEF(Lin et al. 1998) en aval

de RAS se caractérise par une morphologie très allongée avec de longs prolongements cytoplasmiques.



**Figure 3. Morphologie des cellules sénescences.**

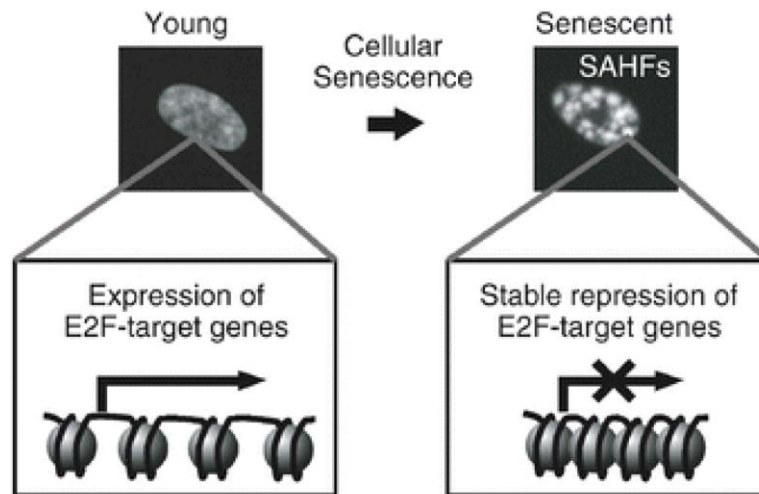
La première ligne montre la morphologie de fibroblastes WI38 en prolifération, en quiescence et en sénescence. La sénescence est ici induite par un oncogène RAF (SenRAF) pendant 5 jours, par des dommages à l'ADN induit par étoposide (SenETO) pendant 5 jours ou par sénescence réplication (RepSen). La seconde ligne de ces images montre l'activité enzymatique  $\beta$ -galactosidase qui permet de visualiser les cellules sénescences par une coloration cytoplasmique. Données issues de Contrepois, 2012.

### 2.3 Augmentation de l'activité B-Gal

La  $\beta$ -Galactosidase est un marqueur de la sénescence couramment utilisée. Identifiée en 1995 par l'équipe du Dr Campisi, l'activité de cette enzyme peut être détectée dans la région périnucléaire des cellules sénescences (Dimri et al. 1995). Ce type de marquage enzymatique peut être réalisé *in vitro* ou *in vivo* (Debacq-Chainiaux et al. 2009). Ce marqueur n'est toutefois pas spécifique de la sénescence car une activité  $\beta$ -Galactosidase est détectable dans les cellules quiescentes (Yang & Hu 2005).

### 2.4 Formation de structures d'hétérochromatines : les SAHFs

Une caractéristique particulière des cellules sénescences est la formation de foyers de chromatine condensée : les SAHFs (Senescence-Associated Heterochromatin Foci) (**figure 4**). Découverts en 2003, ces foyers sont aisément détectables par coloration (DAPI, Hoechst), là où des cellules proliférantes montreraient une coloration homogène à l'exception du chromosome X inactif chez la femme (Yang & Hu 2005). Ces foyers sont enrichis en protéines de l'hétérochromatine telles que HP1 (heterochromatin protein 1) ou le variant d'histone macroH2A et contiennent des marques épigénétiques répressives (H3K9Me3/H3K27Me3). Ces structures semblent jouer un rôle dans la répression des gènes E2F (Narita et al. 2003). De plus, Les SAHFs ne sont pas aussi marqués dans des lignées de fibroblastes de prépuce (cellules Bj) et la sénescence y est plus facilement réversible (di Fagagna et al. 2003; Beauséjour et al. 2003). Il a donc été supposé, dans un premier temps, que les SAHFs joueraient un rôle de maintenance et de renforcement de la sénescence. Or, cette explication semble être contestée par des études plus récentes car interférer avec la formation des SAHFs ne bloque pas l'entrée en sénescence ni sa stabilité (Kosar et al. 2011; Contrepois et al. 2012).



**Figure 4. Formation des SAHFs contribuant à l'arrêt prolifératif des cellules sénescences.**  
 Les SAHFs répriment stablement la transcription des gènes E2F nécessaires à la transition de la phase G1 à la phase S. Issues de Funayama, 2007.

## 2.5 Résistance à l'apoptose

De nombreuses cellules sénescences présentent une résistance à l'apoptose. Ce processus de mort cellulaire programmée permet d'éliminer les cellules ne pouvant plus assurer leurs fonctions car endommagées. (Wang 1995; Gansauge et al. 1997; Seluanov et al. 2001). Les mécanismes impliqués dans cette résistance ne sont pas élucidés mais certaines molécules telles que la caspase-3 (Rebbaa et al. 2003; Marcotte et al. 2004) ou Bcl-2 (Wang 1995; Crescenzi et al. 2003; Ryu et al. 2007) sont impliquées dans ce processus. L'absence de stabilisation de p53 pourrait également jouer un rôle (Seluanov et al. 2001). Plus de travaux sont nécessaires pour comprendre pourquoi les cellules entrent préférentiellement en sénescence ou en apoptose en réponse à un stress. Le type cellulaire a son importance, les fibroblastes ou les cellules épithéliales engagent plus facilement une entrée en sénescence là où des lymphocytes préfèrent l'apoptose. A l'instar de l'induction de la sénescence par un oncogène qui est induite préférentiellement à la tumorigénèse, l'induction de l'apoptose ou de la sénescence serait envisageable pour tous les types cellulaires mais dépendrait de la nature et de l'intensité du signal de stress. (Rodier et al. 2007)

## 2.6 Augmentation de l'activité autophagique

L'autophagie est définie comme un processus catabolique suite à certains stress (ex. carences nutritives) où les cellules digèrent leurs propres composants grâce à leurs lysosomes (Levine & Kroemer 2008; Yang & Klionsky 2010; Kimmelman 2011). Elle joue un rôle dans l'homéostasie énergétique et le contrôle qualité des protéines (Hoare et al. 2011). Pendant la sénescence, des marqueurs de l'autophagie sont induits : surexpression de MAP1LC3, autophagosome visible en microscopie électronique (Young et al. 2009; Wiel 2014). Par ailleurs, l'autophagie contribuerait à l'arrêt du cycle



cellulaire et à la sécrétion de certains constituants du SASP (Young & Narita 2009) ou à dégrader certains fragments chromatinien rejetés dans le cytoplasme (A. Ivanov et al. 2013). En dépit de ces découvertes où l'autophagie agit en tant que mécanisme de renforcement de la sénescence, le rôle de l'autophagie reste débattu. Son inactivation dans des MEF rend ces cellules plus sensibles à la sénescence (Wang et al. 2012). De plus, il a été montré qu'un processus autophagique pouvait provoquer la mort de kératinocytes sénescents et résistants à l'apoptose (Gosselin et al. 2009).

### 2.7 Modification de l'expression génique

Le profil d'expression génique est fortement altéré lors de la sénescence. De nombreux régulateurs du cycle cellulaire sont perturbés. On observe notamment la répression de gène E2F1 et de gènes codant pour des protéines favorisant la progression du cycle cellulaire : cyclines, PCNA, c-Fos, MCM6, etc. (Mason et al. 2004). Lors de la mise en place de la sénescence, l'expression des CDKIs p16<sup>INK4A</sup>, p21<sup>CIP1</sup> et p14<sup>ARF</sup> peuvent être ainsi que plusieurs voies de signalisation suppresseur de tumeurs : p53, p16-Rb que nous détaillerons dans la partie 3 du chapitre 1. (Te Poele et al. 2002; Collado et al. 2005; Baker et al. 2011; Serrano, Lin, McCurrach, et al. 1997; Stein et al. 1999). Cependant, nombre de gènes impactés par l'entrée en sénescence ne concernent pas le cycle cellulaire. C'est notamment le cas des gènes codant pour les facteurs du SASP (senescence associated secretory phenotype) (Trougakos et al. 2006), ces gènes codent pour des protéines sécrétées par les cellules sénescents. Ce phénotype sécrétoire est décrit en détail dans la partie 4 du chapitre 1.

L'étude de l'expression génique en sénescence a mis en évidence le rôle des microARNs (Noren Hooten et al. 2010). La surexpression de microARNs influencerait plusieurs mécanismes, de la répression du cycle cellulaire par miR-21 ou Let-7 (Dellago et al. 2013; Moussa Benhamed, Utz Herbig, Tao Ye 2012) à la régulation du stress oxydant par miR-335 (Bai et al. 2011) en passant par le contrôle de l'inflammation par miR-21, -126 and -146a (Olivieri et al. 2013).

### 2.8 Autres marqueurs de reconnaissance d'une cellule sénescence

Parmi les caractéristiques présentées jusqu'ici, il est important de préciser qu'aucune individuellement ne permet d'identifier une cellule sénescence que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.

Malgré son utilisation très populaire, l'activité SA-B-Gal est également présente dans des cellules en quiescence induite par contact ou par privation de sérum. En l'absence de biomarqueurs fiables, c'est la présence simultanée de plusieurs marqueurs qui se doit d'être privilégiée.

En plus des marqueurs suscités, d'autres marqueurs comme l'induction de Dec1 (Deleted oesophageal Cancer 1) et DcR2 (Decoy Receptor 2) sont valables *in vitro* et *in vivo* (Collado et al. 2005) tout comme WNT16B pour la sénescence répliquative ou

induite par l'oncogène Ras (Binet et al. 2009) ou encore Sprouty2 (Courtois-Cox et al. 2006).

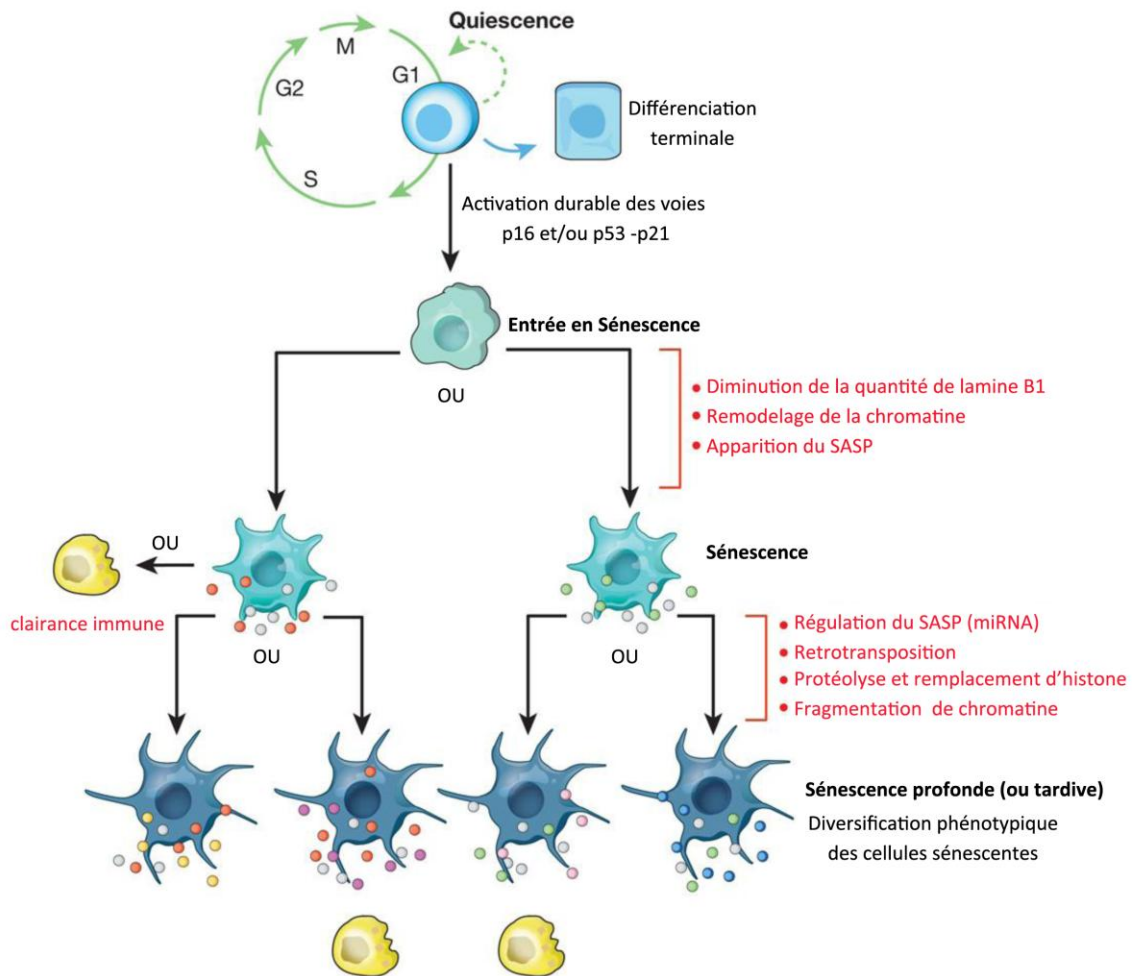
Une alternative à la SA-B-Gal, parfois difficile à détecter techniquement dans les tissus âgés est la présence d'agrégats de lipofuscine (Georgakopoulou et al. 2013). De nombreuses études présentent également un changement de morphologie du noyau dû à la diminution de l'expression de la lamine B1 en sénescence (Freund et al. 2012; Sadaie et al. 2013; Shah et al. 2013)

Enfin, l'activation des kinases ERK1 et ERK2 lors de la mise en place de la sénescence engendre une dégradation ciblée de protéines phosphorylées nécessaires à la prolifération cellulaire. On parle alors de SAPD (Senescence-associated Protein degradation). La dégradation de ces molécules par le protéasome contribuerait à la sénescence que celle-ci soit induite par l'activité d'oncogène ou par le raccourcissement des télomères. (Deschênes-Simard et al. 2013)

## 2.9 Processus dynamique

Des études récentes ont montré que la sénescence ne pouvait se définir comme une finalité en soi mais plutôt comme une série d'états phénotypiques apparaissant progressivement après l'arrêt prolifératif initial. (De Cecco et al. 2013; Wang et al. 2011; a. Ivanov et al. 2013). L'hypothèse actuellement supportée définirait la sénescence comme un processus dynamique durant lequel les propriétés des cellules sénescents continuent à évoluer et à se diversifier selon le type cellulaire et l'inducteur initial. Une des premières étapes est le passage d'un arrêt transitoire du cycle cellulaire à un arrêt stable (**figure 5**).

*In vitro*, des cellules peuvent entrer en sénescence en quelques jours après l'induction par un stress mais reste viable pendant plusieurs mois (De Cecco et al. 2013) et atteignent alors un stade de sénescence dit profond ou tardif. Parmi les phénotypes les plus tardifs à apparaître, on retrouve une hausse de la transcription d'éléments transposables comme les membres des familles de transposons L1, ALU et SVA (De Cecco et al. 2013; Wang et al. 2011) ou l'extrusion dans le cytoplasme de fragments de chromatine cytoplasmique (CCFs) enrichis en H3K27me3 et  $\gamma$ H2AX (a. Ivanov et al. 2013). Ces fragments subissent une protéolyse par les lysosomes, ce qui serait à l'origine d'une perte globale des histones.



**Figure 5. La sénescence est un phénomène dynamique.**

La première étape de la sénescence est caractérisée par l'arrêt prolifératif résultant de l'activation des voies p16<sup>INK4A</sup> et p53-p21. L'étape suivante est caractérisée par la diminution de l'expression de la lamine B1, un remaniement de la chromatine et l'expression du SASP. Certains composants de ce dernier sont particulièrement bien conservés (points gris) mais ils peuvent varier selon la nature de l'inducteur de sénescence ou le type cellulaire (points rouge et vert). La progression jusqu'à un état de sénescence tardif semble être régulée par d'autres processus génétique et épigénétique tels que l'expression de transposons, l'extrusion de fragments de chromatine et la protéolyse d'histones. Là encore, le SASP continue de se différencier (points jaunes, magenta, roses et bleues). Adapté de Van Deursen, 2014.

### 3. Principales voies de signalisation, d'induction et de contrôle

Deux voies majeures contrôlent l'induction et la maintenance de la sénescence. Une de ces voies implique les protéines p53 et p21<sup>Cip1</sup> tandis que la seconde implique p16<sup>INK4A</sup> et la protéine du rétinoblastome (pRb). Ces deux voies interagissent de manière extensive entre elles pourtant elles seraient en mesure de stopper le cycle cellulaire de manière indépendante. L'activation de ces régulateurs semblent être tissu-spécifique, espèce-spécifique et dépendante de l'inducteur initial de la sénescence (Olsen et al. 2002; Campisi & d'Adda di Fagagna 2007).

### 3.1 La voie p53

Cette voie est particulièrement bien connue en raison de la mutation du gène codant pour p53 qui existe dans près de la moitié des cancers (Levine 1997). Cette protéine est l'inducteur privilégié de la sénescence dans les cas d'attrition télomérique ou de radiations ionisantes. Comme vu précédemment, p53 est activé par les molécules de signalisation des dommages à l'ADN (ATM/CHK2, ATR/CHK1) qui provoque sa phosphorylation (Atadja et al. 1995; Vaziri et al. 1997; Bunz et al. 1998).

La phosphorylation de p53 conduit à l'expression de la CDKI p21<sup>CIP1</sup> qui va provoquer un arrêt transitoire du cycle cellulaire, le plus souvent, en fin de phase G1 (Stein et al. 1999). On peut d'ailleurs empêcher l'induction de la sénescence en bloquant l'expression de p21<sup>CIP1</sup> (Wade Harper et al. 1993).

P21 agit en se liant à CDK2 et aux cyclines A, D1 et E empêchant, dans la majorité des cas, la formation de complexes cyclines-CDKs et entraînant l'arrêt du cycle en phase G1-S. Il est toutefois possible dans certains cas de bloquer le complexe B-CDK1 et de bloquer les cellules en phase G2/M (Lossaint et al. 2011). P21<sup>CIP1</sup> est également connu pour interagir avec la voie du rétinoblastome (Rb) en favorisant l'accumulation d'une forme hypophosphorylée de pRb qui inhibe le facteur de transcription E2F par formation d'un complexe pRB/E2F. (Zhang et al. 1999), ce qui aboutit à la répression des gènes cibles de E2F impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Ohtani et al. 1995). (figure 6)

Une fois l'entrée en sénescence effectuée, l'expression de p21<sup>CIP1</sup> diminue rapidement (Stein et al. 1999). L'importance de cette voie a été mise en évidence par l'inhibition de l'activité de p53, p21 ou de différentes protéines des voies ATM/ATR qui permet un échappement de l'arrêt prolifératif (Herbig et al. 2004; di Fagagna et al. 2003; Di Micco et al. 2006; Brown et al. 1997; Gire et al. 2004).

Malgré l'importance de p53 et des voies de signalisation des dommages à l'ADN, des études ont montré qu'il est possible d'induire la sénescence sans activation des DDR et sans impliquer p53 (Efeyan et al. 2009; Alimonti et al. 2010).

### 3.2 La voie p16<sup>INK4A</sup>/pRb

A l'instar de p15<sup>INK4B</sup> et p14<sup>ARF</sup>, p16<sup>INK4A</sup> est un suppresseur de tumeur codé par le locus INK4B/INK4A/ARF. Dans certains cancers, cette protéine est mutée, délétée ou son promoteur est méthylé, ce qui provoque son inactivation. Cependant, sa seule inactivation n'est pas suffisante pour induire la tumorigénèse.

P16<sup>INK4A</sup> joue cependant un rôle important dans la sénescence (Stein et al. 1999; Itahana et al. 2003). Sa régulation n'est pas sous le contrôle de p53 mais de la voie RAS-RAF-MEK-ERK dans les fibroblastes et les mélanocytes humains et murins (Serrano, Athena W. Lin, et al. 1997; Lin et al. 1998). Le facteur de transcription Ets2 intervient dans la régulation de l'expression de p16<sup>INK4A</sup>. Ce facteur de transcription est lui-même phosphorylé par ERK et p38MAPK en réponse à l'activation de Ras. P16<sup>INK4A</sup>

peut également être réprimé par les complexes polycomb (PRC) (Jacobs et al. 1999; Gil et al. 2004).

L'affinité d'interaction de p16<sup>INK4A</sup> pour les complexes cyclines-CDK4/6 permet un enrichissement de pRb sous forme hypophosphorylée favorisant la formation du complexe pRB/E2F (Lukas et al. 1995) (**figure 6**).

Dans la majorité des cas, l'arrêt prolifératif est induit par p21 *via* p53 mais l'expression de p21 diminue après l'induction de la sénescence. P16<sup>INK4A</sup> jouerait donc un rôle de relais rendant cette protéine responsable de l'arrêt prolifératif à long terme.

### 3.3 La voie P14<sup>ARF</sup> et l'activation de p53

P53 est régulé par HDM2, une protéine qui interfère avec la capacité de p53 à activer ses gènes cibles en se liant à son extrémité N-terminal. Elle le délocalise alors dans le cytoplasme et provoque son ubiquitinylation aboutissant à la dégradation de p53 par le protéasome (Haupt et al. 1997).

P14<sup>ARF</sup> est le résultat d'un cadre de lecture alternatif du locus INK4A/INK4B/ARF. C'est une protéine capable d'interagir avec HDM2 et donc de supprimer l'inhibition de p53 par p14<sup>ARF</sup> (Weber et al. 1999; Kamijo et al. 1998).

Sur un modèle murin n'exprimant pas p19<sup>ARF</sup> (version murine de p14<sup>ARF</sup>), les souris développent plus de tumeurs, suggérant un rôle suppresseur de tumeurs semblables à p16<sup>INK4A</sup>. Chez les souris, l'activation de la voie p19<sup>ARF</sup>/p53 permettant l'entrée des cellules en sénescence est souvent privilégiée (Lowe & Sherr 2003; Sharpless 2005). Cette voie semble pourtant moins prépondérante chez l'humain (Kamijo et al. 1997; Wei et al. 2001; Dimri et al. 2000). De la même façon, dans des MEFs mais pas dans des cellules humaines, l'activation d'oncogènes tels que Ras conduit à l'activation de p14<sup>ARF</sup> (Wei et al. 2001; Gil & Peters 2006; Brookes et al. 2002).

### 3.4 Acteurs du maintien de la sénescence.

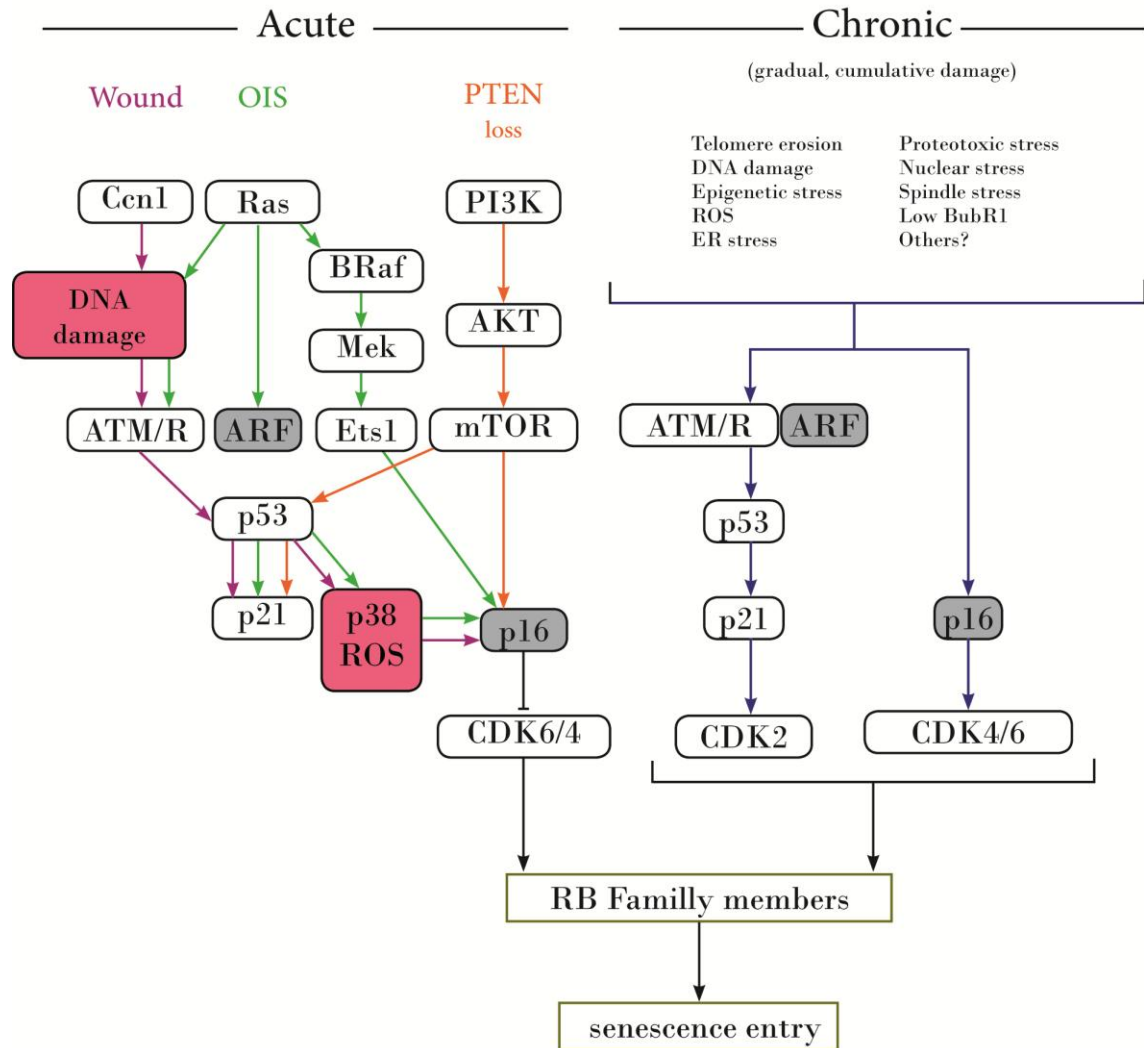
Une fois la sénescence établie par l'activité des voies p53/p21<sup>CIP</sup> ou p16<sup>INK4A</sup>/pRb, l'arrêt prolifératif est apparemment irréversible. La reprise de la progression du cycle cellulaire ne semble plus abrogée par l'inactivation de Rb ou p53 (Sharpless & DePinho 2005; Dai & Enders 2000). Les études préliminaires sur p16<sup>INK4A</sup> et BRAF semblaient d'ailleurs confirmer ce constat (Kato et al. 1998; Zhu et al. 1998).

Or, plusieurs équipes ont montré qu'il est possible de provoquer un échappement de la sénescence dans certaines conditions. L'inactivation de la protéine du Rb ou de p53 permet la réversion du phénotype sénescents dans des MEFs sénescents. (Sage et al. 2000; Dirac & Bernardis 2003; Dannenberg et al. 2000). Ces données suggèrent que ces protéines sont importantes dans l'entrée en sénescence mais également dans le maintien de cet état.

Il est également possible de constater une réversion de la sénescence en provoquant l'inactivation des voies p16<sup>INK4A</sup> dans des fibroblastes BJ ou en bloquant la sécrétion de certaines interleukines du phénotype sécrétoire nommé SASP (Senescence Associated

Secretary Phenotype) (Beauséjour et al. 2003; Kuilman et al. 2008). L'inactivation de certains inhibiteurs de CDKs (comme p16<sup>INK4A</sup> ou p21) peuvent renverser la sénescence dans des cas de sénescence induite par RAF dans des cellules WI-38 (Jeanblanc et al. 2012).

Aussi, certains composants du SASP (e.g. IL6, IL8, WNT16B, GRO- $\alpha$ ) sont en mesure de renforcer l'arrêt irréversible du cycle cellulaire de manière autocrine (Binet et al. 2009; Kuilman et al. 2008; Yang et al. 2006).



**Figure 6. Voie d'induction et effecteurs de la sénescence.**

La sénescence aiguë (Acute) est bénéfique pour l'organisme car elle participe à la prévention de la tumorigénèse et à la réparation des tissus. In vivo, ces cellules sont rapidement éliminées par le système immunitaire. Ce cas contraste avec la sénescence induite par des dégâts macromoléculaires s'accumulant lentement avec l'âge (chronic) tels que l'attrition des télomères, les dommages à l'ADN ou divers stress. Adapté de Childs BG, 2015.

## 4. Composition, régulation et signalisation du SASP

En étudiant le surnageant de cellules sénescents, on peut remarquer la sécrétion de plusieurs facteurs impliqués dans de nombreux processus allant de la dégradation de la matrice extracellulaire, à la communication intercellulaire en passant par la sécrétion de molécules inflammatoires. On parle alors de Senescence Messaging Secretome (SMS) (Kuilman & Peeper 2009).

### 4.1 Composition du SASP

Les premières analyses transcriptomiques réalisées sur les composants du SASP ont mis en évidence un profil semblable à celui que l'on retrouve lors de la réparation de tissus (Shelton et al. 1999). Une analyse protéomique réalisée sur plusieurs profils de sénescence révèle des profils semblables entre les divers types de sénescence malgré la présence de protéines semblant être spécifiques au type cellulaire ou à l'inducteur de sénescence utilisé (Dierick et al. 2002).

Des études plus poussées furent réalisées par l'équipe du Docteur Campisi et ont permis la comparaison de plusieurs sécretomes issus de deux types cellulaires (fibroblastes, cellules épithéliales) induits par plusieurs stimuli (Coppé et al. 2008). En utilisant une méthode de réseau d'anticorps, cette étude permit une analyse quantitative du SASP. Les résultats montrent une importance de l'induction des voies de réponse aux dommages à l'ADN car de nombreuses cellules soumises à des dommages à l'ADN (incluant des cellules tumorales) peuvent produire un SASP sous la condition que les dommages induisent une réponse suffisamment forte et durable.

Malgré les différences quantitatives et qualitatives observées, de nombreuses molécules sont sécrétées quel que soit le type cellulaire dans les SASPs étudiées. L'influence de l'espèce ne semble, en revanche, pas primordiale car des fibroblastes murins induits en sénescence sont en mesure de produire un SASP ressemblant à celui de fibroblastes humains. (Coppé et al. 2010)

Plusieurs catégories de molécules composent le SASP :

#### 4.1.1 Les cytokines et les chemokines

La protéine la plus représentative de ce groupe est IL6. Cette interleukine pleiotropique est retrouvée dans le SASP, que ce soit après l'induction d'une sénescence par un oncogène ou des dommages à l'ADN, et dans des lignées de kératinocytes, monocytes, fibroblastes ou des cellules épithéliales humaines ou de souris (Kuilman et al. 2008; Green 2008; Lu et al. 2006; D. Sarkar et al. 2004). On retrouve également IL1 ( $\alpha$  et  $\beta$ ) surexprimés dans des cellules endothéliales, des fibroblastes ou des cellules épithéliales induites par chimiothérapie (TIS) (Shah et al. 2013; Chang et al. 2002; Maier et al. 1990; Kumar et al. 1993). On retrouve également des chemokines de la famille des CXCL (chemokine CXC motif ligand) et CCL (chemokine C-C motif ligand) tel qu'IL8 (CXCL8), GRO- $\alpha$  ou GRO- $\beta$  (CXCL1 et CXCL2) ou

encore GCP-2(CXCL6) ENA-78 (CXCL5)(Sarkar et al. 2004; Castro et al. 2003; Bode-Böger et al. 2005; Bavik et al. 2006; Begley et al. 2005).

Enfin, on retrouve des cytokines inflammatoires telles que les CSFs (colony stimulating factors) GM-CSF et G-CSF sont fortement sécrétés par des fibroblastes sénescents (Coppé et al. 2008).

Ces cytokines peuvent affecter les cellules environnantes en activant les voies de signalisation dépendantes des récepteurs de ces ligands tels que le récepteur d'IL1 faisant partie de la superfamille des TLR (Toll-like Receptor). Ce récepteur provoque l'activation de NF $\kappa$ B, un facteur de transcription activant l'expression de gènes d'inflammation. (Balkwill & Mantovani 2001). De nombreuses cytokines/chemokines du SASP peuvent également se fixer sur le récepteur CXCR2. Il a d'ailleurs été proposé que cette voie serve à renforcer la sénescence en amplifiant la sécrétion du SASP et en participant à l'arrêt prolifératif (Acosta, O'Loghlen, Banito, Raguz, et al. 2008).

#### **4.1.2 Les facteurs de croissance**

Parmi les facteurs les plus représentés dans le SASP, on retrouve la famille IGFBP (insulin-like growth factor binding protein). Des cellules endothéliales, épithéliales et des fibroblastes sénescents expriment des hauts niveaux d'IGFBPs (-2,-3,-4,-5,-6,-7, -rP2) (Coppé et al. 2008; Dellago et al. 2013; Wajapeyee et al. 2008; Kim, Kim, et al. 2007; Kim, Seu, et al. 2007) ainsi que des molécules régulatrices comme les CTGF (connective tissue growth) qui sont connus pour promouvoir l'angiogénèse et la tumorigénèse dans le tissu prostatique (Yang et al. 2005). On retrouve également VEGF (vascular endothelial growth factor) (Coppé et al. 2006) ou HGF (hepatocyte growth factor)(Ohuchida et al. 2004).

#### **4.1.3 Les protéases**

On retrouve beaucoup de protéases dans le surnageant de cellules sénescents notamment appartenant à la famille des MMPs (matrix metalloproteinases). Parmi cette famille, les plus représentatives dans le SASP sont la stromelysine 1 et 2 (MMP-3 ; MMP-10) et la collagénase MMP-1 (West et al. 1989; Millis et al. 1992; Parrinello et al. 2005; Liu & Hornsby 2007) qui sont en mesure de moduler la structure de la matrice extracellulaire, favoriser l'angiogénèse voire le développement tumoral. Certaines MMPs sont également capables de réguler l'activité de certains facteurs du SASP en les protéolysant : des membres de la famille des CXCL OU CCL sont potentiellement clivables par MMP-2, MMP-7 ou MMP-9 (McQuibban et al. 2002).

Une autre classe de protéases surreprésentées dans le SASP est la famille des sérine-protéases, les inhibiteurs de ces dernières et les urokinases activatrices de la voie d'activation du plasminogène. On retrouve en effet des uPA, tPA (urokinase/tissue-type plasminogen activator) ou les inhibiteurs de sérine-protéases (PAI-1, PAI-2). Ces protéines ont pour effet de réguler positivement la voie d'activation du plasminogène. On retrouve d'ailleurs cette voie cinquante fois plus activée dans des fibroblastes sénescents pulmonaires ou dans des cellules endothéliales sénescents (Goldstein et



al. 1994; West et al. 1996). A l'instar des ligands de CXCR-2, PAI-1 semble avoir le même effet de renforcement de la sénescence (Kortlever & Bernards 2006).

#### **4.1.4 Les molécules non-protéiques**

Résultant des changements induits par la sénescence, de l'oxyde nitrique et des espèces réactives de l'oxygène se retrouvent dans le microenvironnement des cellules ou dans les tissus âgés (Lee et al. 1999; van der Loo et al. 2000). Cette sécrétion est due à une altération de l'activité des enzymes des voies de régulation du stress oxydant : nitric oxide synthases, endothelial nitric oxide synthases et superoxyde dismutases (Sato et al. 1993; Xin et al. 2003).

Ces molécules sont connues pour moduler de nombreux phénotypes cellulaires tels que la différenciation des monocytes. De plus, elles peuvent augmenter l'agressivité des cellules cancéreuses et promouvoir le vieillissement et les pathologies associées (Finkel & Holbrook 2000; Blasco et al. 2007).

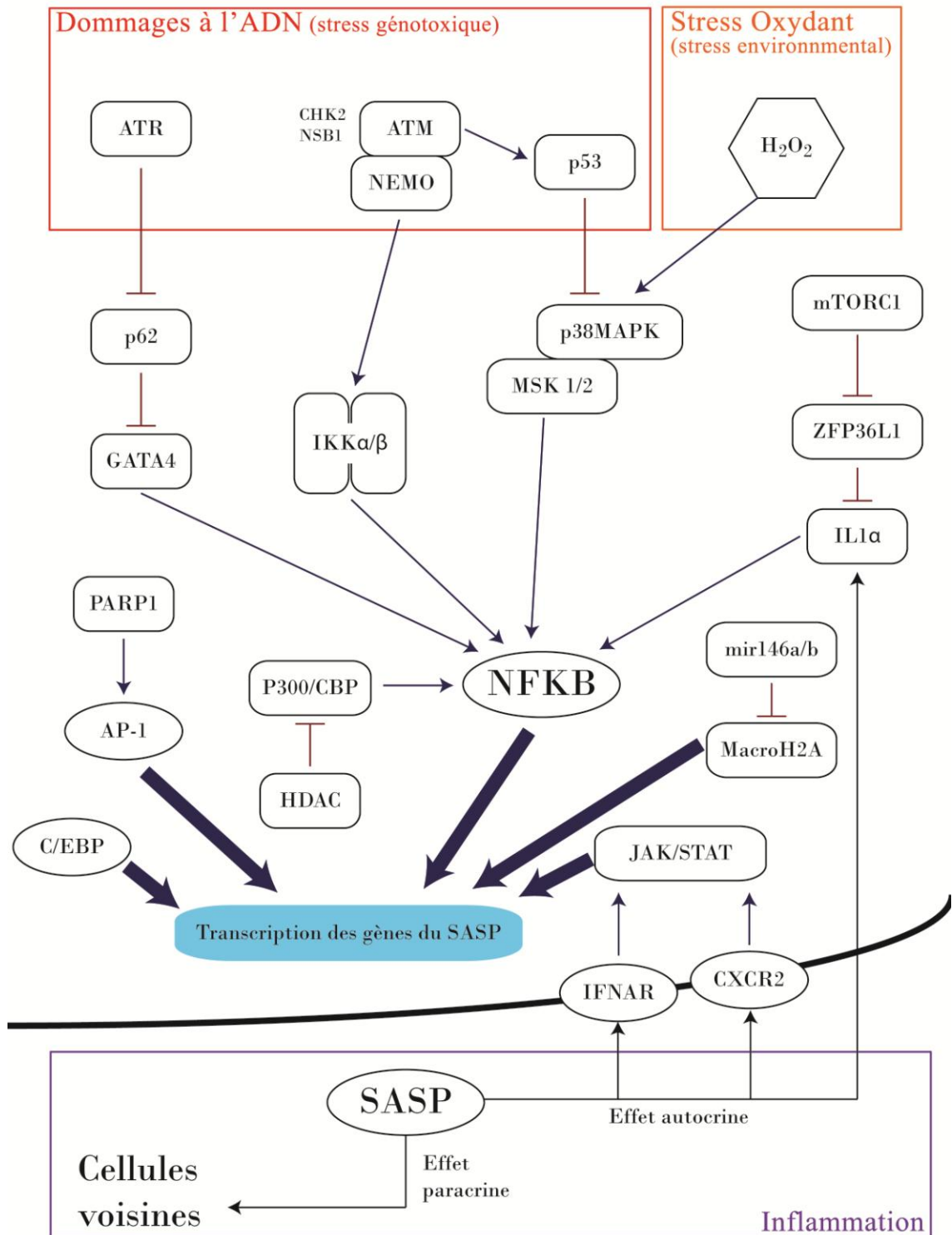
On retrouve également d'autres molécules intéressantes ; les cellules sénescents sont en effet en mesure de sécréter des exosomes contenant des protéines immunomodulatrices (B7-H3) et de l'information génétique sous la forme de esRNA (exosomal shuttle RNA) (Lehmann et al. 2008).

Bien que n'appartenant pas à ces catégories, la fibronectine est fortement exprimée en sénescence à la fois *in vitro* et *in vivo* (Rasoamanantena et al. 1994; Kumazaki 1993). Cette glycoprotéine est en mesure d'interagir avec une grande variété de macromolécules dont des récepteurs de la membrane cellulaire, des composants du cytosquelette et d'autres molécules de la matrice extracellulaire. La production de cette molécule affecte donc l'adhésion, la survie et la migration cellulaire.

#### **4.2 Les voies de régulation du SASP**

De manière globale, les profils d'expression des gènes codant pour les protéines du SASP sont en accord avec les profils de sécrétion desdites protéines (Coppé et al. 2008). Le phénotype sécrétoire est donc, au moins en partie, régulé au niveau transcriptionnel. Or, comme expliqué précédemment, des changements drastiques apparaissent dans la structure de la chromatine (Mehta et al. 2007; Narita 2007), le contrôle transcriptionnel peut donc tout à fait avoir lieu aussi bien au niveau de l'organisation de la chromatine qu'au niveau de changements dans la fixation de facteurs de transcription. Cette idée est renforcée par le regroupement physique (en cluster) des gènes codant pour le SASP (e.g. la famille des CXCL regroupés sur le chromosome 4).

Le SASP n'est pas une réponse rapide et transitoire comme peut l'être une réponse inflammatoire à un pathogène. Le SASP ne se développe pas immédiatement après le stimulus d'induction de la sénescence mais, une fois établi, le SASP perdure pendant une longue période (Coppé et al. 2008; Rodier et al. 2009). En outre, les voies d'activation de l'arrêt prolifératif durable de la sénescence ne sont pas exactement les mêmes voies qui induisent le SASP. Il a été montré que p53 est nécessaire pour l'arrêt



**Figure 7. Représentation simplifiée des différentes voies d'induction du SASP.**

L'induction du SASP dépend de nombreuses voies qui ne sont pas forcément toutes actives au même instant durant la sénescence. Il faut également noter la position centrale qu'occupe NFKB dans la dérégulation des gènes du SASP. Adapté de Kang, 2015 ; Danielle, 2013 ; Acosta JR, 2008 ; Salminen A, 2012 ; Freund, 2011 ; Tomimatsu, 2015.

prolifératif mais pas pour le SASP (Campisi & d'Adda di Fagagna 2007; Courtois-Cox et al. 2008). Et bien que l'on ne connaisse pas le mécanisme précis, des cellules ne possédant pas de p53 fonctionnel sont en mesure de sécréter des facteurs du SASP à des niveaux encore plus élevés, suggérant que p53 impacte négativement l'expression du SASP (Coppé et al. 2008).

Il apparaît, néanmoins, que l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN soit un prérequis pour la production du SASP (Rodier et al. 2009) avec l'activation de NFκB par ATM. La répression d'ATM, NSB1 ou encore CHK2 prévient effectivement la formation du SASP.

Malgré cela, une induction transitoire de cette voie n'est pas suffisante pour induire le SASP. Il faut en effet plusieurs jours avant de pouvoir constater l'apparition du SASP alors que la voie DDR s'active dès l'apparition des dommages. Une autre voie implique l'activation de p38MAPK (mitogen-activated protein kinase). Cette kinase est activée par phosphorylation lors de certains stress cellulaires (Cuenda & Rousseau 2007). Son inactivation retarde la mise en place de la sénescence répliquative (Iwasa et al. 2003) et la mise en place de la sénescence chez des patients atteints du syndrome de Werner, une pathologie caractérisée par un vieillissement accéléré des cellules (progeria) (Davis & Kipling 2009). La voie impliquant p38MAPK agit en parallèle de la voie des DDR et semble être nécessaire et suffisante pour induire le SASP. Ni ATM ni CHK2 ne peut phosphoryler p38MAPK et réciproquement l'activation de p38MAPK n'induit pas l'activation d'ATM ou CHK2. Selon toute vraisemblance, l'effecteur en aval de p38MAPK serait NFκB (Freund et al. 2011a) (**figure 7**).

D'autres voies et facteurs de transcription ont également été mis en évidence tels que C/EBP (Acosta, O'Loghlen, Banito, Guijarro, et al. 2008), la voie JAK/STAT ou des modifications de la chromatine comme l'implication de H3K9me2 (Takahashi et al. 2012), macroH2A1 (Chen et al. 2015) ou l'histone H3K4 méthyltransferase MLL1 (Capell et al. 2016).

### 4.3 Effet autocrine et paracrine du SASP

Les facteurs sécrétés par le SASP peuvent dans un premier temps, affecter les cellules sénescents elles-mêmes selon un mode d'action autocrine. C'est le cas pour diverses cytokines comme IL6 (Kuilman et al. 2008) ou IL8 (Acosta, O'Loghlen, Banito, Raguz, et al. 2008) pour PAI-1 (Kortlever & Bernards 2006) ou les facteurs de croissance IGFBP5 et IGFBP7 (Kim, Kim, et al. 2007; Wajapeyee et al. 2008).

Cet effet autocrine agit principalement pour renforcer le phénotype sénescents avec un effet sur la production du SASP et l'arrêt prolifératif. De cette façon, une boucle de rétroaction positive s'établit et accroît la quantité de molécules sécrétées avec le temps et permet d'établir la sénescence à long-terme. Bloquer cette boucle permet notamment l'échappement du phénotype sénescents (Acosta, O'Loghlen, Banito, Guijarro, et al. 2008; Kuilman et al. 2008). Cependant, ces molécules ont également un

effet sur le microenvironnement des cellules sénescents et affectent d'autres types cellulaires.

La variété de types cellulaires affectés par le SASP dépend de l'environnement tissulaire. (Lu et al. 1992; Kuilman et al. 2008). Les cellules voisines des cellules sénescents peuvent être des cellules normales, des cellules non-différenciées, des cellules cancéreuses ou même des cellules faisant partie du système immunitaire.

Les effets du SASP peuvent parfois être contradictoires mais l'on peut les diviser en plusieurs catégories :

#### **4.3.1 Les effets délétères du SASP**

Bien que la sénescence ait avant tout été découverte comme un processus anti-tumorigène, de nombreuses publications ont mis en évidence que certains facteurs du SASP ont des effets favorisant le développement tumoral. Ses effets peuvent porter sur la prolifération (Krtolica et al. 2001; Capell et al. 2016) ou le développement précoce de tumeurs en xénogreffes (Liu & Hornsby 2007). Beaucoup de mélanomes expriment également le récepteur CXCR2 (Dhawan & Richmond 2002). La proximité de cellules sénescents favorise donc leur développement (Balentien et al. 1990; Schadendorf et al. 1993).

D'autres effets portent sur l'impact du SASP sur l'angiogénèse, la prolifération indépendante de l'adhérence (Rinehart et al. 1999), et la perturbation de la matrice extracellulaire qui améliore le caractère invasif des tumeurs (métastases) et la transition épithélio-mésenchymateuse (Coppé et al. 2008). Enfin, ont pu être constatés des effets sur la résistance à la chimiothérapie (Canino et al. 2012) ou encore la perte de structure et de fonction de certains tissus (Parrinello et al. 2005) pouvant favoriser le développement de pathologies souvent observées dans les tissus vieillissants (glaucome, fibrose, athérosclérose, etc.) (Naylor et al. 2012).

#### **4.3.2 Les effets bénéfiques du SASP**

Comme expliqué précédemment, le sécrétome qu'est le SASP ressemble à celui que l'on retrouve lors d'une crise inflammatoire et plus particulièrement une blessure (Shelton et al. 1999). Certaines protéines du SASP peuvent présenter des effets immunomodulateurs. Une étude réalisée par l'équipe du Docteur Lowe (Xue et al. 2007) met en évidence, *in vivo*, l'effet chémoattractant des cellules sénescents sur les macrophages, les neutrophiles et les cellules NK (natural killer). Cela conduit en général en la clairance des cellules sénescents et des cellules dysfonctionnelles environnantes comme les cellules cancéreuses.

De manière similaire, cette communication avec le système immunitaire permet de protéger contre d'autres pathologies. L'utilisation d'agents hépatotoxiques conduit à l'induction de la sénescence et à la formation de fibroses. Dans des souris dont les gènes p53 et INK4A/ARF ont été délétés, souris dont les cellules ne peuvent entrer en sénescence, ces agents hépatotoxiques provoquent des cirrhoses bien plus sévères. La

présence de cellules sénescents dans un tissu facilite donc l'immunosurveillance et réduit la gravité de certaines pathologies (Krizhanovsky et al. 2008).

## 5. Le rôle de la sénescence *in vivo*

### 5.1 La sénescence est un mécanisme suppresseur de tumeurs

L'un des rôles les plus connus et documentés de la sénescence est son effet suppresseur de tumeurs. En effet, les cellules sévèrement stressées peuvent potentiellement entamer un processus d'oncogénèse. Leur entrée en sénescence prévient donc le développement de cancer (Campisi 2001; Rodier et al. 2010). Cette idée est renforcée par le fait que les mutations les plus fréquentes dans les cancers concernent les gènes p53 et p16<sup>INK4A</sup> (Beauséjour et al. 2003; Shay et al. 1991), que des cellules sénescents se retrouvent souvent localisées au niveau de lésions bénignes (Braig et al. 2005; Yu et al. 2015; Chen et al. 2005; Collado et al. 2005; Michaloglou et al. 2005) et la surexpression de certains oncogènes peuvent conduire à l'induction de la sénescence.

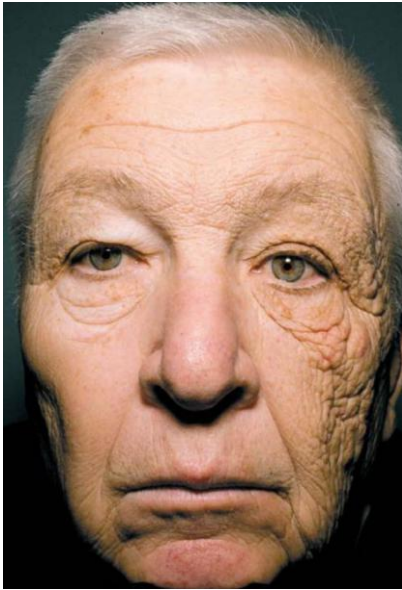
### 5.2 La sénescence est un processus nécessaire à l'homéostasie et au développement

La sénescence peut parfois apparaître en réponse à un stress spécifique et, à terme, les cellules sénescents sont alors destinées à être éliminées.

On peut observer ce genre de cas lors de la réparation des tissus après une blessure (Jun & Lau 2010), dans les lésions néoplasiques (Dhomen et al. 2009), dans les neutrophiles du placenta (Rajagopalan 2014) ou pendant l'embryogénèse. Ce type de sénescence, à l'instar de l'apoptose, agit dans la structuration des tissus. Ces cas sont vraisemblablement bénéfiques pour l'organisme et les cellules sénescents y semblent vouées à disparaître à travers l'action du système immunitaire (Kang et al. 2011).

### 5.3 L'impact de la persistance des cellules sénescents dans les tissus

Il semblerait que les cellules sénescents s'accumulent dans l'organisme avec l'âge. Ce lien entre vieillissement et sénescence fut mis en évidence dans les tissus mitotiques humains (Dimri et al. 1995) et ceux de primates non-humains (Herbig et al. 2006; Jeyapalan et al. 2007). Au contraire des cas développés ci-dessus, cette accumulation de cellules sénescents est plus délétère pour le tissu car elle résulte d'une accumulation sur le long-terme de dommages macromoléculaires. A titre d'exemple, l'irradiation (thérapeutique ou naturel) et la chimiothérapie causent des dommages significatifs sur les tissus exposés causant l'apparition d'un phénotype de vieillissement prématuré que l'on retrouve chez les patients en rémission ou les individus atteints de photovieillissement (ou dermatoheliosis) (Ness et al. 2015; Marcoux et al. 2013; Wlaschek et al. 2001) (**figure 8**).



**Figure 8. Photographie d'un conducteur de poids-lourds atteint de dermatoheliosis (ou photovieillissement)**

*La face gauche de son visage a subi une exposition plus importante aux UV (rayons ionisants pouvant causer des dommages à l'ADN) durant de nombreuses années. Ce qui a provoqué un vieillissement prématuré de cette zone du visage. (Gordon & Brieva 2012)*

---

#### **5.4 La sénescence dans les maladies liées à l'âge**

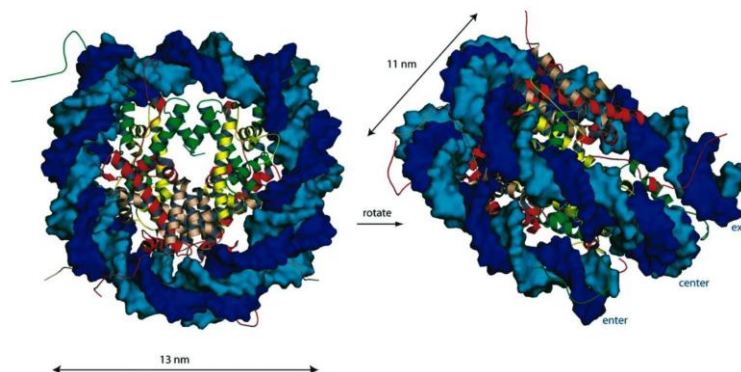
Cette rémanence de cellules sénescentes perturbe l'homéostasie tissulaire et peut directement ou indirectement faciliter le développement de certaines pathologies. Dans certains cas, la perte de la capacité à proliférer peut être responsable de la formation de glaucome (Liton et al. 2005), de cataracte (Baker et al. 2011), du diabète pancréatique (Palmer et al. 2015) ou de l'arthrite osseuse (Martin et al. 2004). L'inflammation causée par le SASP pourrait jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose (Minamino et al. 2002), du diabète de type 2 (Shimizu et al. 2014) et les pathologies cancéreuses (Thangavel et al. 2011). Enfin, les protéases du SASP impactant la matrice extracellulaire joueraient un rôle clé dans la propagation de maladies telles que la fibrose pulmonaire (Chilosi et al. 2013) ou hépatique (Kong et al. 2012).

## Chapitre 2 : Dynamique de la chromatine

Dans la cellule eucaryote, la chromatine est un mélange hautement complexe d'ADN et de protéines qui est impliquée dans la régulation et la coordination de l'expression des gènes. En réponse à des stimuli externes, des changements dans la structure de la chromatine peuvent engendrer une modulation de l'activité des gènes sans altérer la structure primaire de l'ADN (Sung & Amasino 2004). Ces modifications pourraient posséder un caractère héréditaire et contribuent ainsi fortement aux mécanismes évolutifs (Imhof & Bonaldi 2005). Le terme d'épigénétique, qui regroupe ces modifications, définissait originellement l'ensemble des événements responsables de la mise en place du programme génétique. Aujourd'hui, on sait que c'est un processus modulé par plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires. Les mieux décrits actuellement sont ceux qui agissent directement sur la chromatine en modifiant sa structure et/ou sa composition. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons tout particulièrement à la composition de la chromatine et aux histones. Je détaillerai, tout d'abord, l'organisation structurale du génome. Puis, je développerai les principaux facteurs épigénétiques.

### 1. La structure du nucléosome

Chez l'humain, la plupart des cellules de l'organisme partage le même matériel génétique codé par des molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN). La séquence de notre ADN est composée d'environ  $3.10^9$  paires de bases. Cette molécule possède une taille de 2 mètres bien supérieure à un noyau de  $5\mu\text{m}$ . L'ADN est en mesure d'être contenu dans le noyau des cellules car il existe un système de compactage qui associe ADN et protéines, ce qui forme la chromatine (Comings 1972). L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. 147 paires de bases d'ADN (soit 1,7 tours de la double hélice) s'enroulent autour d'un cœur protéique composé d'un octamère d'histones : un tétramère central (H3-H4)<sub>2</sub> flanqué de deux dimères H2A-H2B (**figure 9**). Le génome d'un mammifère compterait ainsi plus de  $1.10^7$  nucléosomes. (Richmond & Davey 2003)



**Figure 9. Structure atomique du nucléosome de *Xenopus Laevis*.**

Les brins d'ADN sont représentés avec deux teintes de bleu. H3 est représenté en vert, H4 en jaune, H2A en rouge et H2B en rose. L'ADN s'enroule autour de l'octamère d'histones pour former une structure en disque. (Khorasanizadeh 2004)

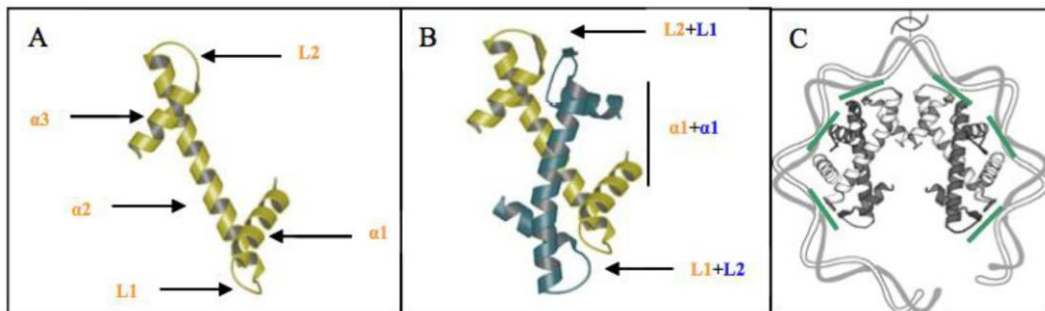
La structure du nucléosome a été résolue par cristallographie aux rayons X à 2,8Å (Luger et al. 1997) puis à 1,9 Å (Davey et al. 2002).

Chaque nucléosome est connecté par un segment d'ADN d'une taille variant de 20 à 80 paires de bases pour former des motifs répétitifs d'environ 200 paires de bases. Cette structure répétitive est stabilisée par l'histone H1 et d'autres facteurs pour former la structure en collier de perles d'un diamètre de 10 nm. (Olins & Olins 2003)

### 1.1 La composition du cœur histone

Les histones sont de petites protéines basiques (11 à 20 kDa) de point isoélectriques d'environ 11, fortement conservées au cours de l'évolution. Chaque histone présente un domaine globulaire ou HFD (histone fold domain) qui assure les interactions histone-histone ou histone-ADN ainsi qu'un domaine amino-terminal fortement acide qui s'étend au-delà du cœur histone et qui ne possède aucune structure secondaire (Gilbert & Ramsahoye 2005).

Le domaine HFD se compose de trois hélices ( $\alpha$ ) intercalées de deux boucles (L) :  $\alpha 1$  - L1 -  $\alpha 2$  - L2 -  $\alpha 3$  (**figure 10**). Il permet la formation des hétérodimères d'histones et les liaisons à l'ADN (Luger et al. 1997). Sur un hétérodimère, les motifs de repliement des histones sont placés de manière antiparallèle sur huit tours de l'hélice  $\alpha 2$  dans un même hétérodimère. La boucle L1 de l'une est juxtaposée avec la boucle L2 de l'autre histone. Ainsi, à chaque extrémité du dimère, se situe des motifs de liaison à l'ADN. Enfin, les deux hélices  $\alpha 1$  forment un domaine de liaison à l'ADN alors que les hélices  $\alpha 3$  n'ont aucun contact avec l'ADN (Luger et al. 1997). Les queues N-ter et C-ter sont, quant à elles, impliquées dans les interactions internucléosomiques et peuvent porter certaines modifications post-traductionnelles que nous détaillerons par la suite.



**Figure 10. Structure du cœur d'histones.**

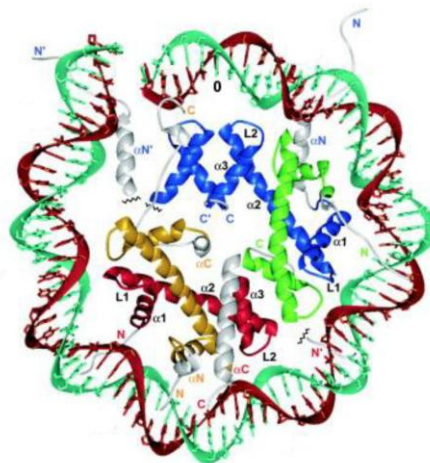
*Le domaine de repliement de toutes les histones suit l'enchaînement suivant :  $\alpha 1$  - L1 -  $\alpha 2$  - L2 -  $\alpha 3$ . B) L'hétérodimère forme trois points de contact avec l'ADN s'enroulant autour du nucléosome. C) Le tétramère forme donc un total de six points de contact avec l'ADN. (Harp et al. 2000)*

L'histone de liaison H1 possède une structure sensiblement différente. Elle possède un domaine globulaire hydrophobe et un domaine C-terminal riche en charge positive lui permettant de se lier à l'ADN (Lu & Hansen 2004). Le domaine globulaire, très conservé, est composé de trois hélices  $\alpha$  et d'un feuillet  $\beta$  en épingle à cheveux en c-ter. Ses extrémités C-ter et N-ter sont peu conservées et sont impliquées dans de nombreuses interactions protéines-protéines.



L'assemblage final du nucléosome se fait par l'interaction du tétramère (H2A-H2B)<sub>2</sub> sur (H3-H4)<sub>2</sub> pour former l'octamère (Arents & Moudrianakis 1995). Cet assemblage progressif permet des variations dynamiques de composition par incorporation de variants et d'histones modifiées (Zlatanova et al. 2009).

L'ADN interagit fortement avec les histones par de nombreuses interactions non covalentes comme des liaisons hydrogènes entre les acides aminés des histones et l'oxygène des groupements phosphates de l'ADN ou des interactions électrostatiques entre la charge globalement positive des histones et les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN. L'ADN nucléosomal peut être divisé en deux régions de 72 et 73 paires de base comprenant une base centrale appelée la dyade. Cet ADN interagit avec les protéines sur 14 zones construites à partir des régions décrites précédemment : L1L2 et  $\alpha 1$   $\alpha 2$  (Davey et al. 2002) plus deux sites de liaisons réalisés par les extrémités NH2 des histones H3 et H2B créant une symétrie de la molécule nucléosomale (Luger et al. 1997) (**figure 11**).



**Figure 11.** Structure d'une demi-particule du cœur d'histone avec une résolution de 1,9 Angstrom. Les brins d'ADN sont vert et rouge, l'histone H3 est en bleu. L'histone H4 en vert, l'histone H2A en jaune et H2B en orange.  
(Davey et al. 2002).

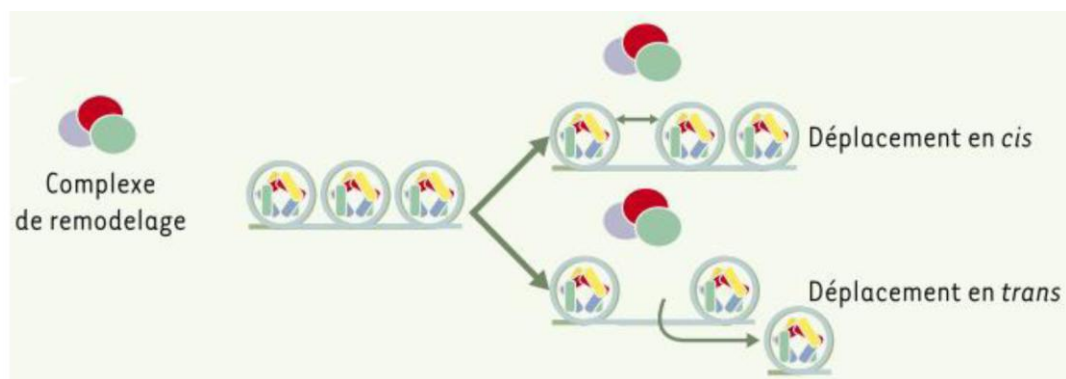
## 1.2 Dynamique du nucléosome et accessibilité de l'ADN

Lors de leur découverte dans les années 70, les nucléosomes étaient vus comme des structures statiques répétées à l'identique. Or, depuis, les biologistes sont arrivés à mettre en évidence que les nucléosomes sont composés de plusieurs familles de particules aux dynamiques différentes. En effet, la cellule est en mesure de remodeler la chromatine et de réguler, grâce à eux, de nombreux processus biologiques essentiels : transcription, réplication, réparation de l'ADN, etc.

Afin de moduler son activité, trois voies sont mis en œuvre par la cellule :

### 1.2.1 Le recrutement de complexes de remodelage du nucléosome

Cette voie met en jeu plusieurs familles de complexes de remodelage ATP-dépendants : ISWI (imitation switch), SWI/SNF (switching defective/sucrose non fermenting), Mi-2/CHD (chromodomain), INO80 (inositol requiring). (Clapier & Cairns 2009). Elles ont toutes en commun la présence d'une sous-unité ATPase nécessitant l'hydrolyse d'ATP pour modifier le positionnement de l'octamère d'histone par glissement ou transfert (Fry & Peterson 2001; Becker & Hörz 2002) et permettre ainsi d'augmenter ou de restreindre l'accès de facteurs régulateurs à leurs sites (**figure 12**). Ces facteurs sont présents chez tous les eucaryotes, ils sont impliqués dans de nombreux mécanismes comme la recombinaison homologue ou l'assemblage de la chromatine (Lusser & Kadonaga 2003; Tsukiyama 2002).



**Figure 12. Représentation schématique des modes de déplacement de l'octamère d'histone (cis ou trans) par un complexe de remodelage.** (Perche & Robert-nicoud 2013)

### 1.2.2 Les modifications post-traductionnelles des histones

Cette voie comprend de nombreuses modifications telles que l'acétylation ou la phosphorylation affectant le plus souvent les extrémités des quatre histones du cœur. Le lien pouvant être fait entre une modification type et un état fonctionnel a conduit au concept de « code histone » sur lequel nous reviendrons plus en détail dans la partie 3.2. (Strahl & Allis 2000).

### 1.2.3 L'incorporation des variants d'histones

Cette voie comprend l'intervention de variants d'histones dont les fonctions associées sont extrêmement variées : prolifération, différenciation, surveillance de l'intégrité du génome... Nous reviendrons également bien plus en détail sur les variants dans la partie 4.

A ces mécanismes, vient s'ajouter une dynamique d'enroulement spécifique des histones. En effet, les nucléosomes possèdent une activité dynamique spontanée dépendante de la séquence ADN. Sur un laps de temps de 300 ms lors d'expériences *in vitro*, l'ADN nucléosomal est en effet en contact avec les histones durant 250 ms avant

d'être déenroulé temporairement durant 10 à 50 ms pour atteindre à nouveau un état enroulé. (G. Li et al. 2005). *In vivo*, cette alternance entre un état d'enroulement complet ou plus ou moins partiel conduit à rendre l'ADN plus ou moins accessible à des protéines régulatrices qui vont interagir avec l'ADN.

## 2. Structure de la chromatine

Débuté par W. Flemming en 1880 lorsque ce dernier la nomma, l'histoire de la chromatine s'est poursuivie par l'observation du Docteur Heitz en 1928 de deux états fonctionnels correspondant à des degrés de condensation différents : une forme relâchée nommée euchromatine et une forme plus condensée nommée hétérochromatine (Passarge 1979).

Cet arrangement en états distincts impacte les activités fonctionnelles du noyau (Baxter et al. 2002).

De plus, la condensation de la chromatine varie au cours du cycle cellulaire. Pendant l'interphase, l'euchromatine est bien décondensée et dispersée dans tout le volume du noyau. Les gènes sont transcrits et l'ADN se réplique. Une partie de la chromatine interphasique conserve un état condensé, qui échappe à la transcription et contient des séquences ADN hautement répétitives semblables à celles des centromères et télomères. (Cremer & Cremer 2001).

Des études récentes ont révélé une plus grande complexité d'états en identifiant au moins cinq états de chromatines : deux types d'euchromatine et trois types d'hétérochromatine si l'on prend en compte les profils de modifications post-traductionnelles des histones et la composition en protéines architecturales (Filion et al. 2010).

### 2.1 L'euchromatine

Composée majoritairement de séquences codantes, l'euchromatine correspond à moins de 4% du génome de mammifères, c'est l'état de condensation le plus faible de la chromatine avec un diamètre de 10 nm.

En 1976, Finch et Klug firent l'observation, par microscopie électronique, de fibres de 30 nm obtenus à partir d'un repliement de fibres de 10 nm définissant ainsi un état de condensation plus élevé (Finch & Klug 1976). Ce modèle structural en « solénoïde », où les fibres sont agencées les unes à côté des autres, fut rapidement rejoint par un second modèle en « zig-zag » basé sur l'observation de nucléosomes isolés (Woodcock et al. 1984). Ce modèle définit les nucléosomes comme arrangés en zig-zag où chaque nucléosome 'n' est lié à son second voisin 'n+2' (Bassett et al. 2009). D'autres variations de cette structure ont également été proposées (voir (Maeshima et al. 2014) pour revue). Cependant, ces structures furent toujours observées *in vitro* et l'incapacité de retrouver ces structures *in vivo* (Dubochet & Sartori Blanc 2001; Bouchet-Marquis et al. 2006; Fakan & van Driel 2007) amène aujourd'hui à un changement de paradigme. Les observations les plus récentes amènent

vraisemblablement à penser que les régions chromatiniennes sont uniquement composées de fibres de 10 nm plus ou moins repliées sur elles-mêmes (Fussner et al. 2012).

## 2.2 L'hétérochromatine

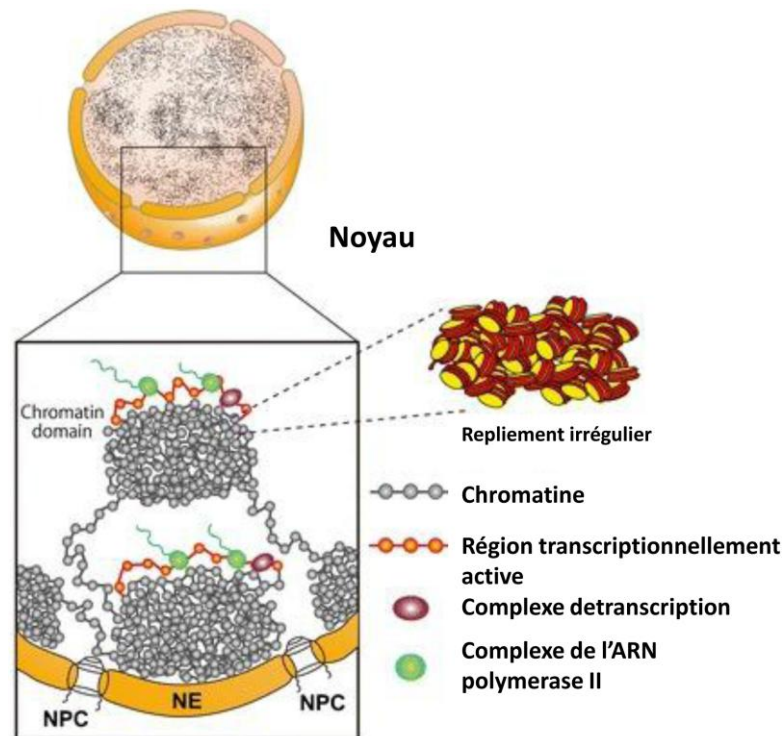
Habituellement localisée à la périphérie du noyau, l'hétérochromatine correspond à un état de condensation plus important des fibres de chromatine où le génome est peu exprimé. Il existe plusieurs variétés d'hétérochromatine : l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative (Babu et al. 1987). Toutes les cellules d'une espèce donnée possèdent les mêmes régions génomiques dans l'hétérochromatine constitutive ; ces régions sont connues pour être peu exprimées. Dans la plupart des organismes, cette hétérochromatine correspond aux régions centromériques, péricentromériques et télomériques. Elles sont riches en séquences satellites et en éléments transposables (Birchler et al. 2000). A contrario, l'hétérochromatine facultative correspond à des séquences différentes d'une cellule à l'autre dans un même organisme. Un exemple d'hétérochromatine facultative est l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez la femme.

Cette compaction de l'ADN fait intervenir de nombreux mécanismes, à la fois mécanique tel que le crowding macromoléculaire (Asakura & Oosawa 1954) ou des protéines spécifiques comme la cohésine (Nasmyth 2005; Hirano 2006), la condensine II (Ono et al. 2013), les protéines SC2 (scaffolding protein 2), HP1 (heterochromatin protein 1) et les lamines.

La condensation en hétérochromatine joue un rôle dans la régulation des gènes mais également dans la maintenance de l'intégrité du génome. (Falk et al. 2008) Il a notamment été montré que ces régions sont plus résistantes aux radiations ionisantes ou aux agents génotoxiques (Takata et al. 2013).

## 2.3 Domaines chromatiniens et territoires chromosomiques

Durant l'interphase, la fibre chromatinienne est capable de se lier aux lamines. Avec l'aide de protéines d'échafaudage (ex. : SC2), se forment des domaines chromatiniens en boucles larges de 300 à 700 nm qui peuvent aboutir à la formation de territoires chromosomiques (Cremer et al. 2000; Cremer & Cremer 2001). Les techniques récentes de Hi-C et 5C (chromosome conformation capture carbon copy) permettent d'explorer l'architecture 3D de l'ADN dans les cellules (Naumova et al. 2013) mettant en évidence la présence de régions physiquement riches et condensées en chromatine appelées TAD (topologically associating domains (Nora et al. 2012), domaines topologiques (Dixon et al. 2012) ou domaines physiques (Sexton & Cavalli 2015)(**figure 13**). De nombreuses données indiquent des corrélations entre les territoires chromosomiques et l'activation/répression des gènes (Misteli 2007) ou la réplication (Ryba et al. 2010). Nos connaissances concernant la régulation de ces structures sont encore parcellaires ; mais elle ferait intervenir des barrières génétiques (tels que des isolateurs) encodées dans le génome (Nora et al. 2012)



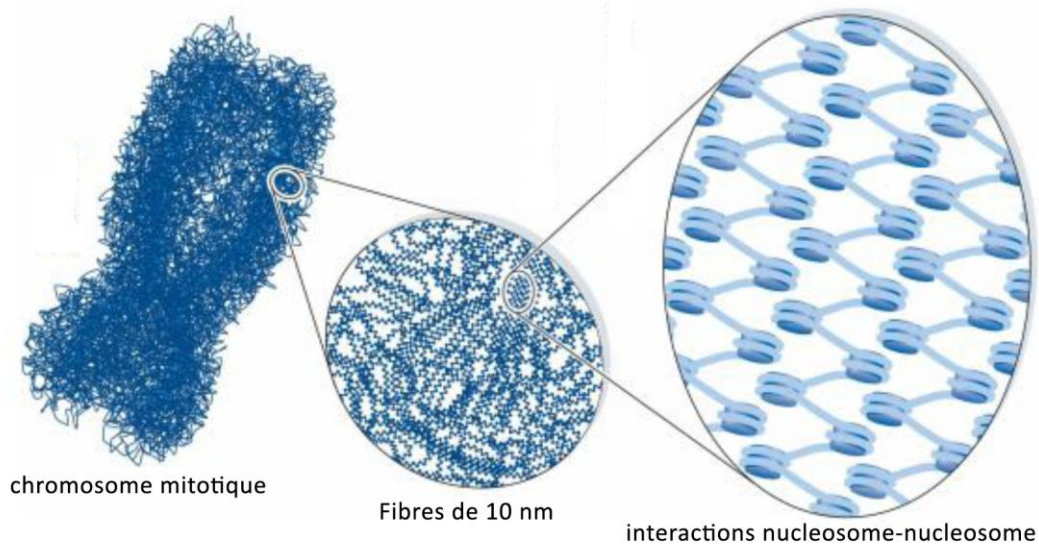
**Figure 13. Domaine de chromatine condensé.**

*Les régions actives de la chromatine sont transcrites à la surface des domaines chromatiniens où l'on retrouve les complexes de transcription et l'ARN polymérase II. NPC : nuclear pore complex (pore nucléaire). NE : nuclear envelope (enveloppe nucléaire). (Maeshima et al. 2014)*

En plus de ces structures, il existe des domaines spécialisés comme les télomères ou les centromères (spécialisés dans la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire). Ces derniers présentent une signature moléculaire caractéristique comme l'hypoacétylation des histones et la présence du variant d'H3 CENP-A (centromere protein A). Le développement d'approches globales sur l'étude des profils de modifications d'histones ont permis de comprendre que celles-ci jouent un rôle important dans la formation et le maintien des structures d'ordre supérieur de la chromatine (Gardner et al. 2011; Horikoshi 2013).

#### **2.4 Le chromosome mitotique**

Au cours de la mitose et de la méiose, la chromatine atteint son état de compaction le plus important : le chromosome. L'organisation des chromosomes diffère énormément de l'état de la chromatine durant l'interphase et leur structure reste une énigme sur laquelle de nombreuses équipes travaillent toujours (Marsden & Laemmli 1979; Swedlow & Hirano 2003; Maeshima & Eltsov 2008; Paulson & Laemmli 1977; Belmont et al. 1987). Les TADs y semblent majoritairement absents, et on observe la perte de la ségrégation spatiale de domaines chromatiniens. Le modèle le plus populaire présente une condensation du chromosome en une grille formée de boucles successives (Strukov & Belmont 2009) (**figure 14**).



**Figure 14. Nouveau modèle de condensation du chromosome mitotique.**

*Dans ce modèle, l'unité fondamentale du chromosome est le collier de perle de la chromatine. Il n'existe pas de structure de 30 nm. Les fibres de 10 nm sont organisées en fractales où la fibre de chromatine est en mesure de se replier sur elle-même et d'interagir avec elle-même à plusieurs niveaux (locale et à distance). (Hansen 2012)*

Les mécanismes nécessaires à la formation de ces structures semblent être dirigés par des modifications spécifiques d'histones, la méthylation de l'ADN et des éléments régulateurs (Follmer & Francis 2012; Kadauke et al. 2012).

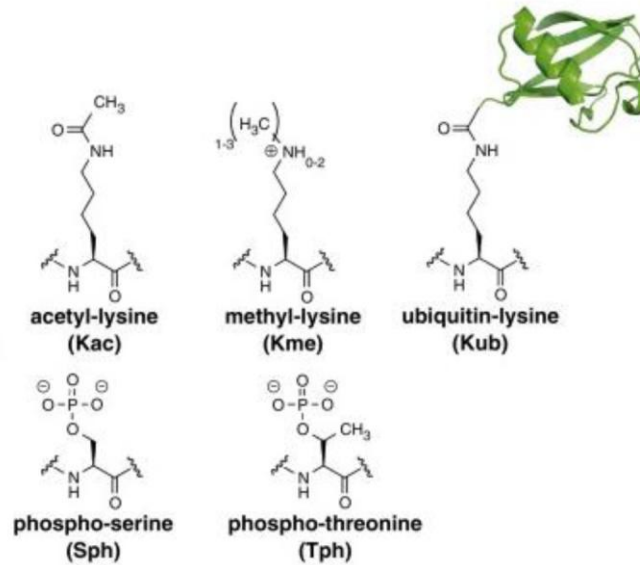
En résumé, la chromatine possède une structure perpétuellement remodelée en fonction de l'avancement dans le cycle cellulaire ou l'état cellulaire. L'acteur central de la modulation de la compaction est le nucléosome. Localement, les chaperons d'histones et protéines modifiant les histones sont essentiels à la réalisation de fonctions cellulaires essentielles (transcription, réplication, réparation de l'ADN). Les facteurs ATP-dépendants et protéines d'échafaudage interviennent dans les structures supérieures de la chromatine et jouent un rôle essentiel dans la stabilité génomique (centromère, télomères). Enfin, l'existence de domaines chromatiniens et de territoires chromosomiques ajoutent un état de complexité dans la structuration du génome.

### 3. Le code épigénétique

#### 3.1 Modifications post-traductionnelles des histones

Définies comme les modifications covalentes d'une protéine par l'intermédiaire d'une enzyme qui interviennent après l'étape cytoplasmique de traduction, les modifications post-traductionnelles des histones (PTMs) jouent un rôle central dans la régulation de la structure chromatinienne. Elles contrôlent notamment les processus cellulaires nécessaires à l'accès au génome (Fischle et al. 2003; Iizuka & Smith 2003;

Khorasanizadeh 2004). La plupart de ces modifications sont réversibles et sont localisées aux extrémités N-ter et C-ter non structurées des histones.



**Figure 15. Formule développée des modifications post-translacionnelles les plus courantes :** Acétylation, méthylation et ubiquitinylation de Lysine (K) ainsi que la phosphorylation de résidus de Sérine (S) et Threonine (T). (Fischle et al. 2015)

Il existe plusieurs types de modifications que l'on peut répartir en deux groupes selon la taille des groupements considérés. Le premier groupe concerne les modifications chimiques de petite taille à savoir l'acétylation de lysine, la méthylation (mono-, di- et triméthylation) de lysine ou d'arginine, la phosphorylation de sérine/thréonine/tyrosine, la citrullination d'Arginine et l'isomérisation de proline (**figure 15**). Le deuxième groupe inclut les modifications de taille plus importante telles que l'ubiquitinylation, la sumoylation, la ribosylation ou la biotinylation de lysine. (Bannister & Kouzarides 2011).

En plus de ces neuf modifications, de nouvelles modifications ont été mises en évidence ces dernières années telles que la  $\beta$ -N-Acetylglucosamine de sérine/thréonine (Sakabe et al. 2010), la crotonylation de lysine (Tan et al. 2011) ou encore la succinylation et la malonylation de Lysine (Xie et al. 2012).

Les modifications les plus étudiées restent l'acétylation (ALLFREY et al. 1964), la méthylation (Byvoet et al. 1972), la phosphorylation et l'ubiquitinylation.

### 3.2 Le code histone

Brièvement évoquée dans un chapitre précédent, l'hypothèse du code histone cherche à faire le lien entre les types de modifications et leurs implications dans des processus biologiques.

La diversité des profils de PTMs ainsi que leur impact sur la régulation des gènes ont conduit à développer le « code histone » (Strahl & Allis 2000; Jenuwein & Allis 2001; Turner 2002). Ce code cherche à faire le lien entre un type de modification, son impact



sur la chromatine et son implication dans les processus biologiques. Il ne se limite pas à l'interaction histone/ADN mais concerne également l'utilité des modifications dans le recrutement de protéines par reconnaissance spécifique. (Musselman et al. 2012) Ces protéines de reconnaissance sont alors capables de recruter de nombreux éléments à la chromatine dans le but de réguler des processus fondamentaux tels que la transcription (Zhou et al. 2011), la réplication (Collins et al. 2002), la mitose et méiose (Xu et al. 2009), la différenciation (Meissner 2010), la gestion des dommages à l'ADN (Stucki & Jackson 2006) et le remodelage de la chromatine (Smolle et al. 2012).

### **3.2.1 L'acétylation**

Cette modification est le résultat de la catalyse d'un transfert d'un groupement acétyl à partir d'un acétyl-CoA vers le groupement amino-terminal des résidus lysines des histones par des enzymes appartenant aux familles des histone-acétyltransférases (HAT). Ces enzymes se retrouvent chez la plupart des espèces, le plus souvent, sous forme de complexes multi-protéiques divisés en plusieurs familles sur la base de leurs homologies. Il existe quatre grandes familles de HAT : CBP/p300, GNAT (GCN5-N-Acetyltransférase-related), MYST et SRC (Steroid receptor Coactivator). La réaction inverse est catalysée par la famille des histone-deacetylases (HDAC) dont il existe six classes majeures. Les enzymes des classes I, II et IV sont zinc-dépendantes tandis que celles de la classe III, les sirtuines, sont NAD-dépendantes. (Vaquero et al. 2003) Les listes complètes des HAT et HDAC peuvent être trouvées en *annexe 1 et 2* respectivement. Il existe un équilibre entre l'activité de ces deux familles d'enzymes qui régule le niveau global d'acétylation des histones nécessaire pour une expression optimale de l'expression génétique (Schmitz & de la Vega 2015).

En général, l'acétylation contribue à une ouverture plus importante de la chromatine car elle affaiblit l'interaction des histones avec l'ADN. Cela a souvent été lié à une activation de la transcription car les gènes sont plus accessibles (Lan et al. 1999). Il existe pourtant des effecteurs capables de reconnaître une lysine acétylée : les bromodomaines (Dhalluin et al. 1999; Sanchez & Zhou 2009), le doigt de zinc de type PHD (Plant HomeoDomain) de Dpf3b (Lange et al. 2008; Zeng et al. 2010) et le domaine DPH (double pleckstrin homology) de la chaperonne Rtt106 (Su et al. 2012). La plupart de ces protéines utilisant les histones acétylées comme point d'ancrage sont impliquées dans le contrôle de la transcription (Filippakopoulos et al. 2012) mais elles jouent également des rôles dans la réparation des dommages à l'ADN (Lee et al. 2010) ou encore dans la progression du cycle cellulaire. (Collins et al. 2002)

### **3.2.2 La méthylation**

Cette modification se fait par le transfert d'un groupement méthyl à partir d'une molécule de S-adénosine-méthionine (SAM). Cette réaction est catalysée par des enzymes de la famille des HMT dont certaines sont spécifiques des résidus qu'elles ciblent : HKMT et PRMT respectivement pour les résidus Lysine ou Arginine. Ces



enzymes peuvent ajouter de 1 à 3 groupements méthyles sur le même résidu. Il est à noter que contrairement à la grande majorité des PTMs, la triméthylation, ne semble pas réversible. (Bannister et al. 2002). Suvar 3/9 fut la première HMT mise en évidence (Rea et al. 2000). Les autres HMTs furent mises en évidence par homologie de séquence et par des approches fonctionnelles (Vaquero et al. 2003). La liste des HMT est fournie en *annexe 3*.

La déméthylation des groupements mono- ou diméthylés est catalysée par les histone-déméthylases (HDM) (Shi et al. 2004). Contrairement à l'acétylation, la méthylation ne joue pas sur la charge mais augmente l'encombrement stérique et l'hydrophobicité du résidu. Cette modification est une des PTMs les plus versatiles. Il est difficile de réduire la méthylation à un rôle en particulier car celui-ci dépend du niveau de méthylation, du résidu considéré ou du complexe protéique reconnaissant la modification. C'est le cas de la méthylation de l'histone H3 sur la Lysine 4. La monométhylation (H3K4me) est souvent associée à une activation de la transcription des gènes. Dans le cas de la triméthylation, la situation est plus complexe. En effet, la sous-unité TAF3 du complexe de transcription TFIID est capable de se fixer à H3K4me3 liant cette modification à une activation de la transcription (Vermeulen et al. 2007) tandis que la reconnaissance de H3K4me3 par la sous-unité ING2 de la protéine HDAC mSin3a provoque une répression rapide des gènes (Shi et al. 2006). La méthylation sur H3K36me joue également un rôle dans le processus de transcription. Les profils de distribution de cette modification montrent une évolution allant d'une mono- à une triméthylation de la lysine 36 entre les extrémités 5' et 3' des gènes (Bannister et al. 2005), celle-ci permet d'éviter des initiations fallacieuses de transcription. En général, les méthylations de H3K9, H3K27 et H4K20 sont associées à la chromatine réprimée. Ainsi, H3K27Me3 avec les complexes de répression du polycomb est un marqueur d'hétérochromatine facultative au niveau des gènes silencieux. Tandis que H3K9Me3 est enrichi avec HP1  $\alpha/\beta$  dans l'hétérochromatine constitutive et correspond aux régions condensées en permanence (e.g. centromères et télomères) (Trojer & Reinberg 2007)

Ces exemples montrent que non seulement le niveau de méthylation est important mais également la localisation de la modification.

### **3.2.3 La phosphorylation**

Si l'on ne se limite pas aux histones, la phosphorylation doit être la PTM la plus répandue dans l'organisme. Cette modification correspond au transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP (Adenosine triPhosphate) sur un résidu sérine, thréonine ou tyrosine. Cette réaction et sa réversion sont catalysées par des couples d'enzymes de la famille des sérine thréonine kinases ou des phosphatases qui ne sont pas spécifiques aux histones comme Ip11/aurora kinase ou encore Glc7/PP1 phosphatase (Hsu et al. 2000). La liste des résidus phosphorylés et des kinases responsables de la catalyse est fournie en *Annexe 4*.

L'ajout d'un groupement phosphate confère une charge négative au résidu modifié. Cela a pour conséquence de diminuer l'affinité des histones pour l'ADN et crée une

décondensation locale de la chromatine. De plus, la reconnaissance des motifs phosphorylés des histones est essentielle dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, la mitose et la régulation de la transcription. Une des phosphorylations d'histone les plus étudiées est celle de la sérine 139 de H2AX en réponse à des dommages à l'ADN. Plusieurs kinases sont impliquées : ATM, ATR, DNA-PK et sont en mesure de phosphoryler H2AX. Comme vu précédemment, cette marque est ensuite reconnue par de nombreuses protéines impliquées dans la voie de réparation des dommages à l'ADN mais elle peut aussi être reconnue par le domaine BRCT de MDC1, par 53BP1 et Crb2 (Stucki et al. 2005; Ward et al. 2003; Sofueva et al. 2010). De plus, la phosphorylation de H3S10 pendant la mitose est nécessaire pour la condensation des chromosomes et leur ségrégation (Hirota et al. 2005). Cette phosphorylation permet de relâcher des protéines HP1 en réduisant leurs interactions avec H3K9me3 (Hirota et al. 2005; Fischle et al. 2005).

### **3.2.4 Autre modifications d'histones**

Comme expliqué précédemment, il existe d'autres modifications d'histones moins prévalentes et moins documentées dans la littérature. Ces modifications font pourtant de plus en plus l'objet d'études.

L'ubiquitylation, la biotinylation, la ribosylation et la crotonylation sont réversibles alors que la sumoylation ne semble pas l'être. La plupart de ces modifications surviennent sur des résidus Lysine, la citrullination est une modification un peu particulière car il s'agit d'une déimination d'arginines catalysée par des déiminases PAD (Peptidyl-arginine deiminase). Cette modification va rendre la méthylation impossible sur ces résidus et affecte ainsi la transcription (Thompson & Fast 2006).

La sumoylation ainsi que l'ubiquitylation correspondent au transfert respectif d'une unité SUMO (small Ubiquitin like modifier) ou d'une unité ubiquitine. A l'instar de la méthylation, ces deux modifications peuvent contribuer à l'activation ou à la répression de la transcription en fonction du contexte. La sumoylation semblerait plus fortement associée à la répression de la transcription car elle favoriserait le recrutement d'enzymes HDAC (Shiio & Eisenman 2003). Lorsque l'ubiquitylation concerne l'histone H2A, cette modification semble être considérée comme une marque répressive de la transcription tandis que le rôle de cette modification semble plus équivoque quand l'histone H2B est ubiquitylée (Weake & Workman 2008).

La ribosylation est une PTM plus courante où un groupement poly(ADP-ribose) est ajouté sur une lysine par la catalyse d'une enzyme de la famille des PARP (poly(ADP-ribose) polymérase). Comme pour la phosphorylation, la ribosylation affecte la charge des lysines modifiées et entraîne un relâchement de la chromatine. Cette modification joue notamment un rôle dans la réparation des dommages à l'ADN (Messner & Hottiger 2011).

La biotinylation correspond au transfert d'un groupement biotine par une enzyme de la famille des biotinidases sur un résidu Lysine. Son rôle semble plutôt lié à la

répression de la transcription et la voie de signalisation des dommages à l'ADN (Kothapalli et al. 2005; Peters et al. 2002).

Enfin, la crotonylation, découverte récemment, correspond à un groupement crotonyle transféré depuis une molécule de crotonyl-CoA (Tan et al. 2011). Cependant, les enzymes impliquées dans cette catalyse ne sont pas encore identifiées. La structure du groupement crotonyle est proche de celle de l'acétylation et il serait donc logique de lui supposer un rôle dans l'activation de la transcription.

### 3.3 Communication croisée et combinaisons des modifications d'histones

L'extrémité N-ter des histones de cœur comprend souvent, dans une relative proximité, de nombreux résidus pouvant être, entre autres, acétylés, phosphorylés ou méthylés. (Cheung et al. 2000) De plus, ces trois modifications peuvent être présentes dans des régions chromatiniennes actives ou silencieuses. Cela amène alors à se poser la question de la nature combinatoire de ces modifications. De nombreuses études ont mis en évidence que la présence de plusieurs de ces modifications sur la même histone, sur des histones du même nucléosome ou sur des histones de nucléosomes voisins peut entraîner une communication croisée apportant un nouveau degré de complexité au code histone (Fischle et al. 2003; Bannister & Kouzarides 2011).

Par exemple, les PTMs peuvent influencer directement sur l'apparition d'une modification d'un résidu voisin sur la même histone. Il existe donc des modifications qui sont mutuellement exclusives ou au contraire positivement corrélées. A titre d'exemple, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) est souvent associée à une répression de la chromatine comme vu précédemment dans la partie 2.4 du chapitre 1. Cette méthylation est reconnue par la protéine HP1 qui peut attirer l'histone methyltransférase (HMT) Suv39 qui va permettre la méthylation de l'histone H3 du nucléosome voisin (Margueron et al. 2005). Cependant, si la lysine est déjà acétylée, la méthylation ne peut se faire et bloquera la propagation de la méthylation. A contrario, les acétylations de H3K4 ou H3K27 sont dépendantes de l'ubiquitinylation de H2BK120 (Kim et al. 2009; Nakanishi et al. 2009).

Cet aspect combinatoire se doit d'être pris en compte lorsque l'on s'intéresse à l'impact des modifications sur la transcription des gènes. Les PTMs agissent de concert et non de manière isolée (Strahl & Allis 2000). La présence de multiples modifications sur la même protéine peut provoquer des effets difficiles à prévoir (Karch et al. 2013). Ce code devient de plus en plus complexe et met en évidence un mécanisme capable de réguler finement l'expression des gènes. Il se caractérise par l'intervention d'un nombre important d'acteurs (enzymes, protéines de reconnaissances, protéines structurales, etc.) et par le fait qu'une modification peut influencer une autre modification soit de manière synergique soit de manière antagoniste. De plus, ce code pourrait contribuer à la transmission d'informations lors des divisions cellulaires (Turner 2002). Le contexte global des différentes modifications restent encore difficile

à saisir car même si les effecteurs responsables des modifications ou se liant à ces modifications sont en majorité connus, il faut maintenant pouvoir tenir compte de leurs interactions et interdépendances.

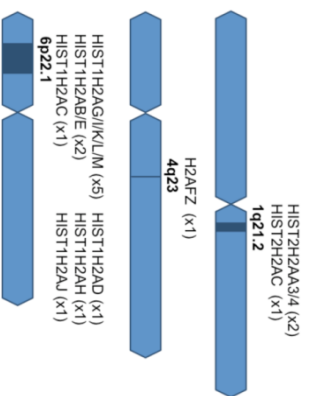
#### 4. Histones canoniques et variants

Les histones sont des protéines qui sont parmi les mieux conservées au cours de l'évolution. Ces protéines sont codées par plusieurs loci, ce qui permet l'existence de plusieurs sous-types d'histones dont les séquences peuvent varier. (Marzluff et al. 2002). Chez les mammifères, 26 gènes codent pour 19 H2A différentes. 15 de ces protéines sont considérées comme canoniques car elles sont très similaires au niveau de leur séquence (plus de 97% de similitude) et ne présentent pas de fonction particulière connue.

Il existe donc deux classifications possibles pour les variants d'histones. En se basant sur leur structure, on peut alors distinguer les variants homéomorphes, dont la structure ne diffère que de quelques acides aminés de leurs homologues canoniques, des variants hétéromorphes dont les variations de séquences sont telles qu'elles impactent la mobilité électrophorétique de la protéine (Franklin & Zweidler 1977; West & Bonner 1980). La seconde classification se base, quant à elle, sur les caractéristiques fonctionnelles des variants : expression dépendante de la réplication (Wu et al. 1982), expression spécifique dans un tissu, fonction, etc. C'est pourquoi 19 protéines H2B existent et ont longtemps été considérées comme toutes canoniques tandis que toutes les histones H3 sont considérées comme étant des variants malgré de grandes homologies de séquence. A contrario, l'histone H4 n'a pas de variant mais est codée par 14 gènes différents.

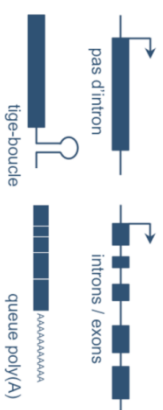
Les histones canoniques sont majoritairement exprimées pendant la phase S et incorporées dans la chromatine durant la réplication, ce qui n'est pas forcément le cas pour les variants d'histones qui peuvent être exprimés tout au long du cycle cellulaire (Albig & Doenecke 1997). Les gènes codant pour les histones canoniques sont regroupés en clusters et ne possèdent pas d'introns, leurs ARNms ne sont pas polyadénylés mais possèdent une structure en épingle à cheveux nécessaire à leur stabilité et leur traduction pendant la phase S (Pandey et al. 1990; Dominski et al. 1999). Encore une fois, les variants d'histones ne respectent pas forcément ce schéma, leurs pré-ARNms peuvent contenir des introns. Ils sont donc en mesure de subir des épissages alternatifs (comme pour macroH2A) et ils sont polyadénylés. (Rasmussen et al. 1999; Marzluff et al. 2002). Les variants d'histones ne se déposent pas forcément pendant la réplication, peuvent être guidés par des chaperonnes d'histones qui leur sont spécifiques et interagir avec des facteurs capables de modifier

## Histone H2A



## ORGANISATION GÉNOMIQUE

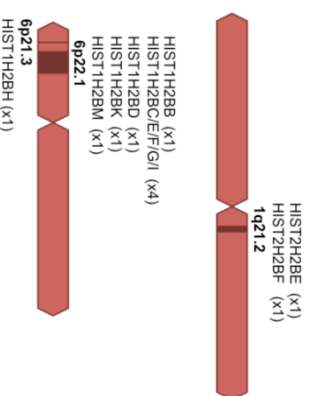
Dependant de la répliation (H2A,Z)



## SÉQUENCES TRANS-PROTÉIQUES CRIPTION

H2A type 2-C	10	16	40	51	99	121-129
H2A type 2-A	A	S	A	M	K	ESH-KAKSK
H2A type 1-H	A	T	A	L	K	ESHHRKAKG
H2A type 1-J	A	T	A	L	K	ESHHRKAK-K
H2A.J	V	S	A	L	K	ESHHRKAK-K
H2A type 1	A	T	A	L	K	ESHHRKAKG
H2A type 1-C	A	S	A	L	R	ESHHRKAKG
H2A type 1-D	A	T	S	L	K	ESHHRKAKG
H2A type 1-B/E	A	T	S	L	R	ESHHRKAKG

## Histone H2B

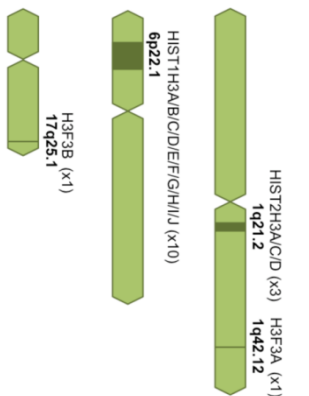


Dependant de la répliation (H3,1 et H3,2)

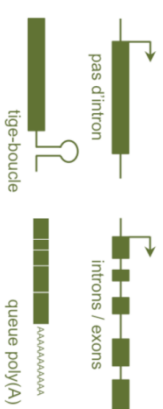


H2B type 1-K	2-4	9	18-21	38	124
H2B type 1-H	EPA	A	VT A	V	A
H2B type 1-E	DPA	A	VT A	V	S
H2B type 2-E	EPA	A	VT A	V	S
H2B type 2-F	DPA	A	VT A	V	S
H2B type 1-D	EPD	A	VT A	V	S
H2B type 1-B	EPD	A	IT A	I	S
H2B type 1-M	EPV	V	IN A	V	S

## Histone H3

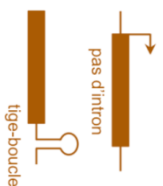
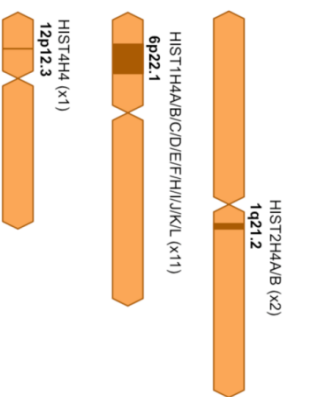


Dependant de la répliation (H3,3)



H3.1	31	87	89-90	96
H3.2	A	S	VM	C
H3.3	S	A	IG	S

## Histone H4



Une seule protéine codée

Figure 16. Organisation génomique, transcription et séquences protéique des histones humaines du coeur du nucléosome

Seules sont représentées les histones identifiées par spectrométrie de masse au sein du laboratoire dans des fibroblastes WI38. Les gènes sont le plus souvent localisés dans le cluster 1 (6p22.1) et 2 (1q21.2). Les gènes d'histones qui sont dépendants de la répliation ne représentent pas d'introns et leurs ARNm possèdent un motif tige-boucle reconnue par SLBP. Les gènes d'histones s'exprimant constitutivement possèdent des introns et leurs ARNm se terminent par une queue poly(A). (Contrepolis et al. 2012)

la chromatine (Tagami et al. 2004; Heo et al. 2008; Foltz et al. 2010; Luk et al. 2010; Elsaesser et al. 2010) (figure 16).

Table 1. Exemples de variants d’histones, de facteurs protéiques associés et leurs implications fonctionnelles (Skene & Henikoff 2013; Chen, Zhao & Li 2013)

Histone variant	Facteurs Associés	Fonctions potentielles
H2A.X	FACT	Signalisation de dommages, réparation
H2A.Z	INO80, SWR1	Positionnement du nucléosome, activation de la transcription.
macroH2A	ATRX	Répression de la transcription et stabilisation de l’état de différenciation.
H3.3	HIRA, DAXX/ATRX	Enrichi dans les régions transcriptionnellement actives.
CENP-A	HJURP	Stabilité des centromères, recrutement et ancrage des kinétochores.

Ces variants permettent donc une variation supplémentaire de la composition des nucléosomes de par leurs séquences spécifiques mais également en élargissant les profils de modifications post-traductionnelles (exemple : apparition d’un résidu de phosphorylation sur H2A.X). Ces variants sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires allant de l’activation transcriptionnelle à sa répression, en passant par la détection de dommages à l’ADN ou l’établissement des centromères.

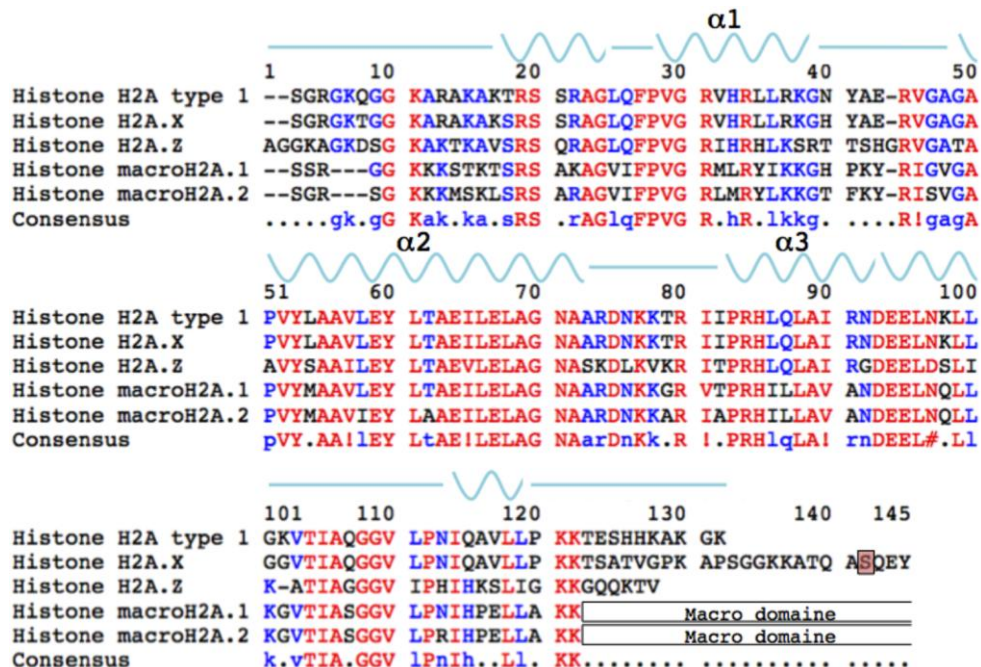


Figure 17. Alignement de séquences des variants d'histones H2A humaines.

La sérine phosphorylée de H2AX est encadrée. Les acides aminés en rouge sont conservés dans toutes les séquences, les acides aminés en bleu sont conservés dans la majorité des séquences et les acides aminés en noir présentent une différence. La structure secondaire en trois hélices alpha est précisée. Alignement réalisé avec l’aide de multalin par (Contrepois et al. 2012).

#### 4.1 La famille des variants de l'histone H2A

L'histone H2A forme un hétérodimère avec H2B et sa forme canonique est composée d'environ 130 acides aminés pour une masse moléculaire moyenne aux alentours de 14 kDa. Il existe quatre variants majeurs de l'histone H2A : H2A.X, H2A.Z, macroH2A et H2A.Bbd. Il existe également deux variants plus mineurs qui ont été caractérisés : H2A.V et H2A.J. Tous ces variants ont des masses moléculaires différentes des formes canoniques et peuvent posséder des isoformes (**figure 17**).

##### 4.1.1 H2A.X

Chez les mammifères, de 2 à 25% des nucléosomes contiennent ce variant. Chez l'homme, on le retrouve notamment dans tous les types cellulaires. Il contient un motif consensus SQ, en position 139, sur son extrémité c-terminale (Redon et al. 2002), ce résidu sérine est connu pour être phosphorylé par les kinases ATM, ATR et DNA-PK (Pilch et al. 2003). Un niveau basal de la forme phosphorylée, notée  $\gamma$ H2A.X, existe dans chaque cellule de mammifère. Mais il augmente dans le cas de cassures double brin (Rogakou et al. 1998). Sans revenir en détail sur le rôle de H2AX dans les dommages à l'ADN (explicitée précédemment, voir partie 1.1 du chapitre 1), il est à noter que la phosphorylation de H2A.X est liée à d'autres phénomènes que la reconnaissance de cassures de l'ADN. Lors de l'apoptose, la quantité de  $\gamma$ H2A.X augmente lors de la fragmentation de l'ADN. La seule activité d'une endonucléase à activité apoptotique suffit à induire la phosphorylation de H2A.X (Rogakou et al. 2000). De plus, des souris n'exprimant pas ce variant (souris H2AX<sup>-/-</sup>) restent viables. Cependant, leurs fibroblastes, cellules B ou T présentent une instabilité génomique (Celeste & Petersen 2002). L'absence de forme phosphorylée de H2AX altère les réactions de recombinaisons de l'ADN (Petersen et al. 2001) et lorsque la délétion est couplée à une délétion de p53, des souris doublement délétées développent des lymphomes. (Bassing et al. 2003). Ces données suggèrent que le rôle de H2AX s'étend au-delà de la simple surveillance du génome.

##### 4.1.2 H2A.Z

Ce variant peut représenter jusqu'à 15% de la quantité totale d'histones H2A dans une cellule. Il possède 60% d'homologie avec la séquence canonique. Son expression est régulée au cours du cycle cellulaire mais n'est pas couplée à la synthèse de l'ADN. (Hatch, 1990). Sa déposition, assurée par un complexe de remodelage de la chromatine SWR1-Com (Kobor et al. 2004; Mizuguchi et al. 2004), pourrait avoir lieu lors de la phase d'élongation de la transcription (Studitsky et al. 2004). Les particularités de séquence de ce variant créent des déstabilisations au sein du nucléosome entre les dimères H2AZ-H2B et H3-H4 et modifient les caractéristiques électrostatiques à la surface du nucléosome. Des expériences de sédimentation *in vitro* confirment que les nucléosomes contenant H2AZ ont une stabilité réduite (Abbott et al. 2001). Cette instabilité pourrait être liée au rôle que l'on attribue à ce variant. En

effet, lors de sa découverte chez *Tetrahymena thermophila*, H2AZ fut essentiellement retrouvé dans les zones transcriptionnellement actives et absent des régions silencieuses (Allis et al. 1980). Il a depuis été confirmé que la présence de H2AZ est corrélée à une activation transcriptionnelle (Barski et al. 2007) et que ce variant est enrichi au niveau des TSS (transcription start site) (Yukawa et al. 2014). Enfin, la décompaction de la chromatine induite par l'incorporation de ce variant facilite le recrutement de complexes de réparation de l'ADN au niveau des cassures double brin (Xu et al. 2012).

#### **4.1.3 MacroH2A**

Ce variant est le plus gros variant d'histone avec une masse d'environ 40 KDa. Il tient d'ailleurs son nom de sa taille non-conventionnelle de 372 acides aminés, soit trois fois la taille d'une histone canonique (Pehrson & Fried 1992). Il possède deux domaines : un domaine dont la séquence présente 64% d'homologie avec H2A et une région sans aucune homologie en C-terminal. Deux gènes, présents sur le chromosome X, codent pour macroH2A1 et macroH2A2 (Chadwick et al. 2001). Le gène macroH2A1 présente deux épissages alternatifs chez les mammifères (macroH2A1.1 et macroH2A1.2) qui posséderaient des fonctions distinctes. La présence de macroH2A stabilise le nucléosome et induit une compaction relative de la chromatine (Muthurajan et al. 2011). Lors de sa première identification, il fut associé à la condensation de la chromatine sur le chromosome inactivé (corps de Barr) et son association à l'allèle muet lors de l'empreinte parentale (Doyen et al. 2006) qui suggère un rôle de ce variant dans la répression des gènes (Costanzi & Pehrson 1998). MacroH2A est également enrichi dans les SAHFs où la condensation de la chromatine est importante (Zhang et al. 2005) et ce variant se retrouve souvent associé aux loci des îlots méthylés CpG que ce soit sur les autosomes ou les chromosomes sexuels (Choo et al. 2006). On retrouve également macroH2A surexprimé pendant la différenciation des cellules souches, ce qui stabilise l'induction des cellules pluripotentes et évite leur reprogrammation (Barrero et al. 2013). De plus, ce variant peut interagir avec des partenaires capables de maintenir l'état d'inactivation de la chromatine sur laquelle macroH2A est déposé. HDAC1 et HDAC2 sont en effet en mesure d'interagir avec une région en C-terminal de macroH2A (Chakravarthy et al. 2005) et la présence de ce variant coïncide avec un état hypoacétylé de H3. Enfin, l'histone macroH2A est notamment localisée sur l'hétérochromatine péricentrique. Tout cela tend vers une fonction de macroH2A dans l'inhibition de la transcription que ce soit par sa structure ou par les interactions de ce variant avec des protéines réprimant la transcription.

#### **4.1.4 H2A.Bbd**

A l'opposé des autres variants, H2A.Bbd (*Barr body-deficient*) est spécifique des mammifères. Il ne présente que 48% d'homologie avec l'histone H2A conventionnelle et est considérablement plus court que les autres variants d'histones. Contrairement à MacroH2A, ce variant est totalement absent du chromosome femelle inactif mais est



très abondant dans les régions actives du génome (Chadwick & Willard 2001). A l'instar de H2A.Z, les nucléosomes possédant H2A.Bbd semblent moins stables que ceux contenant une version canonique de H2A (Gautier et al. 2004) et ils ne possèdent que 118 paires de base contre 146 habituellement. La chromatine présente donc une conformation plus permissive à la transcription (Bao et al. 2004; Tolstorukov et al. 2012). Ce variant possède notamment la particularité de ne contenir qu'une seule lysine, le privant de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que les acétylations. Aucune PTM n'a d'ailleurs été identifiées sur ce variant. Cependant, la présence de H2A.Bbd dans des nucléosomes *in vitro* en augmente le niveau global d'acétylation en permettant une meilleure accessibilité de la chromatine à la protéine p300 (Angelov et al. 2004).

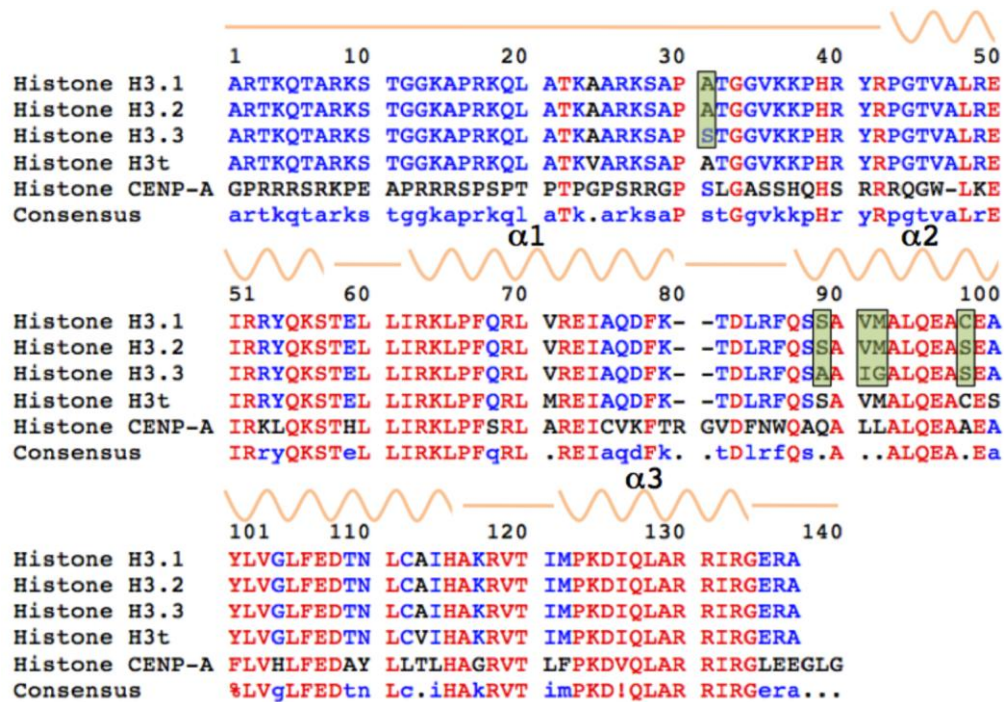
#### 4.2 Les variants de l'histone H2B

Malgré les 19 protéines H2B existantes, seuls 3 variants ont clairement été identifiés et on en ignore encore toutes les fonctions. Les variants spH2B (human-sperm-specific), hTSH2B et H2BFWT ont été découverts respectivement dans le sperme et les testicules humains. (Gineitis et al. 2000; Zalensky et al. 2002; Churikov et al. 2004). spH2B a été découvert dans un complexe se liant aux télomères et H2BFWT semble être également enrichi dans les régions télomériques. hTSH2B possède, dans sa partie N-terminale, une phénylalanine à la place d'une sérine phosphorylable. Or, cette sérine est phosphorylée par Mst1 lors de l'apoptose (Cheung et al. 2003). Ce variant non-phosphorylable pourrait donc jouer un rôle dans le blocage de l'apoptose dans les cellules spermatiques. De plus, les nucléosomes possédant hTSH2B présentent une stabilité plus faible que ceux contenant une histone conventionnelle (Li et al. 2005). A l'inverse des variants de H2A, les variants de H2B ne possèdent pas de propriétés structurales différentes des histones conventionnelles (Boulard et al. 2006; A. Li et al. 2005). Cela suggère que l'incorporation de H2B dans les octamères d'histones n'altère pas sensiblement les propriétés du nucléosome. Cette conclusion peut cependant être remise en cause dans les années à venir avec la découverte de nouveaux variants et de nouvelles fonctions pour ces derniers.

#### 4.3 Les variants d'histones de H3

Les modifications post-traductionnelles de l'histone H3 sont particulièrement bien étudiées mais ses variants et leurs PTMs commencent seulement à émerger des études actuelles. La famille H3 possède six variants différents. A l'inverse de H3.3, CENP-A, H3.3C et H3.1t, les versions H3.1 et H3.2 sont des isoformes de l'histone canonique et sont donc exprimés pendant la phase S. H3.1 est codé par dix gènes différents alors que H3.2 n'est codé que par un seul gène. Selon le contexte, l'isoforme H3.1 peut être associé à une répression ou une activation de la transcription tandis que H3.2 ne semble associé qu'à la répression de la transcription (Hake & Allis 2006).

Enfin, deux des variants de H3 semblent spécifiques des testicules : H3.1t et H3.3C. Nous nous attarderons plus en détail sur les variants restants. (**figure 18**)



**Figure 18. Alignement de séquences des variants de H3 : H3.1, H3.2, H3.3, H3t et CENP-A.**

Les acides aminés variant entre H3.1, H3.2 et H3.3 sont encadrés. Les acides aminés en rouge sont conservés dans toutes les séquences, les acides aminés en bleu sont conservés dans la majorité des séquences et les acides aminés en noir présentent une différence. La structure secondaire en trois hélices alpha est précisée. % indique un F ou Y. ! indique un I ou V. Alignement réalisé à l'aide de Multalin par (Contrepois et al. 2012).

### 4.3.1 H3.3

Dans certains cas, ce variant peut représenter près de la moitié des espèces totales de H3 sur le nucléosome. Il diffère de l'histone canonique par seulement 5 acides aminés et s'incorpore sur la chromatine soit lors de la phase S par la même voie que les histones canoniques soit indépendamment de celle-ci. (Ahmad & Henikoff 2002). Malgré sa subtile différence de séquence, H3.3 est le plus souvent incorporé lors d'une activation transcriptionnelle en remplaçant H3.1. (McKittrick et al. 2004; Mito et al. 2005). En accord avec cette incorporation spécifique, H3.3 est enrichi en marques relatives à l'activation de la transcription telles que H3K4me3, tandis que H3.1 est plus souvent associé aux marques de répression (Hake & Allis 2006). De plus, H3.3 se retrouve colocalisé avec H2A.Z aux promoteurs de gènes actifs. (Jin et al. 2009). Enfin, l'incorporation de H3.3 contribuerait à l'ouverture de la chromatine et faciliterait la transcription en inhibant la formation de structures d'ordre supérieur malgré son absence d'effets sur la stabilité du nucléosomes (Chen, Zhao, Wang, et al. 2013). Outre son rôle dans la transcription, H3.3 semble être impliqué dans d'autres processus. Plusieurs variants H3.3 sont phosphorylés (H3.3S31P) pendant la métaphase et cette sous-population semble être localisée au niveau des centromères (Hake & Allis 2006).

Cela renforce l'idée que l'éventail de PTMs peut être considérablement élargi par la diversité des variants d'histones existants.

#### **4.3.2 CENP-A**

Les centromères sont des régions particulières de la chromatine où se forment les kinétochores, sorte de plateforme d'ancrage où viennent se fixer les microtubule du fuseau mitotique qui vont permettre la ségrégation des chromatides (Amor et al. 2004). Ce variant est spécifiquement localisé dans cette région des chromosomes où il participe à la formation des kinétochores, ce qui lui doit son nom de CENP-A (centromer protein A). (Yoda et al. 2000). Ce variant partage 50% d'homologie avec l'histone H3.1. C'est un des variants les mieux conservés entre les espèces (Kitagawa & Hieter 2001). Ce variant est exprimé tout au long du cycle cellulaire mais présente un pic d'expression en fin de phase S (Sullivan 2001). Il vient ensuite s'intégrer à la chromatine au début de la phase G1 grâce à la chaperonne HJURP (Holliday junction recognition protein) (Jansen et al. 2007; Foltz et al. 2010; Dunleavy et al. 2009). En plus de son rôle aux centromères, il a été montré que des embryons de souris déficientes en CENP-A ne pouvaient survivre plus d'une semaine post-conception (Howman et al. 2000) et présentaient des problèmes de fragmentation de la chromatine et d'hypercondensation. Enfin, la même kinase Aurora-B est capable de phosphoryler CENP-A ou H3 canonique, respectivement sur leurs sérines S7 et S10; cette phosphorylation a lieu durant la mitose pour CENP-A et est nécessaire au bon déroulement de la cytokinèse (Zeitlin et al. 2001). Cela soutient l'idée que les variants d'histones n'élargissent pas seulement l'éventail de PTMs mais fournissent également de nouveaux motifs pour des modifications déjà existantes.

L'existence des variants d'histones s'explique aisément à la lumière du code histone. Ces protéines fournissent de nouvelles séquences ou cassettes soumises aux PTMs. De plus, ces nouvelles histones altèrent la structure du nucléosome qui, par conséquent, modifie la structure de la chromatine et son accessibilité. Afin de comprendre la régulation épigénétique, il faut désormais prendre en compte l'existence de ces variants, leurs modifications potentielles, leurs interactions avec d'autres histones canoniques ou d'autres variants modifiés ou non dans un contexte spatial (coexistence de variants sur le même nucléosome, proximité spatiale de deux nucléosomes modifiés, etc.) et temporelle (présence nécessaire d'une modification pour la déposition d'un variant ou l'apparition d'une PTM). Certains chercheurs ont d'ailleurs introduit le terme de «code nucleosome» (Bernstein & Hake 2006).

## Chapitre 3 : Rôle du code nucléosome dans l'établissement et la maintenance de la sénescence.

La chromatine possède une structure dynamique grâce aux remplacements permanents des histones, à leurs modifications et à l'intégration de variants lui permettant ainsi de réguler ces diverses fonctions : transcription, réplication, réparation des dommages (Deal & Henikoff 2010). En prolifération, une grande partie de cette modulation de structure a lieu lors de la réplication de l'ADN. Il est donc intéressant de se demander comment la chromatine est en mesure de maintenir ses fonctions lors de la sénescence. En effet, une cellule sénescente ne prolifère plus mais reste métaboliquement active et sécrète de nombreux facteurs protéiques. Il existe donc d'autres moyens de réguler les fonctions de la chromatine, certains variants d'histones sont d'ailleurs connus pour s'accumuler en sénescence. C'est le cas de l'histone H3.3 (Rogakou & Sekeri-Pataryas 1999) et macroH2A (Maehara et al. 2010). De plus, certaines altérations épigénétiques locales (méthylations, acétylations, etc.) sont présentes aux télomères, centromères et loci de certains gènes et jouent un rôle essentiel en sénescence.

Cependant, les mécanismes permettant la modification de la chromatine par l'insertion de variants ou l'apport de PTMs sont encore mal caractérisés dans le contexte de la sénescence cellulaire.

### 1. PTMs et variants d'histones dans la sénescence cellulaire

#### 1.1 Méthylations et Acétylation d'histones

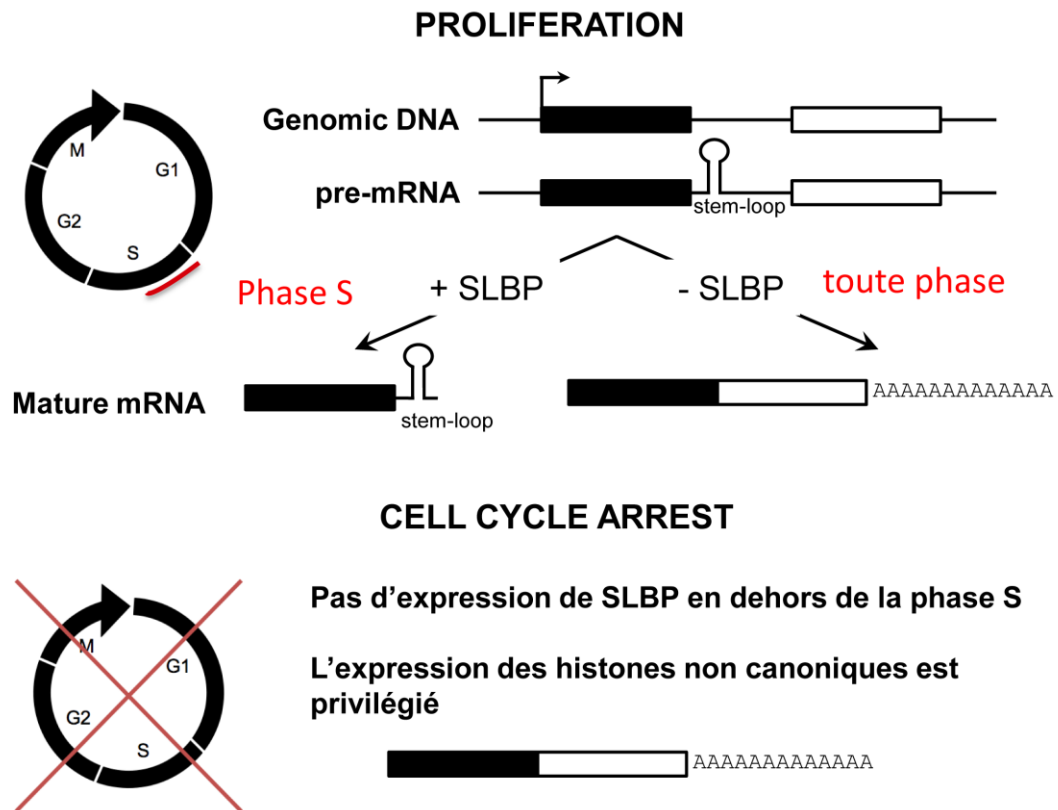
Les recherches se sont longtemps concentrées sur les changements de la chromatine associés au vieillissement. Au vu du lien entre vieillissement et sénescence, ces résultats sont un point de départ intéressant pour les analyses mais peu de données existent qui sont spécifiques aux cas de sénescence prématurée, en dehors des marques spécifiques aux SAHFs décrites plus tôt. L'acétylation de H4K16, la triméthylation de H4K20 ou H3K4 ainsi que la déméthylation de H3K9 ou H3K27 sont autant de marques épigénétiques liées au vieillissement (Fraga & Esteller 2007). Il est pourtant possible de retrouver certaines de ces modifications en sénescence. Lors de l'entrée en sénescence, l'activation du locus d'INK4A requiert la perte de H3K27me3 sur son promoteur. Or, il a été montré que l'induction de la sénescence s'accompagne d'une perte de EZH2, la méthyltransférase responsable de cette modification (Kim & Sharpless 2006; Bracken et al. 2007). Par ailleurs, les méthyltransférases KDM2a et KDM2b qui sont responsables de la méthylation de H3K36Me2 et H3K4me3, jouent un rôle dans la modulation des voies p53 et p16<sup>INK4A</sup> lors de l'induction de la sénescence (He et al. 2008; Pfau et al. 2008; Tzatsos et al. 2009). Une diminution globale de H3K9me2 a d'ailleurs été observée dans des lignées de fibroblastes sénescents IMR90

induits par l'activation de l'oncogène Ras. De plus, cette déméthylation contrôlée par les enzymes G9a et GLP permettrait de faciliter la dépression de certains gènes codant pour le SASP, à savoir IL6 et IL8 (Takahashi et al. 2012). Des modèles murins et humains de progeria ont également permis de faire un lien entre certaines marques et la sénescence prématurée. Ces modèles présentent, en effet, une hypoacétylation de H4K16 et une hausse de la triméthylation de H4K20me3. (Shumaker et al. 2006; Krishnan et al. 2011). Pourtant, toutes les données obtenues sur le vieillissement ne sont pas toutes extrapolables à la sénescence. L'acétylation de H4K16 a toujours été décrite comme une modification qui augmente avec le nombre de passages en culture pour des fibroblastes humains. (O'Sullivan et al. 2010). De plus, forcer son hypoacétylation augmenterait l'espérance de vie chez la levure (Kaeberlein et al. 1999; Dang et al. 2009). Il se peut que l'apparition de ces marques diffère selon l'inducteur de sénescence (prématurée ou liée au raccourcissement des télomères).

### **1.2 Les variants d'histones**

Du fait de leur expression constitutive, il est assez prévisible que les variants d'histones non-canoniques jouent un rôle lors de la sénescence. C'est notamment le cas de H3.3 qui est la forme majeure de l'histone H3 chez les cellules sénescents humaines avec une version clivée de ce variant nommé H3.3cs1 (Duarte et al. 2014). L'expression ectopique de ce variant serait d'ailleurs suffisante pour induire la sénescence, ce qui n'est pas le cas lors de la surexpression de H3.1. Ces données sont confirmées par une seconde étude montrant qu'une délétion partielle de SLBP résulte en une hausse du niveau de H3.3 qui vient remplacer H3.1 et H3.2 rendue artificiellement moins abondant. Ce qui a pour conséquence d'induire la sénescence. (Prado et al. 2016). Le variant de l'histone H2A, macroH2A, a également été lié à plusieurs mécanismes de la sénescence cellulaire. Les SAHFs sont enrichis en macroH2A, ce qui est cohérent avec son rôle de répresseur. De plus, une étude récente fait le lien entre macroH2A1, l'expression du SASP et son contrôle par rétroaction dans un contexte d'induction de sénescence par l'expression de RASV12 (Chen et al. 2015).

## SLBP et son implication dans la maturation des ARN d'histones



Les ARN messagers d'histones canoniques se terminent par une tige-boucle : une structure particulière qui remplace la queue polyA de la plupart des ARNm. C'est une structure particulièrement bien conservée au cours de l'évolution, notamment chez les métazoaires. Cette structure confère aux ARNm une stabilité réduite.

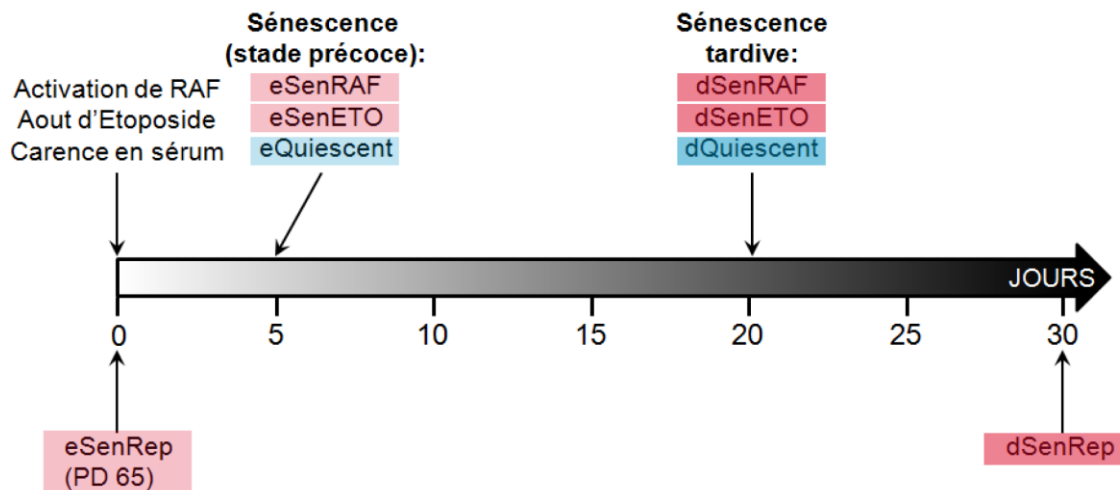
Cela permet une régulation fine de la quantité d'ARNm d'histones présente dans la cellule et par conséquent de la quantité d'histones labiles notamment durant la phase S où l'ADN est répliqué. La protéine SLBP (stem-loop binding protein) vient interagir avec cette structure et participe à toutes les étapes du métabolisme des ARN (Wang et al. 1996).

A contrario, les gènes codant pour certains variants d'histone ne sont pas régulés par la répllication de l'ADN. Leurs ARNm sont polyadénylés et ces protéines sont exprimées tout au long du cycle cellulaire. Ce sont des histones indépendantes de la répllication.

## 2. Le variant H2A.J

### 2.1 Accumulation du variant H2A.J durant la sénescence cellulaire avec dommages persistants à l'ADN

Précédent le début de ma thèse, des études furent menées, au sein du laboratoire, sur l'information épigénétique portée par les histones durant la sénescence cellulaire. Les travaux de Kévin Contrefois ont permis de développer une méthode de profilage rapide des isoformes d'histones par UHPLC-MS (Ultra High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) (Contrefois et al. 2010). Lors de sa thèse, cette méthode a permis au Docteur Contrefois de s'intéresser aux modifications post-traductionnelles et aux variants impliqués dans la compaction de la chromatine et la maintenance de la chromatine à long terme. Pour cela, il a utilisé plusieurs modèles d'induction de sénescence et en a étudié la composition de l'épigénome à différents temps après l'entrée en sénescence : 5 jours et 21 jours. (figure 19)

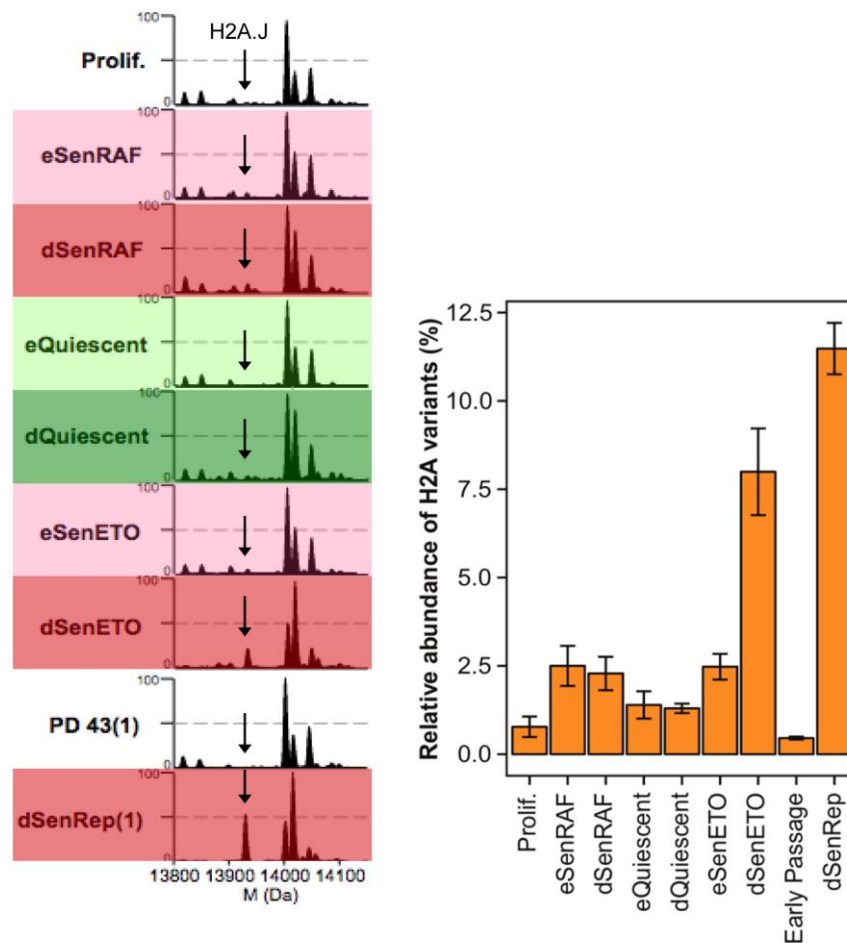


**Figure 19. Protocole d'analyse de la sénescence à différents temps et avec plusieurs inducteurs de sénescence.**

**SenRAF** : sénescence par activation d'un oncogène. **SenETO** : sénescence par dommages à l'ADN. **SenRep** : sénescence répliquative. Contrôle réalisé avec des cellules **quiescentes** induites par une carence en sérum (cellules non proliférantes mais non-sénescentes). Deux temps furent considérés : un temps précoce (5 jours) qualifié de « early » et un temps plus tardif (21 jours) qualifié de « deep ».

Parmi les résultats obtenus, K. Contrefois a mis en évidence l'accumulation spécifique d'un variant de H2A dans des conditions de sénescence présentant des dommages persistants à l'ADN. Ce variant, nommé H2A.J, compose 1% de la quantité totale des H2A en prolifération. Tandis que cette quantité peut atteindre 7 à 11% dans des conditions de sénescence avec dommages à ADN (figure 20).





**Figure 20. H2AJ est enrichi avec le temps dans des conditions de sénescence à long terme induite par des dommages à l'ADN**

**A)** Spectre de masse déconvolué d'histone H2A2. **B)** Abondance relative des protéines H2AJ par rapport aux autres isoformes de H2A2. La légende est identique à celle de la figure 19.

## 2.2 Les spécificités du variant H2A.J

Ce variant fut découvert pour la première fois chez la souris (Nishida et al. 2005). A l'inverse de la plupart des variants de la famille H2A, le gène H2AFJ codant pour H2A.J n'est pas localisé au niveau des clusters classiques de H2A. Ce gène est en effet, situé sur le chromosome 12 à la bande cytogénétique p12.3. (Rosen et al. 2003)

Le gène H2AFJ s'exprime indépendamment de la réplication, la quantité totale de l'ARNm augmente légèrement en absence de prolifération mais à un niveau qui ne peut expliquer l'augmentation de la quantité de protéine H2AJ. (**figure 21**)



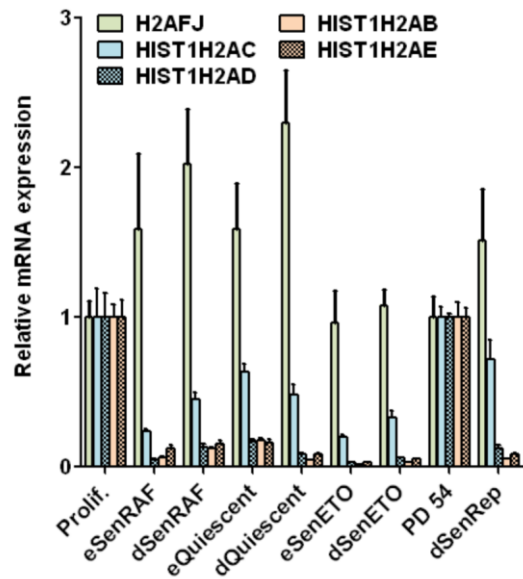


Figure 21. Quantification de l'ARNm des H2A en sénescence et en quiescence. La légende est identique à celle de la figure 19.

Seul un messenger polyadénylé existe pour H2AFJ. Cela pourrait provenir de la présence d'une insertion de 214 pb dans son motif tige-boucle. Cette particularité de séquence serait à l'origine de son expression constitutive.

L'accumulation observée de la protéine H2A.J en sénescence proviendrait donc d'un phénomène post-transcriptionnel.

La séquence de H2A.J possède des spécificités intéressantes. (figure 22)

	1		50
Histone H2A_Sc	SGGKGGKAGS	AAKASQSRSA	KAGLTFPVGR VHRLLRGNY AQRIGSGAPV
Histone H2A.J_Hs	-SGRGKQGGK	VRAKAKSRSS	RAGLQFPVGR VHRLLRKGY AERVGAGAPV
Histone H2A.X_Hs	-SGRGKTGGK	ARAKAKSRSS	RAGLQFPVGR VHRLLRKGY AERVGAGAPV
Consensus	.sGrGk.gGk	arakakSRSS	rAGLqFPVGR VHRLLRkGny A#R!GaGAPV
	51		100
Histone H2A_Sc	YLTAVLEYLA	AEILELAGNA	ARDNKKTRII PRHLQLAIRN DDELNKLLGN
Histone H2A.J_Hs	YLAAVLEYLT	AEILELAGNA	ARDNKKTRII PRHLQLAIRN DEELNKLLGK
Histone H2A.X_Hs	YLAAVLEYLT	AEILELAGNA	ARDNKKTRII PRHLQLAIRN DEELNKLLGG
Consensus	YLaAVLEYLt	AEILELAGNA	ARDNKKTRII PRHLQLAIRN D#ELNKLLG.
	101		143
Histone H2A_Sc	VTIAQGGVLP	NIHQNLLPKK	SA----- ----KATKAS QEL
Histone H2A.J_Hs	VTIAQGGVLP	NIQAVLLPKK	TESQKTKSK
Histone H2A.X_Hs	VTIAQGGVLP	NIQAVLLPKK	TSATVGPKAP SGGKATQAS QEY
Consensus	VTIAQGGVLP	NIqavLLPKK	t..... ....kat.as qe.

Figure 22. Alignement de séquences de l'histone H2A canonique de la levure *Saccharomyces Cerevisiae* (Sc) et des histones H2AJ et H2AX humaines (Hs)

Les sérines phosphorylables sont encadrées en orange. Les acides aminés en rouge sont conservés dans toutes les séquences, les acides aminés en bleu sont conservés dans la majorité des séquences et les acides aminés en noir présentent une différence. Alignement réalisé grâce à Multalin par (Contrepois et al. 2012).

C'est, avec H2AX, la seule histone possédant un motif SQ (sérine-thréonine) de phosphorylation en position 123. La queue C-terminale de H2AJ est également plus courte, rendant ce motif moins accessible que celui de H2A.X. Enfin, sur l'extrémité N-ter, H2A.J possède une Valine à la place d'une Alanine en position 11 : une particularité que seul H2AJ possède parmi les variants de H2A. Cette modification se traduit par la présence d'un groupement diméthyl supplémentaire sur l'histone. Cette particularité pourrait être interprétée comme une forme méthylée de l'alanine, or, nous avons vu dans le chapitre précédent l'importance que pouvait avoir les modifications d'histones sur la chromatine.

### **2.3 H2A.J dans la littérature.**

Aucune étude ne se concentre exclusivement sur l'étude de la protéine H2A.J. Cette protéine ou son gène n'apparaît qu'en de rares occasions dans le contexte d'étude protéomique ou transcriptomique plus générale. Il est toutefois possible de trouver quelques informations sur le gène H2AFJ. Comme vu précédemment, ce gène est exprimé tout au long du cycle cellulaire mais peut posséder des spécificités d'expression dans certains tissus ou type cellulaires. Ce gène semble être surexprimé dans certains cancers, notamment certains cancers du sein (Yao et al. 2006), au niveau des cellules luminales B (Cornen et al. 2014) ou dans des maladies pulmonaires : tuberculose, sarcoïdose pulmonaire, cancer des poumons (Bloom et al. 2013). Il a également été montré que l'expression de ce gène augmente avec l'âge dans des cellules photoréceptrices de l'œil (Parapuram et al. 2010). Pourtant, on le retrouve réprimé dans les lésions tumorales mélanocytaires (de Wit et al. 2005) et une étude, se focalisant sur les effets de la délétion de la sialoprotéine osseuse dans la métastase de cancers du sein, fait le lien entre une augmentation de l'expression de H2AFJ et des effets antiprolifératifs (Kovacheva et al. 2014). Cela pourrait suggérer que la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle de H2AJ est contexte-dépendant : cancer, prolifération, sénescence, vieillissement,...

## **Description du projet de thèse**

La sénescence cellulaire est une réponse à un stress des cellules de mammifères se caractérisant entre autres par un arrêt durable du cycle cellulaire, des modifications morphologiques, la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (SASP) et une altération de la structure de la chromatine. Ce phénotype peut être induit par divers stimuli. A l'origine, seul le raccourcissement trop important des télomères était connu comme responsable de la sénescence cellulaire. Cependant, il a depuis été montré que la sénescence peut résulter de conditions de culture inadéquates, de l'induction d'un oncogène ou d'un stress génotoxique. De plus, les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus et organes. Or, les facteurs sécrétés par les cellules sénescents (SASP)

peuvent perturber les capacités multipotentes des cellules souches humaines ainsi que la structure et la fonction des tissus en affectant la croissance et la migration cellulaire, l'architecture des tissus, la formation des vaisseaux sanguins et la différenciation. L'action paracrine de certains facteurs protéiques (IL6, IL8, VEGF, MMP3,...) semblerait contribuer à la promotion de tumeurs (Bartholomew et al. 2009). Il a d'ailleurs été démontré que la destruction sélective de cellules sénescents in-vivo (ou la suppression de leurs effets néfastes tel que leur sécrétome à l'effet délétère) permettrait de lutter contre ces maladies liées au vieillissement et prolongerait la durée de vie (Baker et al. 2011). De plus, les mécanismes liés à l'activation du phénotype sécrétoire de la sénescence sont encore peu connus et il en est donc difficile de contrer ses effets.

Cependant, il est encore difficile à l'heure actuelle d'identifier facilement des cellules sénescents in-vivo, des marqueurs existent (SA-B-Gal, activation de réseaux suppresseur de tumeurs p16, p21, p53 ou sécrétion du SASP) mais utilisés indépendamment, ces marqueurs ne sont pas spécifiques à la sénescence et c'est l'utilisation conjointe de plusieurs d'entre eux qui permet l'identification de cellules sénescents sans équivoque (Sharpless & Sherr 2015). Etudier l'état de la chromatine des cellules sénescents est un domaine de recherche prometteur car ces cellules présentent une réorganisation profonde de leur chromatine (formation de SAHFs, accumulation de marques épigénétiques ou de variants d'histones) qui contribue vraisemblablement à l'altération du transcriptome et à la maintenance de l'état sénescents (Rai & Adams 2012; Salama et al. 2014).

Les travaux de notre laboratoire se focalisent sur les mécanismes régulant l'induction et la maintenance de la sénescence. Des résultats récents ont mis en évidence de nombreuses modifications de la chromatine associées à la sénescence cellulaire. Notre laboratoire a développé une méthode de profilage des histones par spectrométrie de masse (Contrepois et al. 2010) et l'a utilisée afin de caractériser les histones des cellules humaines en sénescence. Au niveau des modifications post-translotionnelles des histones, notre équipe a observé une réduction globale de l'acétylation de H4-K16 dans plusieurs types de sénescence qui contribue à la formation des foyers d'hétérochromatine (Contrepois et al. 2012). Lors de ces analyses, a également été mis en évidence l'accumulation d'un variant d'histone dans les cas où la sénescence s'accompagne de dommages persistants à l'ADN. Ce variant, H2A.J, représente 1% de la quantité totale d'histones H2A dans des fibroblastes humains en prolifération, mais atteint près de 20 % après trois semaines de sénescence.

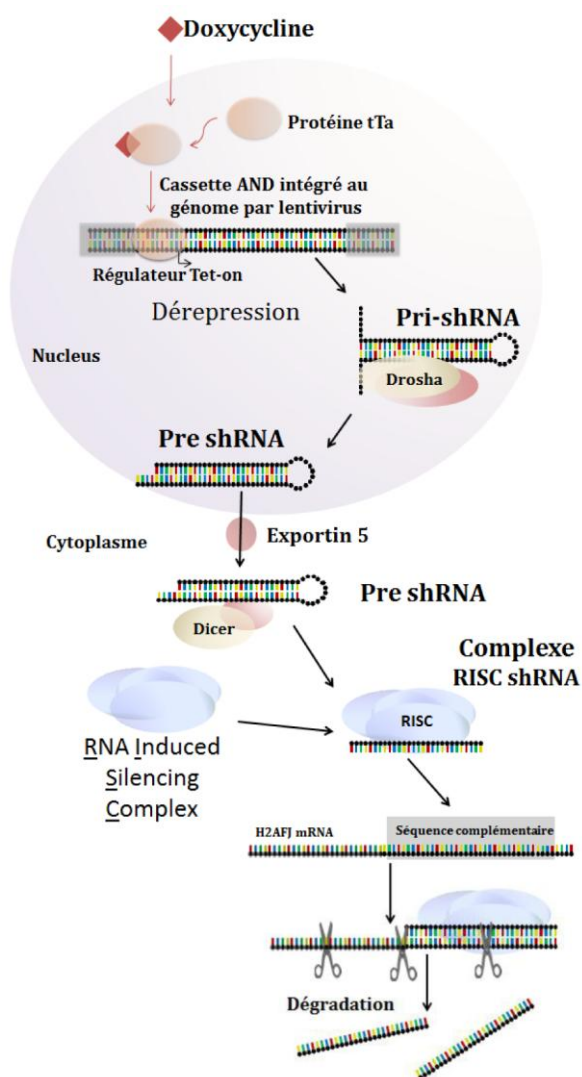
Ce projet de thèse se concentre sur la compréhension de la fonction du variant H2A.J en utilisant une technique d'interférence par ARN.

## Stratégie d'analyse

### Création de lignées de fibroblastes immortalisées au gène H2AFJ inactivé

#### ARN interférence

L'utilisation d'ARN interférents est un outil puissant pour l'étude de la fonction d'un gène chez les cellules de mammifères. Le mécanisme des ARN interférents repose sur une dégradation séquence-spécifique des ARNm de la cellule par l'apport de séquence d'ARN double brin (dsRNA) identique à la séquence cible (Fire et al. 1998). La dégradation de l'ARN cible fait intervenir le complexe multiprotéique RISC (RNA-induced silencing complex). Un des brins de l'ARN interférent est chargé sur le complexe RISC avec l'aide de la protéine Argonaute (Ago). Le complexe RISC va alors cibler la séquence complémentaire sur l'ARNm qui sera par la suite clivée par Ago au centre de la séquence (Elbashir et al. 2001). Les restes de nucléotides seront par la suite dégradés par d'autres nucléases (**figure 23**).



Plusieurs méthodes existent pour introduire les ARN interférents dans les cellules. Nous avons choisi d'utiliser un système inductible de shARNs (short hairpin ARN). Leur production est réalisée par la cellule elle-même suite à la transfection par un lentivirus. Le gène du shARN ciblant H2AJ est le plus souvent sous le contrôle d'un promoteur tet-on (TripZ©) sensible à la tétracycline (ou son dérivé la doxycycline). (Gossen & Bujard 1992). Ainsi, la protéine transactive de la tétracycline tTA (Allen et al. 2000) est capable de se lier à l'opérateur TetO spécifiquement uniquement en présence de Tétracycline (ou Doxycycline), ce qui permet l'induction de l'expression des shARNs.

Pour certaines expériences, le gène exprimant le shARN ciblant les ARNs de H2AFJ est sous le contrôle d'un promoteur constitutif de GIPZ© qui réprime donc H2AFJ de manière continue.

**Figure 23.** Schéma du système d'induction utilisé pour l'inactivation du gène H2AFJ.

### Création et validation des lignées

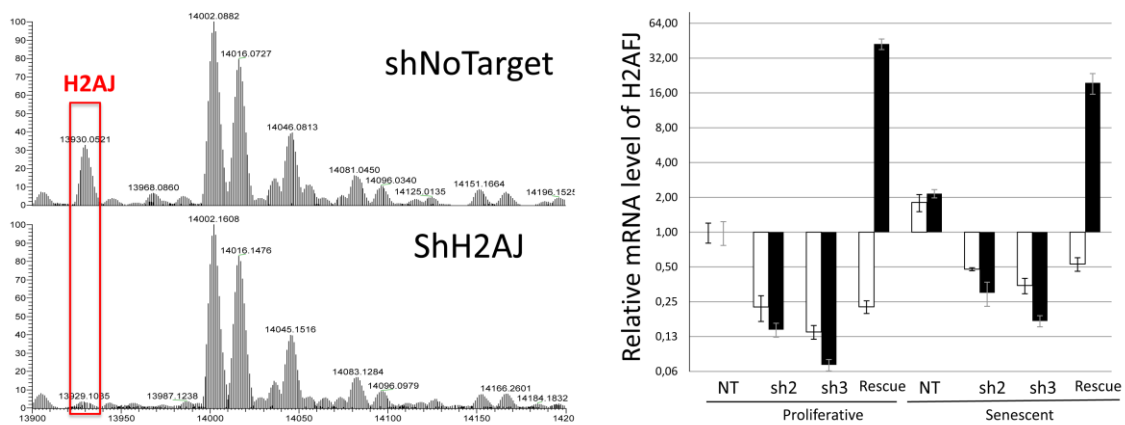
Différents shARNs furent utilisés pour transfecter plusieurs lignées de fibroblastes préalablement immortalisés avec hTert. Les quatre principales lignées utilisées furent les suivantes :

shNoTarget	shH2AJ #2	shH2AJ #3	Rescue
Ce shARN ne cible aucun ARNm	Ce shARN dont la séquence cible les ARNs du gène H2AFJ	Ce shARN dont la séquence cible les ARNs du gène H2AFJ	Exprime le shARN H2AJ #2 ainsi qu'une version altérée de H2AFJ résistance au shH2AJ #2
Cette lignée sert de contrôle pour les autres lignées	Ces deux shARN ne ciblent pas la même séquence sur l'ARNm		Cette lignée permet de retrouver le phénotype qui pourrait être perdu l'utilisation des shH2AJ

**Table 2. Lignées les plus couramment utilisées pour l'étude de H2AJ sur ce projet.**

L'utilisation de deux shARN différents et d'une lignée *rescue* permet de limiter les effets off-target du shARN et de confirmer que tout phénotype perdu par l'usage de shARN est bien dû à la perte de H2AJ.

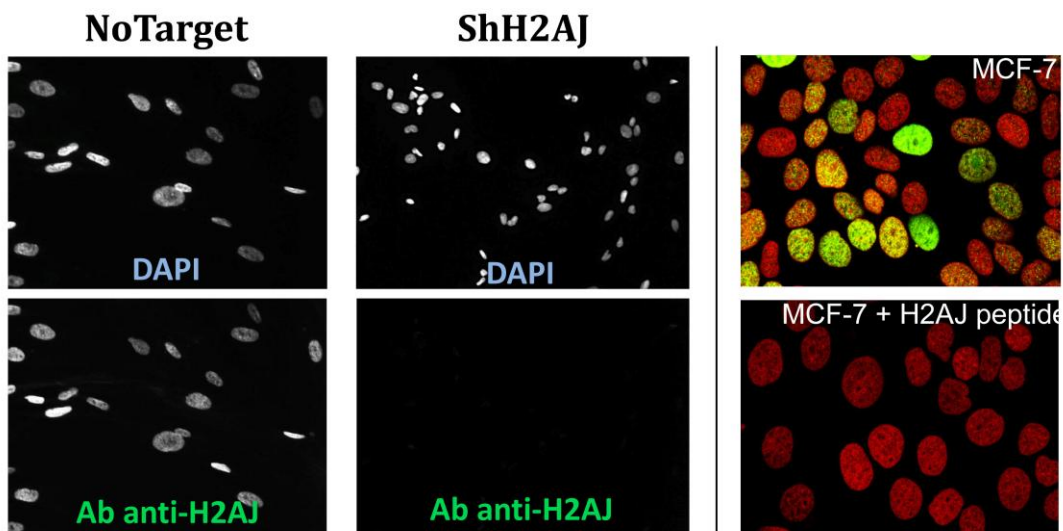
Ces lignées furent vérifiées par qPCRs, Western blot et spectrométrie de masse (**figure 24**).



**Figure 24. Spectres déconvolués des histones H2A2 pour les lignées NT et shH2AJ - Quantité relative d'ARNm obtenus par qPCR de H2AJ endogène (en blanc) et totale : endogène et ectopique (en noir)**

### Création d'un anticorps anti-H2AJ spécifique

En collaboration avec Marie-Claire Nevers et Hervé Volland du laboratoire d'études et de recherches en immunoanalyse du CEA, nous avons créé un anticorps ciblant spécifiquement H2AJ au niveau de la séquence spécifique située en position 120-129 : **CTESQKTKSK**. Cet anticorps fut développé à partir de deux lapins et purifié à partir du sérum obtenu après trois injections successives du peptide. Il fut vérifié grâce à nos lignées où H2AJ est invalidé et à l'aide d'un peptide compétiteur (**figure 25**).



**Figure 25. Vérification de l'anticorps anti-H2AJ**

A gauche, Immunofluorescences sur les lignées WI38hT NoTarget et WI38hT shH2AJ #3. En haut, le signal montre la chromatine avec une révélation au DAPI. A droite, Immunofluorescences sur cellules MCF7. H2AJ apparaît en vert et le signal DAPI apparaît en rouge. L'image du bas a été réalisée en utilisant le peptide compétiteur de l'anticorps anti-H2AJ.

# RESULTATS

---

## Introduction

Les variants d'histones jouent un rôle critique dans la régulation de la structure de la chromatine et dans la régulation épigénétique. Bien que la chromatine des organismes eucaryotes partagent la même structure nucléosomale, les procédés dynamiques responsables de l'hétérogénéité observée à travers le génome sont régulés par trois grands mécanismes : l'existence de modifications post-traductionnelles sur les histones (Jenuwein & Allis 2001), l'action de complexes de remodelage de la chromatine (Owen-Hughes 2003) et enfin le remplacement des histones canoniques par des variants aux fonctions spécifiques (Henikoff & Ahmad 2005).

Lors de la sénescence, l'accumulation spécifique d'un variant d'histone au détriment de la forme canonique suggère en effet un impact sur l'architecture de la chromatine et la réalisation d'une fonction spécifique.

Les premières études réalisées sur l'impact de H2A.J ont permis d'écarter les fonctions les plus évidentes. Ainsi, nous savons que la déplétion de H2A.J n'a aucun effet significatif sur la prolifération, la morphologie des cellules sénescents, leur viabilité ou encore leur entrée et maintien en sénescence.

Nous nous sommes alors concentrés sur la recherche de la fonction de H2A.J lors de la sénescence. Grâce à des études transcriptomiques sur nos lignées exprimant un système d'interférence de l'ARN, nous avons pu montrer l'impact de H2A.J sur l'expression génétique. Les résultats sont formalisés dans un manuscrit soumis à Nature Communications consultable ci-après.

En supplément des données soumises à publication, plusieurs résultats ont été obtenus et seront fournis à la suite du manuscrit. Ces résultats nécessitent pour beaucoup d'entre eux d'être reproduits afin d'être validés mais ils permettent d'apporter des compléments d'informations concernant le mécanisme et les modalités d'action de H2A.J.

Ces résultats seront ensuite discutés à la lumière des données soumises à la revue par nos pairs et permettront d'appréhender les perspectives futures pour le projet d'étude de H2A.J.



ARTICLE

Received 11 Jul 2016 | Accepted 20 Feb 2017 | Published xx xxx 2017

DOI: 10.1038/ncomms14995

OPEN

# Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression

Kévin **Contrepois**<sup>1,2,\*</sup>, Clément **Coudereau**<sup>1,\*</sup>, Bérénice **Benayoun**<sup>2,3</sup>, Nadine **Schuler**<sup>4</sup>, Pierre-François **Roux**<sup>5</sup>, Oliver **Bischof**<sup>5</sup>, Régis **Courbeyrette**<sup>1</sup>, Cyril **Carvalho**<sup>1</sup>, Jean-Yves **Thuret**<sup>1</sup>, Zhihai **Ma**<sup>2</sup>, Céline **Derbois**<sup>6</sup>, Marie-Claire **Nevers**<sup>7</sup>, Hervé **Volland**<sup>7</sup>, Christophe **Redon**<sup>8</sup>, William **Bonner**<sup>8</sup>, Jean-François **Deleuze**<sup>6</sup>, Clotilde **Wiel**<sup>9</sup>, David **Bernard**<sup>9</sup>, Michael **Snyder**<sup>2</sup>, Claudia E. **Rübe**<sup>4</sup>, Robert **Olaso**<sup>6</sup>, François **Fenaille**<sup>10</sup> & Carl **Mann**<sup>1</sup>

The senescence of mammalian cells is characterized by a proliferative arrest in response to stress and the expression of an inflammatory phenotype. Here we show that histone H2A.J, a poorly studied H2A variant found only in mammals, accumulates in human fibroblasts in senescence with persistent DNA damage. H2A.J also accumulates in mice with aging in a tissue-specific manner and in human skin. Knock-down of H2A.J inhibits the expression of inflammatory genes that contribute to the senescent-associated secretory phenotype (SASP), and over-expression of H2A.J increases the expression of some of these genes in proliferating cells. H2A.J accumulation may thus promote the signalling of senescent cells to the immune system, and it may contribute to chronic inflammation and the development of aging-associated diseases.

<sup>1</sup>Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France. <sup>2</sup>Department of Genetics, Stanford University, Stanford, California 94305-5120, USA. <sup>3</sup>Paul F. Glenn Laboratories for the Biology of Aging, Stanford University. <sup>4</sup>Department of Radiation Oncology, Saarland University, Homburg (Saar), Germany. <sup>5</sup>Institut Pasteur/INSERM U933, Laboratory of Nuclear Organization and Oncogenesis, Department of Cell Biology and Infection, 75015 Paris, France. <sup>6</sup>CEA, CNG, 91057 Evry, France. <sup>7</sup>CEA, Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), INRA, Université Paris-Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France. <sup>8</sup>Laboratory of Molecular Pharmacology, N.C.I., N.I.H., Bethesda, Maryland 20892, USA. <sup>9</sup>Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard, Université de Lyon Lyon, France. <sup>10</sup>CEA, IBITECS, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, UMR 0496, Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, MetaboHUB-Paris, Université Paris Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette cedex, France. \* These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.M. (email: carl.mann@cea.fr).



Mammalian cellular senescence is a process in which cells lose their ability to proliferate, accompanied in most cases by the expression of an inflammatory phenotype called the senescent-associated secretory phenotype (SASP)<sup>1</sup>. Cellular senescence has most often been studied as a response to stresses that can damage DNA or destabilize the genome, such as the loss of telomere sequences or oxidative stress. Remarkably, senescence can also be induced by the expression of hyper-mitogenic oncogenes in non-transformed cells<sup>2</sup>. These features led to the recognition of senescence as an important tumour suppressor mechanism that blocks the proliferation of cells with tumorigenic potential. The SASP has been implicated in the signalling of senescent cells to the immune system for their elimination and for wound healing<sup>1,3–5</sup>. Recent data suggest that there are functionally distinct senescent states depending on the stress-inducing condition, the cell type, and the time that the cells were maintained in senescence<sup>6</sup>. Important distinctions include senescence with or without persistent DNA damage that would lead to the activation of distinct signalling pathways. Unfortunately, few molecular correlates and biomarkers have been defined for these senescent states. The chromatin of senescent cells is a promising area to explore because senescent cells have striking modifications in chromatin that likely contribute to differential genome expression and the maintenance of the senescent state<sup>7,8</sup>. Chromatin is composed of DNA wrapped around nucleosomes that are formed from histones and associated proteins that bind DNA or the histones. The canonical histones are highly synthesized in S phase to package the newly replicated DNA<sup>9</sup>. Non-canonical histone variants are endowed with specific functional properties determined by their diverged protein sequences and their constitutive expression in contrast to the replication-dependent expression of the canonical histones<sup>10</sup>. Some variants are highly diverged, whereas others, such as H3.3, exhibit major functional differences with just four amino acid substitutions relative to canonical H3.2 (ref. 11). Recent examples of roles for histone variants in senescence include an N-terminal proteolysis of histone H3.3 in senescence that was implicated in the repression of proliferation genes<sup>12</sup>, and a role for macro-H2A1 in the expression and the feedback regulation of SASP gene expression during RASval12-induced senescence<sup>13</sup>. The histone H3-K4 methyl-transferase MLL1 was also shown to be indirectly required for expression of the SASP during oncogene-induced senescence through the transcriptional activation of pro-proliferative genes and activation of the ATM kinase<sup>14</sup>.

In this work, we describe the first, to the best of our knowledge, characterization of histone variant H2A.J, that differs from canonical H2A by only five amino acids, and its putative functional importance in senescence, aging and cancer.

## Results

### H2A.J accumulates in senescent fibroblasts with DNA damage.

We used mass spectrometry to analyze histones in human fibroblasts in proliferation, quiescence (serum starvation), and various senescent states using a combined top-down and bottom-up approach that we developed<sup>15,16</sup>. As previously described<sup>16</sup>, we examined fibroblasts in replicative senescence, oncogene-induced senescence, and DNA-damage-induced senescence. We also compared cells maintained in senescence or quiescence for short (5 days, early) or longer (20 days, deep) time periods (Fig. 1a). Replicative senescence of non-immortalized fibroblasts was induced by the continual passage of cells until the proliferative arrest of the cultures (~65 population doublings). Oncogene-induced senescence was provoked by the expression of activated forms of the RAF1 kinase or by RASval12 in WI-38 or IMR90 fibroblasts

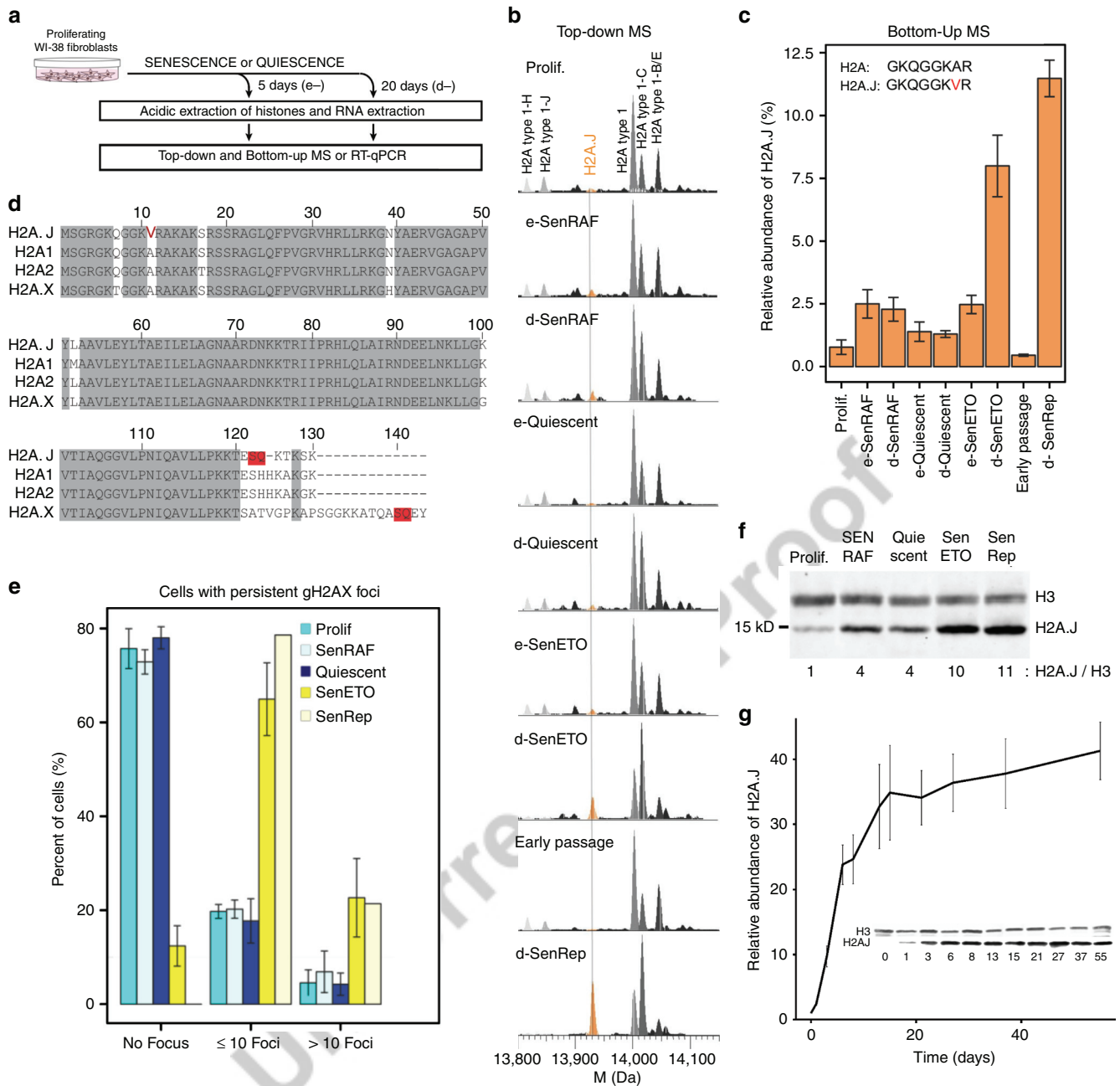
immortalized with hTERT, and sustained exposure to 20  $\mu$ M etoposide was used to induce senescence of WI-38hTERT fibroblasts by the creation of persistent DNA double-strand breaks. Senescence was verified by the induction of a durable proliferative arrest, the expression of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity (SA- $\beta$ -gal), the cell cycle inhibitors p16 and p21, and a characteristic senescence transcriptome (see below).

Remarkably, we found that the H2A.J histone variant (Uniprot Q9BTM1, encoded by the unique *H2AFJ* gene) is present at low levels ( $\approx$ 1% of canonical H2A species) in proliferating human fibroblasts, but accumulated  $\approx$ 10-fold in the chromatin of fibroblasts in senescence with persistent DNA damage (replicative senescence and etoposide-induced senescence) over a period of 20 days (Fig. 1b–e and Supplementary Figs 1 and 2). Our histone profiling also revealed changes in the levels of some canonical H2A species. The proportion of canonical H2A-type 1C (Uniprot Q93077) increased in all non-proliferative states (quiescence and senescence), whereas other canonical histones, such as the H2A-type 1 (Uniprot P0C0S8) and H2A-type 1B/E (Uniprot P04908), decreased in senescent cells with persistent DNA damage. However, H2A.J was the only H2A species that was present at low levels in proliferating cells and high levels in senescent cells with DNA damage.

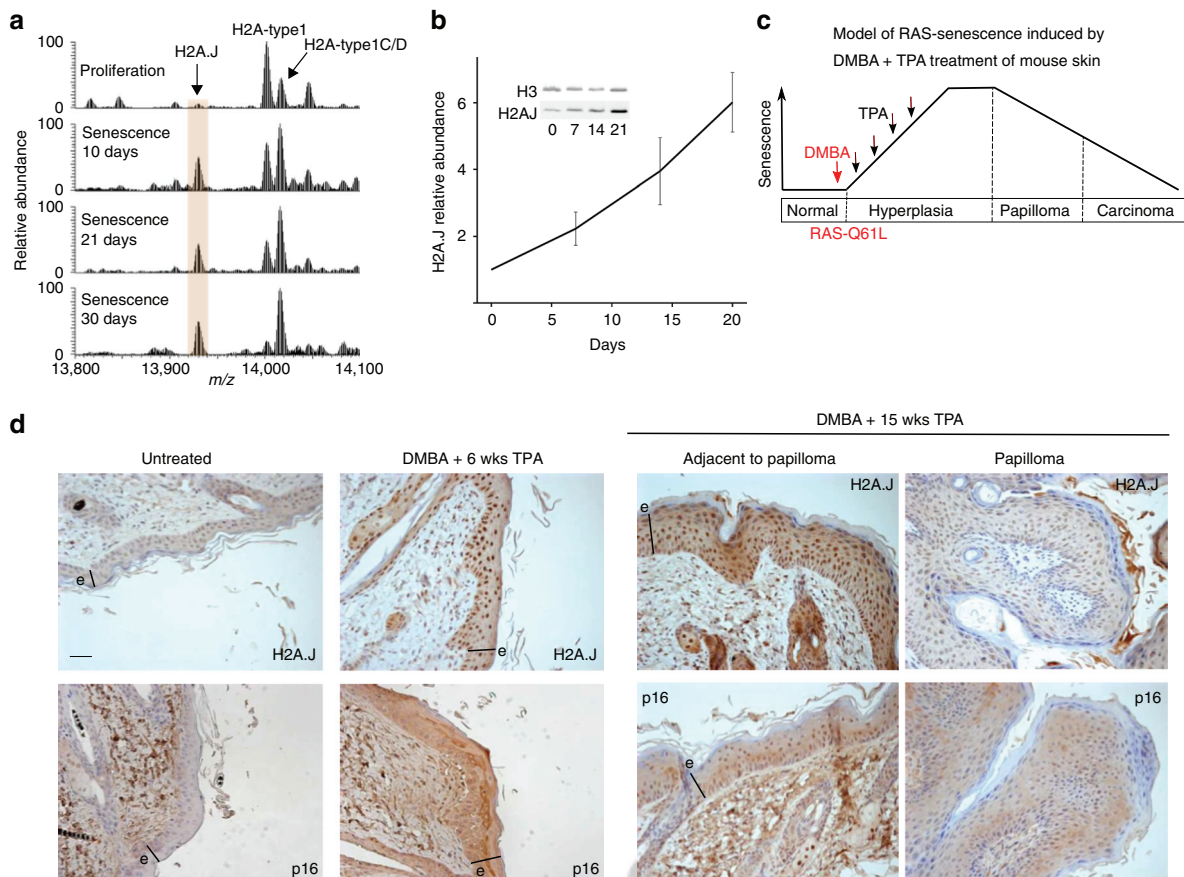
The human genome contains 26 genes encoding 11 canonical H2A species and 8 H2A variants (Supplementary Fig. 2 and <http://www.actrec.gov.in/histome/histones.php?histone=H2A>)<sup>17</sup>. H2A.J is a poorly studied H2A variant that has never been described at the protein level. It differs from canonical H2A protein sequences only by an A11V substitution and the presence of an SQK motif near the C-terminus (Fig. 1d and Supplementary Fig. 2). Phylogenetic analyses indicate that H2A.J is specific to mammalian organisms (Supplementary Fig. 3). The canonical histone genes are principally expressed in S phase, whereas the *H2AFJ* gene is expressed constitutively through the cell cycle<sup>18</sup>. Canonical histones are encoded by multiple genes that are mostly clustered on human chromosomes 1 and 6, whereas the unique *H2AFJ* gene is located on human chromosome 12. These features of the H2A.J histone variant and its striking accumulation in senescent fibroblasts with persistent DNA damage incited us to embark on its detailed characterization.

In contrast to replicative and etoposide-induced senescence, fibroblasts in quiescence or RAF-induced senescence contained few cells with persistent  $\gamma$ H2AX foci (Fig. 1e) and contained lower levels of H2A.J (Fig. 1b,c). These results were confirmed by Western blotting (Fig. 1f) with a homemade anti-H2A.J antibody (see below and Methods section for a description of the antibody). Thus, maximal accumulation of H2A.J was correlated with a senescent proliferative arrest associated with persistent DNA damage. A detailed time course tracking H2A.J accumulation in WI-38hTERT cells induced into senescence with etoposide showed that H2A.J levels increased rapidly for 1–2 weeks and then more slowly over the next month (Fig. 1g). This extended accumulation is not consistent with an acute short-term response to DNA damage.

Senescence of human fibroblasts induced by the RASval12 oncogene is associated with a higher level of DNA damage than senescence induced by an activated RAF kinase<sup>19–21</sup>. Consistent with this difference, we observed an accumulation of H2A.J in IMR90hTERT fibroblasts induced into senescence by RASval12 (Fig. 2a,b). We also exploited the well-known model of DMBA/TPA skin carcinogenesis<sup>22</sup> to test for accumulation of H2A.J in an in vivo model of RAS-induced senescence of mouse epithelial cells<sup>23</sup>. Treatment of mouse skin with a single application of the carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) mutagenizes the epidermal cells. Activating mutations of the *H-RAS* gene within keratinocyte stem cells are initiating events for tumorigenesis.



**Figure 1 | H2A.J accumulates in senescent human fibroblasts with persistent DNA damage.** (a) Experimental plan. (b–f) WI-38hTERT-GFP-RAF-ER fibroblasts<sup>21</sup> were induced into senescence by a hyperactive RAF kinase for 5 days (e-SenRAF) or 20 days (d-SenRAF), into quiescence by serum starvation for 5 days (e-Quiescent) or 20 days (d-Quiescent), or into senescence by treatment with 20 μM etoposide for 5 days (e-SenETO) or 20 days (d-SenETO). Histones and RNAs were extracted from these cells and from non-immortalized proliferating WI-38 fibroblasts (Early Passage) and the same cells maintained in replicative senescence for 20 days (d-SenRep). (b) Top-down deconvoluted mass spectra of intact histone H2A2 proteins showing accumulation of H2A.J (orange) only in samples derived from senescent cells with persistent DNA damage (d-SenETO and d-SenRep—see e below). Canonical H2A2 species are in grey (Supplementary Figs 1,2 for details). (c) Relative abundance of H2A.J versus all canonical H2A species determined by quantifying the Gly5-Arg12 tryptic peptide from H2A.J versus the same peptide from all canonical H2A species (Fig. 1d and Supplementary Fig. 2). Shown are the mean and s.d. for 4 biological replicates, except ‘Early Passage’ and ‘d-SenRep’ (2 biological replicates). (d) Sequence alignment of human H2A.J, H2A fraction 1 (H2A1), H2A fraction 2 (H2A2), and H2A.X. H2A.J is distinguished by Val11 and, like the H2A.X variant, by the presence of an SQ motif near the C-terminus (boxed in red). (e) Percent cells expressing the indicated number of γH2AX foci, a marker of DNA damage. Most SenETO and SenRep fibroblasts contained multiple foci, whereas most fibroblasts in proliferation, quiescence, or senescence induced by a hyperactive RAF kinase (SenRAF) contained no foci. Mean and s.d. from a minimum of 2 biological replicates. (f) Western blot of acid-extracted histones from fibroblasts as indicated. The H2A.J/H3 levels were normalized to the ratio in proliferation. (g) Time course of H2A.J accumulation during etoposide-induced senescence of WI-38hTERT fibroblasts by Western blotting. The error bars show the s.d. from three biological replicates.



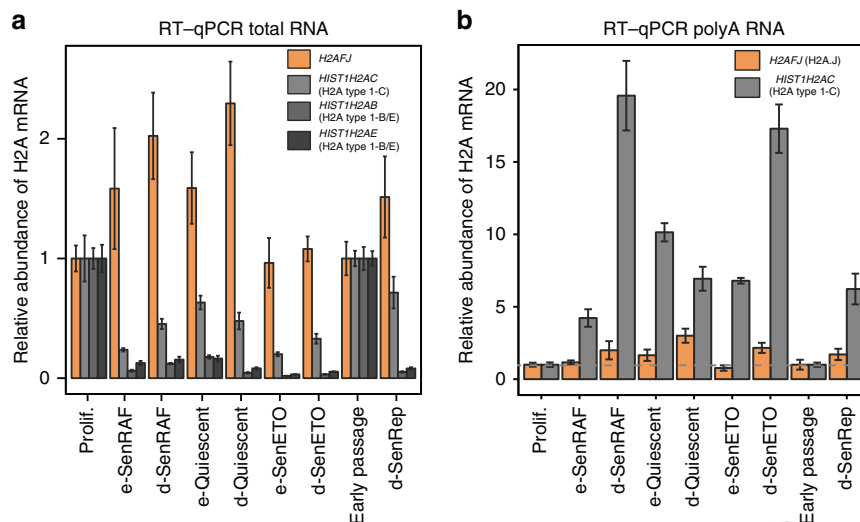
**Figure 2 | H2A.J accumulates during RAS-induced senescence *in vitro* and *in vivo*.** (a) H2A.J accumulates in IMR90hTERT fibroblasts induced into senescence by activation of an ER-RASval12 fusion protein with 4-hydroxy-tamoxifen (4-HT). Shown are top-down deconvoluted mass spectra of intact H2A2 proteins. The H2A.J peak increased significantly by 10 days of RAS-induced senescence. The sample of cells in senescence for 30 days represents an independent biological replicate relative to the samples in 10 and 21 days of senescence. (b) Immunoblot showing the time course of accumulation of H2A.J after addition of 4-HT to induce senescence. The H2A.J relative abundance was determined by normalizing the H2A.J/H3 signal to that of proliferating cells (0 days 4-HT). The error bars show the s.d. of two technical replicates. These data represent an independent biological replicate relative to the two cultures in a. (c) Schematic model showing that DMBA treatment induces the RAS-Q61L activating mutation<sup>22</sup> and subsequent TPA treatment stimulates proliferation and the induction of senescence markers<sup>23</sup>. Continued TPA treatment leads to occasional papillomas that have escaped or bypassed senescence. (d) H2A.J accumulates in mouse epidermal cells in a model of RAS-induced senescence *in vivo*. Immunohistochemical analysis of H2A.J and p16-INK4A in mouse sections treated once with DMBA and then twice weekly with TPA for 6 or 15 weeks. Note the increased H2A.J and p16 staining in the epidermis treated with DMBA + 6 weeks of TPA. The epidermal layer is indicated by the black line labelled 'e'. Scale bar: 30 microns. Occasional papillomas that developed after DMBA + 15 weeks of TPA treatment showed reduced H2A.J and p16 staining compared to the adjacent treated skin.

However, tumour progression requires promotion by repeated application of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) that stimulates the proliferation of the keratinocytes expressing activated RAS (Fig. 2c). We previously showed that DMBA + TPA-treated skin becomes populated with senescent keratinocytes as revealed by senescent markers such as SA- $\beta$ -gal, p16, DEC1 and Dcr2 (ref. 23). Continued TPA treatment leads to papillomas that are composed of keratinocytes showing reduced expression of these senescent markers and increased expression of Ki-67. Immunohistochemical staining showed that H2A.J and p16 levels increased in mouse epidermis treated with DMBA + TPA for 6 weeks (Fig. 2d). Further treatment until 15 weeks led to the outgrowth of occasional papillomas. H2A.J and p16 staining was elevated in the skin adjacent to the papillomas, but reduced in the cells forming the papilloma. These data are consistent with an accumulation of H2A.J in keratinocytes induced into senescence by the active RAS oncogene *in vivo*.

**H2A.J accumulation involves a post-transcriptional component.** We tested whether mRNA levels were correlated with the protein

levels of the H2A variants (Fig. 3 and Supplementary Fig. 4). Unlike most mRNAs, canonical histone mRNAs contain a 3' untranslated region (UTR) stem-loop motif instead of a polyA tail. To provide histones for packaging newly synthesized DNA into nucleosomes, canonical histone mRNA levels peak in S phase through transcriptional activation and post-transcriptional processing of mRNA at the 3'-UTR stem-loop motif by the SLBP (stem-loop binding protein) pathway<sup>9</sup>. SLBP and canonical histone mRNAs are turned over rapidly in non-proliferating cells. With the exception of *HIST1H2AC* mRNA, most of the canonical H2A mRNAs dropped dramatically in non-proliferating cells (Fig. 3a), as expected from their known transcriptional and post-transcriptional regulation<sup>9</sup>. The persistence of *HIST1H2AC* mRNA in non-proliferating cells may be explained by the presence of a polyadenylation site downstream of its stem-loop motif. Polyadenylated *HIST1H2AC* mRNA indeed accumulated in quiescent and senescent fibroblasts (Fig. 3b) and likely contributes to the accumulation of H2A-type 1C protein in these states (Fig. 1b). In contrast to the canonical histone genes, *H2AFJ* expression was equal or higher in non-proliferating (quiescent and senescent) human fibroblasts compared to proliferating fibroblasts (Fig. 3a and Supplementary Fig. 4),





**Figure 3 | RNA levels of *H2AFJ* and selected canonical H2A species.** RNA levels are compared in senescent or quiescent cells relative to proliferating cells. Random primers were used to prepare cDNA to quantify total RNA (a) whereas oligo dT was used to prepare cDNA to quantify polyA RNA (b). Shown are the mean and s.d. for triplicate qPCR values from single samples. A second biological replicate from total RNA is shown in Supplementary Fig. 4. RNA levels were normalized to *GAPDH* mRNA and to the levels of the respective histone mRNAs in proliferating fibroblasts. RNAs were extracted from proliferating WI-38hTERT-GFP-RAF-ER fibroblasts (Prolif.), the same cells induced into quiescence by serum starvation for 5 days (e-Quiescent) or 20 days (d-Quiescent), induced into senescence by the expression of a hyperactive RAF kinase for 5 days (e-SenRAF) or 20 days (d-SenRAF), or induced into senescence by treatment with etoposide for 5 days (e-SenETO) or 20 days (d-SenETO). RNAs were also extracted from non-immortalized proliferating WI-38 fibroblasts (Early Passage) and the same cells maintained in replicative senescence for 20 days (d-SenRep).

indicating that its expression is replication-independent, as described previously<sup>18,24</sup>. *H2AFJ* mRNA was not higher in fibroblasts in replicative or etoposide-induced senescence compared to fibroblasts in RAF-induced senescence or quiescence. Thus, H2A.J accumulation during senescence with persistent DNA damage must involve a post-transcriptional component in addition to the continued expression of its gene in non-proliferating cells.

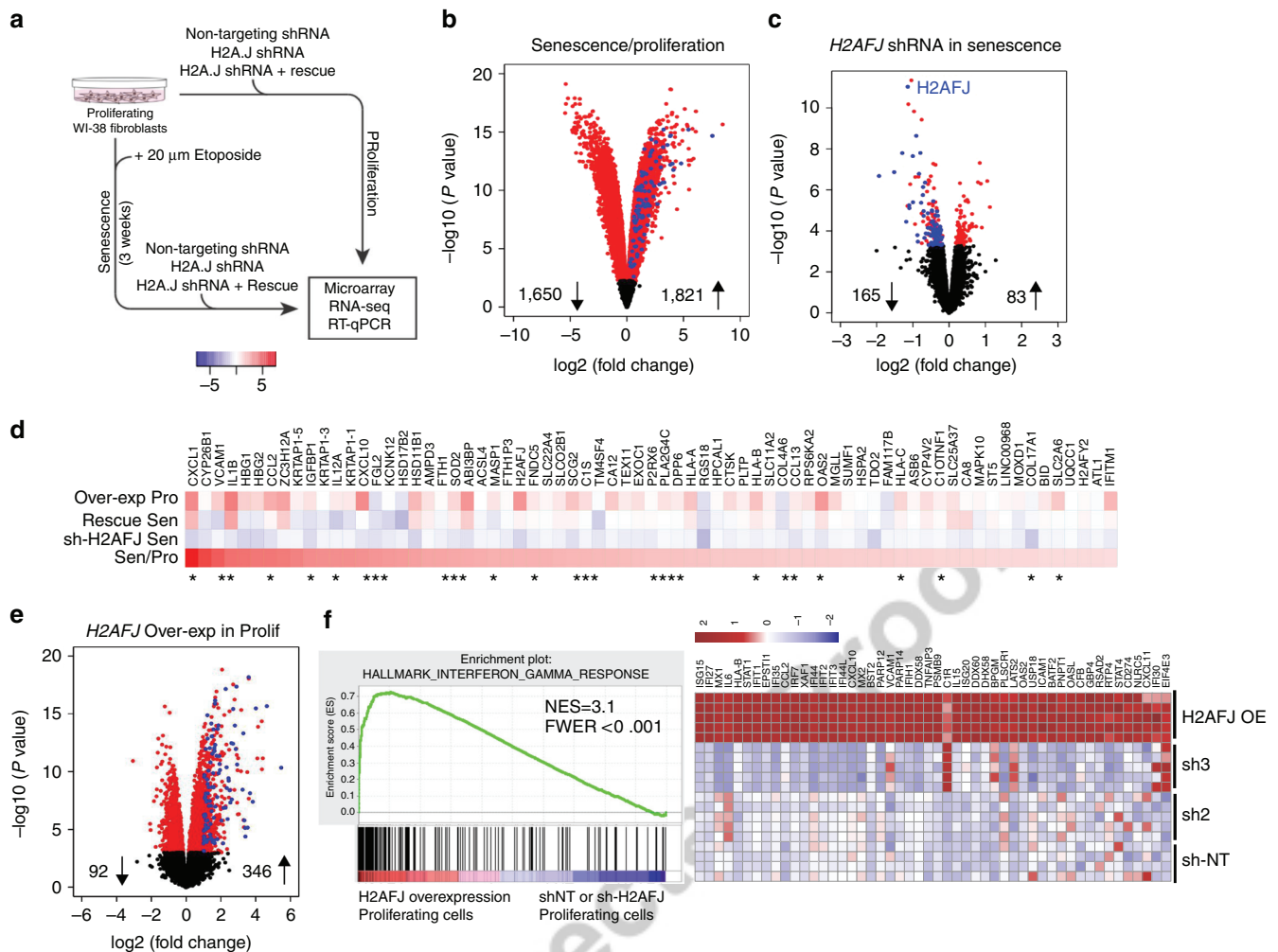
### H2A.J promotes inflammatory gene expression in senescence.

We used two different lentiviral shRNA constructs (sh2 and sh3) to search for phenotypes associated with the knock-down of H2A.J in fibroblasts (Supplementary Fig. 5). We also ectopically expressed an sh-resistant *H2AFJ* cDNA to test its ability to rescue the *H2AFJ* knock-down phenotypes and to study the effect of the over-expression of H2A.J in proliferating cells. Depletion of *H2AFJ* mRNA blocked H2A.J accumulation in senescent cells and this effect was prevented by ectopic expression of the sh-resistant *H2AFJ* cDNA (Supplementary Fig. 5). H2A.J knock-down had no obvious effect on the proliferation of fibroblasts or the efficiency with which they entered into and maintained the senescent state after treatment with etoposide (Supplementary Fig. 6), nor did H2A.J depletion significantly impact cell morphology, DNA compaction, or the distribution of  $\gamma$ H2AX foci in etoposide-induced senescence (Supplementary Fig. 7).

However, H2A.J depletion significantly affected the gene expression of senescent cells as determined by transcriptome analyses (Illumina Bead Chip arrays and RNA-seq) (Fig. 4a). Human fibroblasts induced into senescence by etoposide treatment for three weeks had a greatly modified transcriptome relative to proliferating cells: 3,471 genes were differentially expressed at least twofold (1,821 upregulated and 1,650 downregulated) with a false-discovery rate (FDR) of  $<0.01$  (Fig. 4b and Supplementary Data 1). Down-regulated genes were greatly enriched in gene ontology (GO) terms involving cell proliferation as expected for the proliferative arrest characteristic of senescence (Supplementary Data 2).

Upregulated genes were greatly enriched in GO terms related to inflammatory/immune/secreted proteins (35/50 top GO classes) as previously reported for senescent cells (Supplementary Data 2). The Excel files list the 50 most significant GO IDs/terms revealed by the goana function in limma<sup>25</sup> along with the *P* values for the GO ID enrichment and the gene symbols for the differentially-expressed genes that belong to each GO ID. Similar biological processes or molecular functions are highlighted in orange, and cellular compartment IDs are highlighted in yellow.

Only 12 genes (including *H2AFJ*) were significantly down-regulated and 20 genes upregulated by 2 different sh-RNAs targeting *H2AFJ* in proliferating fibroblasts (Supplementary Data 3). However, H2A.J knock down had a much greater effect in senescent cells. 165 genes were down-regulated and 83 genes up-regulated in senescent cells by H2A.J depletion mediated by 2 different shRNAs (FDR  $<0.05$ ) (Fig. 4c and Supplementary Data 3). Remarkably, gene ontology analysis indicated that deregulated genes were enriched (43/50 top GO classes) in pathways involving immune processes, secreted gene products, and cell migration/chemotaxis (Supplementary Data 2). These GO terms are very similar to those corresponding to genes up-regulated in senescence. Indeed, 71/165 genes that were down-regulated in senescence after depletion of H2A.J represent genes that were upregulated at least twofold in senescent versus proliferating cells (Fig. 4d, and blue dots in the Volcano plots of Fig. 4b,c). Thus, 43% of genes regulated positively by H2A.J are also upregulated in senescent versus proliferating cells. We further analyzed this subset of genes whose upregulation in senescent cells is promoted by H2A.J. 29/71 (41%) of these genes encode proteins that are bound to the cell surface or secreted from cells, involved in immune response, or implicated in cellular senescence (Fig. 4d-asterisks). Notable genes in this class are involved in inflammation and immune response, including *CXCL1*, *CXCL10*, *CCL2*, *CCL13*, *IL1B*, *IL12A*, *VCAM1* and the *HLA-A/B/C* major histocompatibility class I genes.



**Figure 4 | H2A.J promotes expression of immune response and inflammatory genes.** (a) Experimental schema of samples for microarray, RNA-seq, and RT-qPCR analyses. (b,c) Volcano plots summarizing the differentially expressed (DE) genes for WI-38hTERT fibroblasts induced into senescence with etoposide for 3 weeks versus proliferating fibroblasts. (b) Red dots: FDR < 0.01. Blue dots: genes that are transcriptionally up-regulated in senescence and down-regulated by sh-H2AFJ (see below). (c) DE genes for senescent WI-38hTERT fibroblasts expressing sh-H2AFJ RNAs versus a control sh-NoTarget. Only genes that were affected by both the sh2-H2AFJ and sh3-H2AFJ RNAs are shown. Red dots: FDR < 0.05. Blue dots: genes that are up-regulated in senescence in sh-NT cells. (d) Heat maps of log<sub>2</sub> fold change for 71 genes that are up-regulated at least 2 fold in senescent versus proliferating fibroblasts (Sen/Pro) and downregulated in senescence by knock-down of H2A.J (sh-H2AFJ Sen). These 71 genes are represented as blue dots in c. Also shown are the effects of ectopic expression of an sh2-resistant H2AFJ cDNA in senescent cells in which endogenous H2AFJ RNA is knocked-down with sh2 RNA (Rescue Sen), and the effect of ectopic expression of the sh-resistant H2AFJ cDNA in proliferating fibroblasts (Over-exp Pro). The asterisks indicate genes encoding proteins that are bound to the cell surface or secreted from cells, involved in immune response, or implicated in cellular senescence. (e) Volcano plot of DE genes in proliferating cells over-expressing H2AFJ. The blue dots show 110/346 up-regulated 'immune system process' genes belonging to GO:0002376 (Supplementary Data 2). (f) GSEA enrichment plot (left panel) showing the ranking of interferon gamma response genes in the set of differentially expressed genes on over-expression of H2AFJ in proliferating fibroblasts. Right panel: the corresponding heatmap of differential expression for the top 50 IF-gamma-response genes is shown for proliferating cells over-expressing H2AFJ (H2AFJ OE) versus proliferating cells expressing sh-NoTarget or sh-H2AFJ RNAs (sh2 or sh3). Each row shows an independent biological replicate. NES, normalized enrichment score. FWER, family-wise error rate.

### H2A.J overexpression increases inflammatory gene expression.

We also examined the effect of ectopically expressing an sh2-resistant H2AFJ cDNA in proliferating and senescent cells in which the endogenous H2AFJ mRNA is depleted. This resulted in overexpression of H2A.J in these cells (Supplementary Fig. 5A,B). H2A.J overexpression did not overtly affect cell proliferation, nor did it inhibit entry into senescence in response to etoposide treatment (Supplementary Fig. 6A,B) but it increased the expression in both senescent and proliferating cells of many genes whose expression was dependent on H2A.J in senescent cells (Fig. 4d). Over-expression of H2A.J had striking effects on the overall transcriptome of fibroblasts in proliferation (346 genes upregulated at least twofold and 92 genes downregulated at least

twofold; Fig. 4e) and in etoposide-induced senescence (120 genes upregulated at least twofold and 59 genes downregulated at least twofold; Supplementary Data 4). Remarkably, topGO (Supplementary Data 2) and GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) indicated that ectopic expression of H2A.J in proliferating cells sufficed to increase the expression of inflammatory, immune, and anti-viral genes (Fig. 4e,f) including *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *CXCL1/2/10*, *CCL2*, *CCL20*, *IRF7* and several interferon-inducible genes (Fig. 4d–f and Supplementary Data 4). The interferon-gamma response gene set (Fig. 4f) had the highest normalized enrichment score (NES = 3.1) amongst the Hallmark gene sets of the Molecular Signatures Database<sup>26</sup>, followed closely by the interferon-alpha response, TNF-alpha signalling via NF-kB, and

inflammatory response gene sets (Supplementary Data 4). Since chronic inflammation is tumorigenic<sup>27</sup>, this effect of H2A.J in promoting inflammatory gene expression may explain why the *H2AFJ* gene is amplified and over-expressed in some human cancers<sup>28,29</sup>.

**H2A.J is required for the production of SASP factors.** We noticed that several genes downregulated by H2A.J knock down in senescent cells (Fig. 4d) encode inflammatory cytokines/chemokines belonging to the family of senescent-associated secretory proteins (SASP). The SASP is composed of cytokines, chemokines, metallo-proteases, and growth factors that are highly expressed in some senescent cells. The Campisi lab proposed a list of 40 factors whose secretion is increased twofold or more in some senescent cells<sup>30</sup>. GSEA showed that this SASP gene set is significantly downregulated by depletion of H2A.J in senescent cells (Fig. 5a,b). These results were confirmed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analyses of selected SASP genes: *CXCL1/2/3/5/6* and *IL1B* (Fig. 5c,d). The sh3-*H2AFJ* RNA had a generally stronger effect on SASP gene expression than the sh2 RNA that may be due to a weaker knock down of *H2AFJ* by sh2 compared to sh3 (Supplementary Fig. 5A,B). Time course experiments indicated that *CXCL1/5/6* genes were slowly derepressed over a 2-week period in the senescent cells, and this derepression was strongly delayed when H2A.J accumulation was blocked with either sh2 or sh3 (Fig. 5d).

The Illumina Bead Chip transcriptome results were further verified with an independent set of RNA-seq data involving three replicates and only the sh2-*H2AFJ* RNA. The smaller sample size and the lower *H2AFJ* RNA knock down with sh2 compared to sh3 limited the number of genes that were detected as being significantly differentially affected (32 downregulated and 22 upregulated). 26/54 (48%) of the DE genes in the RNA-seq analysis were also identified as being differentially expressed in the Bead Chip analysis. Notably, the *CXCL1/2/5/6* genes were all identified by RNA-seq as being downregulated in senescent cells expressing sh2-*H2AFJ* RNA, in agreement with the Bead Chip analysis (Fig. 5e and Supplementary Data 5).

The transcriptome results indicated that knock-down of H2A.J in senescent cells led to a significant decrease in the abundance of RNAs coding for the SASP. To determine whether this defect led to reduced cytokine production, we used the Luminex technology to immunoassay in parallel 63 human cytokines, chemokines, or growth/adhesion factors in conditioned media from senescent fibroblasts expressing sh3-*H2AFJ* RNA or sh-NoTarget RNA. 52 factors were secreted at levels above the background signal from the control medium, and 30 of these showed statistically significant concentration decreases in the conditioned media of cells expressing sh3-*H2AFJ* compared to the sh-NT control (Fig. 5f and Supplementary Fig. 8). Highly expressed secreted factors whose concentrations were greatly decreased by H2A.J knock down included GROa(*CXCL1*), ENA78(*CXCL5*), IP10(*CXCL10*) and GMCSF(*CSF2*) (Supplementary Fig. 8). These results confirm an important role for H2A.J in senescence in promoting the production of inflammatory chemokines and cytokines.

**The H2A.J C-terminus is functionally essential.** We used complementation analyses to test the functional importance of the unique H2A.J C-terminus. Stable WI-38hTERT cell lines were constructed expressing the *H2AFJ*-sh3 RNA complemented by an shRNA-resistant cDNA encoding wild-type H2A.J (WT-H2A.J) or a mutant in which the C terminus specific to H2A.J was exchanged for the C terminus of the canonical H2A type 1 (H2A.J-Cter-H2A). The resulting mutant differs from canonical

H2As only by an Ala11Val substitution that is specific to H2A.J (Fig. 6a and Supplementary Fig. 2A). Control cell lines expressed only a No Target shRNA or the *H2AFJ*-sh3 RNA. *CXCL1*, *CXCL5*, *CCL2* and *IL1A* RNAs were quantified in proliferating cells and in cells induced into senescence by etoposide treatment. All of these genes were induced in senescence in the sh-No Target control cells, and their expression in senescence was inhibited by the knock-down of H2A.J and restored by the ectopic expression of WT-H2A.J. (Fig. 6b). In striking contrast, the ectopic expression of the H2A.J-Cter-H2A mutant was unable to restore inflammatory gene expression in cells in which endogenous H2A.J was depleted (Fig. 6b) despite being expressed at levels slightly higher than WT-H2A.J (Supplementary Fig. 9). Thus, the specific C-terminus of H2A.J is important for its function in promoting inflammatory gene expression in senescence.

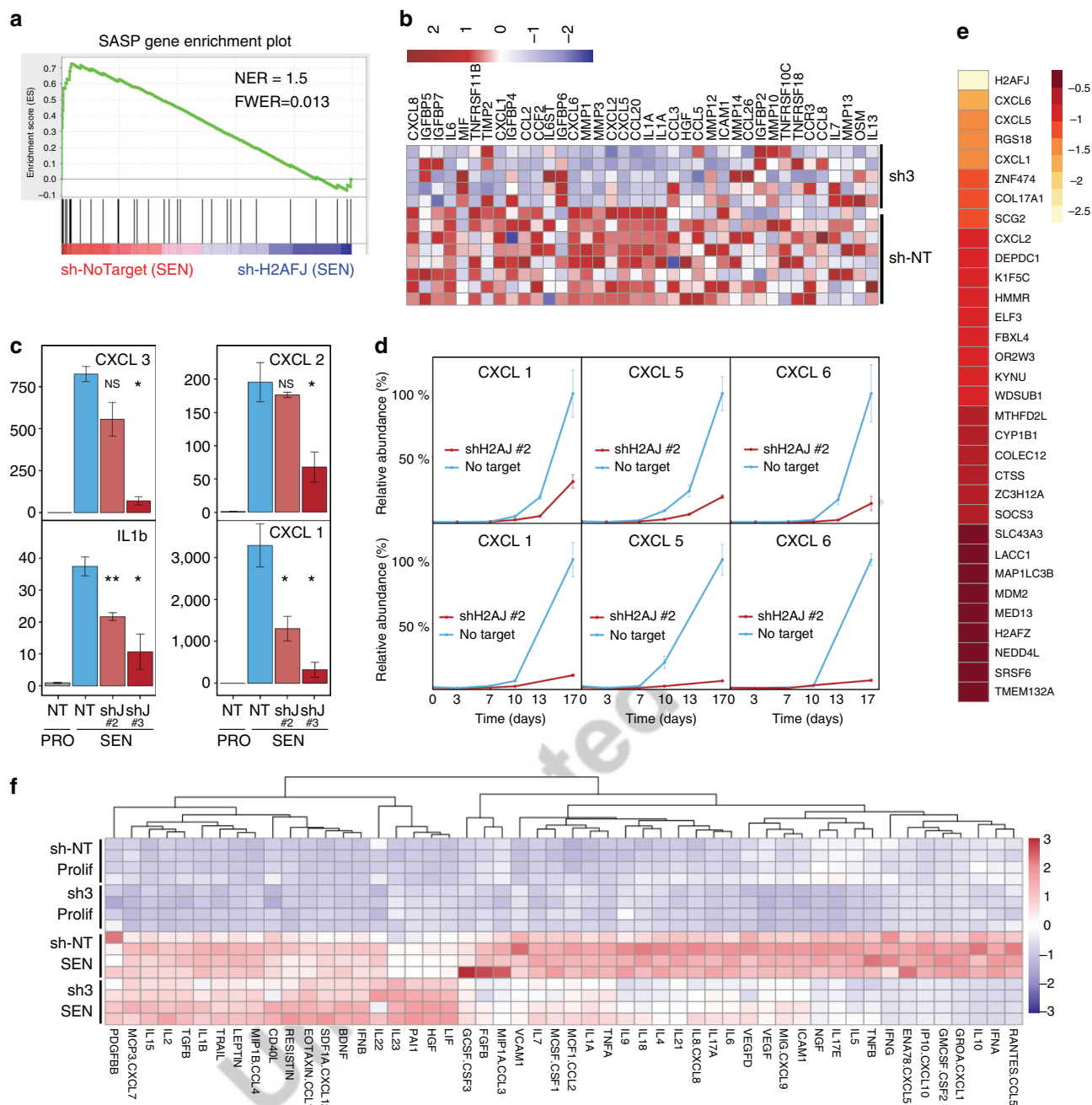
**H2A.J chromatin deposition is increased in senescent cells.** We performed targeted chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments to assay the occupancy of endogenous H2A.J at the promoter and the coding regions of genes whose expression depends on H2A.J (*CCL2*, *CXCL5* and *IL1B*) and genes whose expression is independent of H2A.J (*GAPDH*, *BCL2A1*) in proliferating and senescent cells (Fig. 7). The selected *CCL2*, *CXCL5* and *IL1B* promoter regions contain NF- $\kappa$ B-binding motifs. The specificity of the ChIP signal was demonstrated by its strong decrease when immunoprecipitating chromatin from cells in which H2A.J was knocked down. The H2A.J ChIP signal increased 2- to 10-fold in senescent versus proliferating cells depending on the specific site tested. However, we did not observe any significant differences in occupancy of H2A.J in promoter versus coding regions or in genes that were regulated by H2A.J versus genes that were not regulated by H2A.J. These results suggest that increased levels of H2A.J in senescence leads to increased chromatin deposition of H2A.J at many genomic sites, but gene expression at only a subset of these sites is affected by H2A.J.

We used ChIP-seq to further characterize the genome-wide distribution of endogenous H2A.J compared to canonical H2A in senescent fibroblasts. Cross-correlation analysis<sup>31</sup> showed that the sonicated chromatin immunoprecipitated with the anti-H2A.J antibody was readily distinguished from the input chromatin (Supplementary Fig. 10A,B). In particular, the cross-correlation peak distance (178 bp) was slightly larger than that of input chromatin (160 bp) and additional peaks of the size expected for di-, tri- and tetra-nucleosomes were visible. This observation indicates that the immunoprecipitation was successful and suggests that H2A.J differentially protected cross-linked chromatin from sonication relative to bulk chromatin containing canonical H2A. However, we did not observe sharp peaks of H2A.J deposition at discrete genomic locations. The density distribution of sequenced fragments rather indicated that H2A.J is widely deposited in the chromatin of senescent cells, similarly to canonical H2A (Supplementary Fig. 10C). As for the targeted ChIP experiments (Fig. 7), the H2A.J density around genes whose expression is dependent on H2A.J in senescence (*CXCL1/5/6*, *IL1B*) was indistinguishable from the H2A.J density around unexpressed genes (*PF4V1*) or genes whose expression was independent of H2A.J (*GAPDH*). A meta-gene analysis further revealed that H2A.J was steeply depleted close to transcription start sites (TSS) of genes as a function of their expression level (Supplementary Fig. 10D). Canonical H2A was also depleted at TSS, and in a somewhat broader fashion within the transcribed sequences of highly expressed genes (Supplementary Fig. 10E). Depletion of H2A.J and H2A at TSS may reflect a general depletion of nucleosomes at the TSS of

Q3

Q4

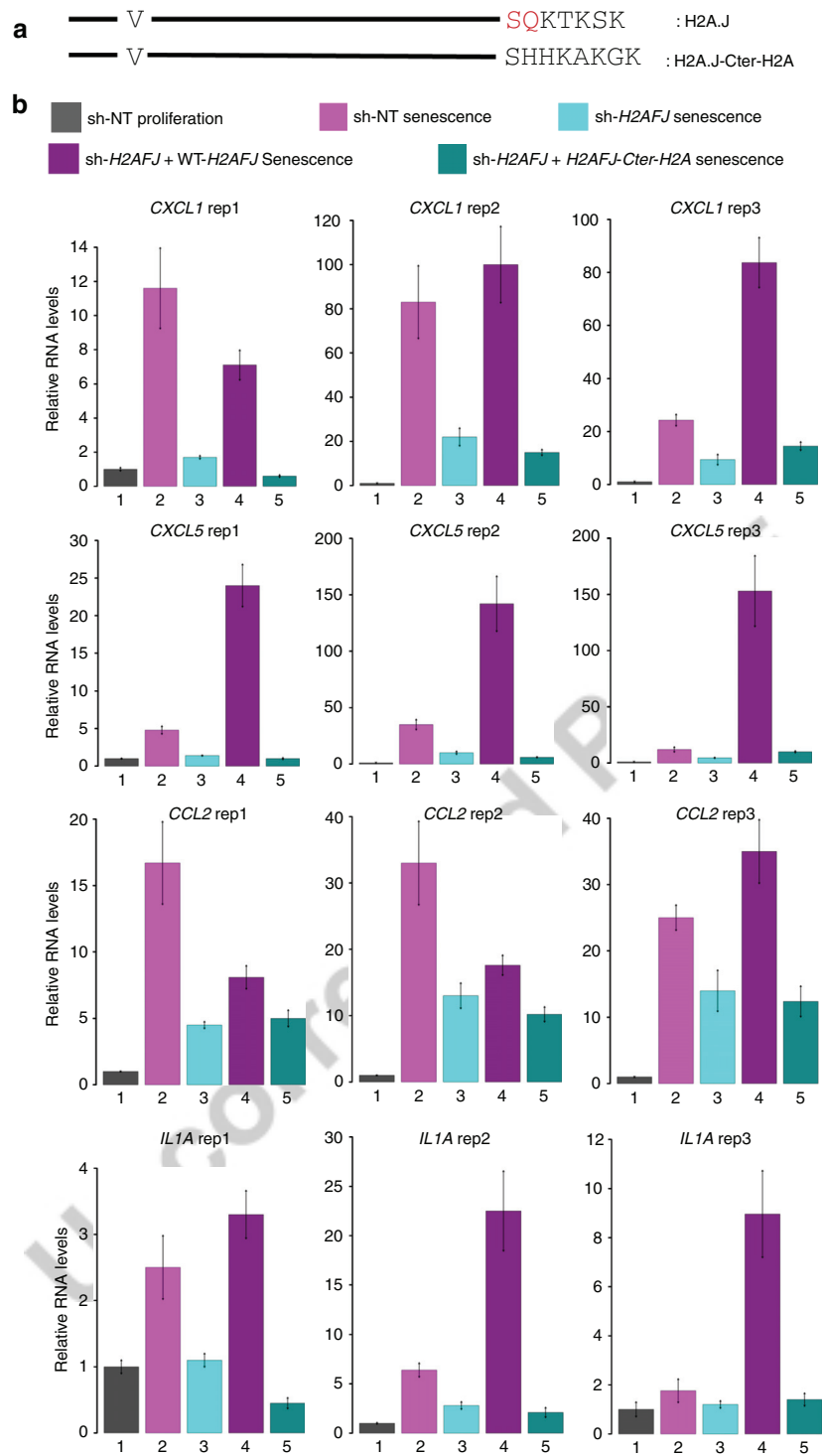




**Figure 5 | H2A.J is required for normal expression of SASP genes.** (a) GSEA enrichment plot showing the ranking of 38 SASP genes within the set of genes differentially-expressed on knock-down of H2A.J in senescent WI-38hTERT fibroblasts. (b) Corresponding heat maps for the 38 SASP genes. Each row represents an independent biological replicate of cells expressing sh3-H2AFJ or sh-NoTarget. Genes are listed by highest (left) to lowest (right) expression in the sh-NoTarget cells. (c) RT-qPCR verification of the effect of H2A.J knock-down on CXCL1, CXCL2, CXCL3, and IL1B expression in senescent cells (SEN). Values were normalized to proliferating fibroblasts expressing an sh-No Target RNA (PRO-NT). Shown are 3 biological replicates for senescent cells expressing No Target or sh-H2AFJ RNAs.  $t$ -tests with \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  or not significant (N.S.). (d) Time course of CXCL1, CXCL5, CXCL6 derepression during etoposide-induced senescence for cells expressing an sh-NoTarget or the indicated sh-H2AFJ RNA. The maximal expression for each gene as determined by qPCR was normalized to 100% (3 technical replicates). (e) Heat map showing genes significantly downregulated in senescence after knock-down of H2AFJ by sh2-RNA as determined by RNA-sequencing. (f) Heat map constructed with the pheatmap R package showing the scaled concentrations of 52 human cytokines, chemokines, growth or adhesion factors in the conditioned media of WI-38hTERT fibroblasts expressing sh-NT or sh3-H2AFJ RNAs in proliferation or senescence. See Supplementary Fig. 8 for dot plots showing concentrations ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) of secreted factors that are differentially affected by H2A.J knock-down.

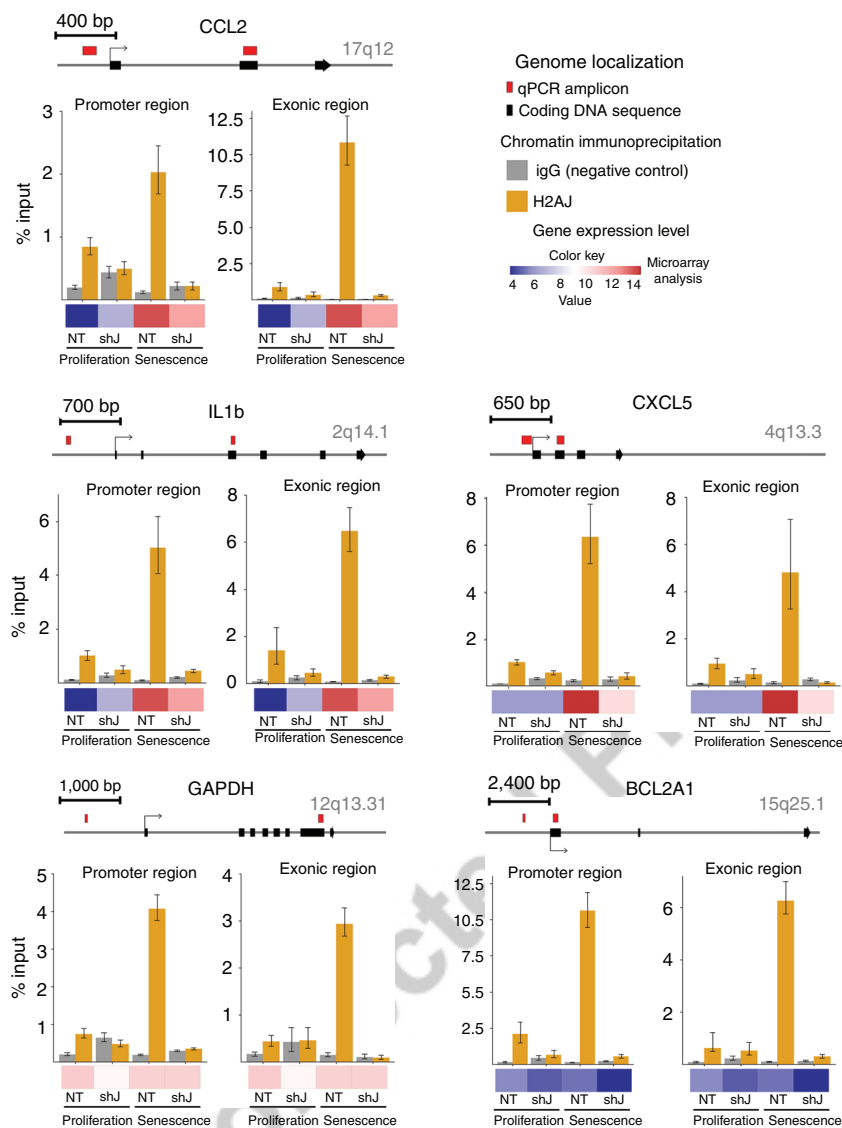
transcribed genes, and competition with deposition of the H2A.Z variant that is enriched at TSS<sup>32</sup>. This genome-wide analysis reinforces our conclusion that the specificity of H2A.J action is not explained by its differential deposition at the genes that it regulates.

**H2A.J is a biomarker of some senescent stem and skin cells.** The accumulation of H2A.J in senescent cells with persistent DNA damage suggested that it might be a novel biomarker for this state. We tested this possibility in the mouse. The median lifespan of C57BL/6 mice is a little more than 2 years<sup>33</sup>. We first



**Figure 6 | The H2A.J C-terminal sequence is required for its function.** WI-38/hTERT cells were infected with pGIPz lentiviruses expressing a No Target shRNA (sh-NT) or an sh3-H2AFJ RNA. The sh3-H2AFJ cell line was super-infected with pTRIPz lentiviruses expressing sh3-resistant H2AFJ cDNAs encoding WT-H2A.J or a mutant H2A.J in which the C-terminus of H2A.J was substituted with the C terminus of canonical H2A type 1 (H2A.J-Cter-H2A). Both the WT and mutant H2A.J contained an N-terminal Flag-HA tag. RNA was isolated from cells induced into senescence by etoposide treatment for 3 weeks and compared to levels in proliferating sh-No Target cells. **(a)** Schematic of V11 and C-terminal aa sequences of H2A.J and H2A.J-Cter-H2A. **(b)** RT-qPCR quantification of inflammatory gene expression for three biological replicates (independent cultures at different dates) for the indicated genes. The induction ratio for these genes in senescent versus proliferating sh-NT cells varied between biological replicates. The extent to which ectopic WT-H2A.J restored defective gene expression in the sh-H2AFJ knockdown cells also varied between biological replicates. However, the H2A.J-Cter-H2A mutant was ineffective at restoring inflammatory gene expression, indicating the functional importance of the specific H2A.J C-terminal sequence. For each biological replicate, the mean and s.d. are shown for three qPCR technical replicates.



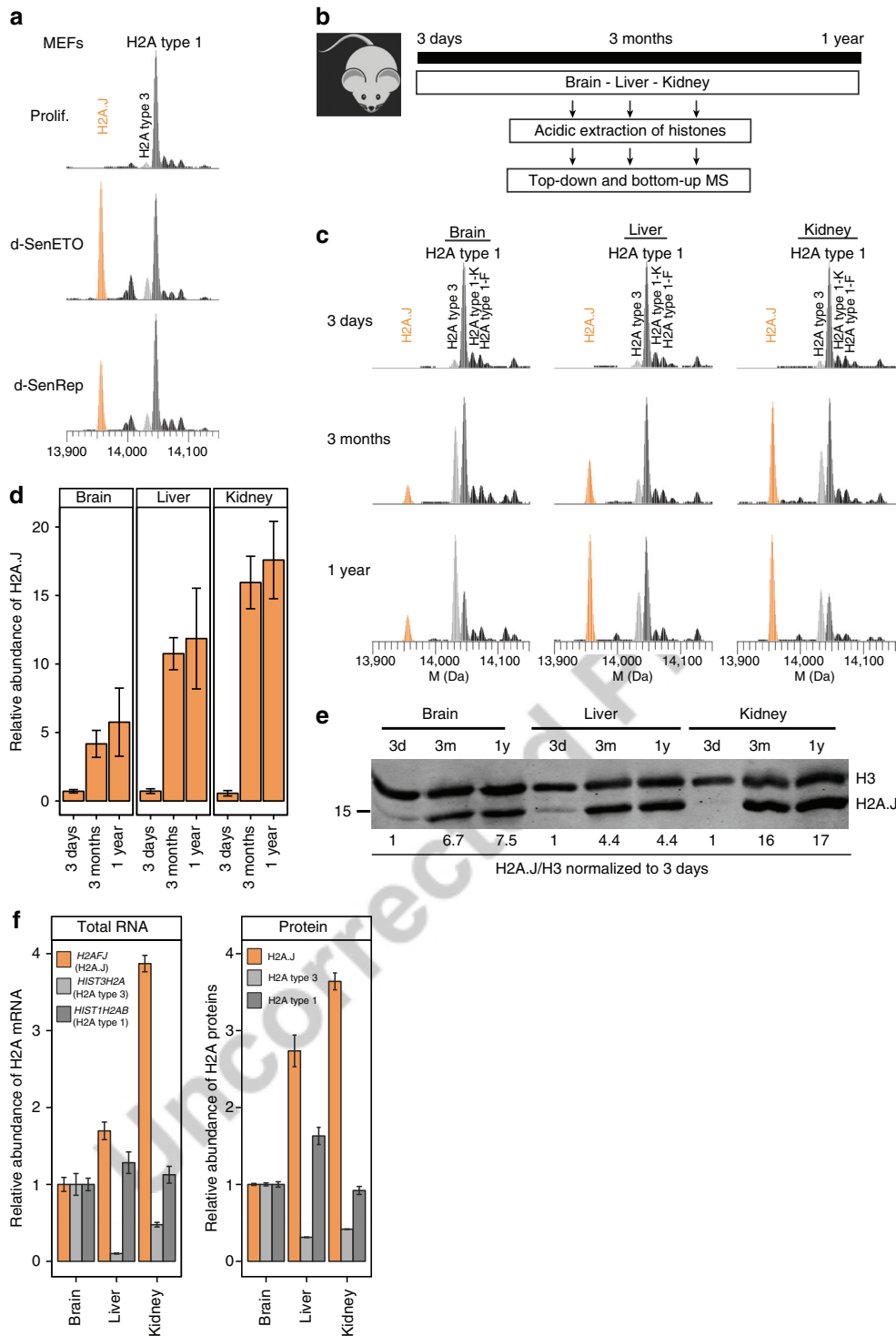


**Figure 7 | ChIP of H2A.J on selected SASP (*CCL2*, *IL1B*, *CXCL5*) and non-SASP (*GAPDH*, *BCL2A1*) genes from cells in proliferation or senescence induced with etoposide.** H2A.J was immunoprecipitated from sonicated crosslinked chromatin from WI38hTERT fibroblasts expressing an sh-NoTarget RNA (NT) or an sh3-*H2AFJ* RNA (shJ). The red rectangles indicate the position of the primers used for determining the percentage of DNA immunoprecipitated relative to the input. The sites chosen in the promoter regions of the SASP genes contain NF- $\kappa$ B binding motifs. The scale bars below the figures show gene expression heat maps indicating that H2A.J contributes to the increased expression of these SASP genes in senescence. *GAPDH* shows relatively uniformly high expression in proliferating and senescent cells whereas *BCL2A1* shows relatively uniformly low expression. The percent input is shown as the mean  $\pm$  s.d. of 3 biological replicates.

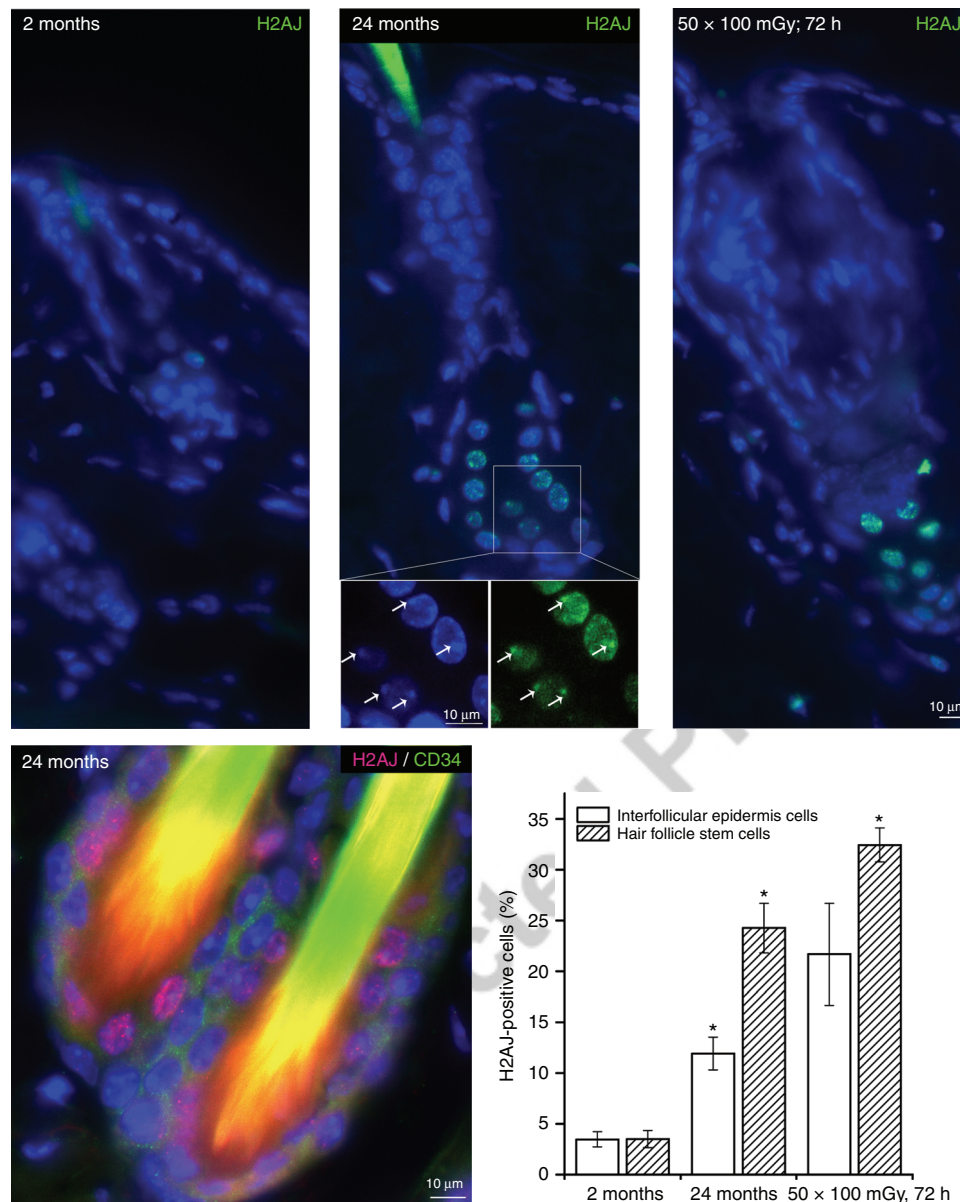
Q6

verified that H2A.J is found at low levels in proliferating mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and accumulates in MEFs in replicative or etoposide-induced senescence (Fig. 8a, Supplementary Fig. 11). We next examined levels of H2A.J in the brain, liver, and kidney of mice at 3 days, 3 months, and 1 year of age. H2A.J was only present at  $\approx 0.7\%$  of all canonical H2A species in all three organs 3 days after birth, but accumulated with age to different extents in an organ-specific manner (Fig. 8b–d). H2A.J levels remained low in the brain through one year ( $\approx 6\%$  of canonical H2A), whereas they reached  $\approx 11\%$  of all canonical H2A in the liver at 3 months. H2A.J accumulated even faster in the kidney and reached  $\approx 16\%$  of canonical H2A at 3 months. H2A.J levels appeared to increase slightly in organs from 3 months to 1 year. These results were confirmed by western blotting (Fig. 8e). The canonical H2A type 3 also increased in abundance in these three organs over 1 year of aging at the expense of canonical H2A type 1 that was most

abundant at 3 days after birth. *H2AFJ* mRNA levels were well correlated with H2A.J protein levels in the different organs in 1-year-old mice, suggesting that tissue-specific *H2AFJ* gene expression is a determinant of organ-specific differences in H2A.J levels (Fig. 8f). The early accumulation of H2A.J in some organs suggests that it has tissue-specific functions independent of cellular senescence. It nevertheless remained possible that H2A.J might be a biomarker of senescence in cell types that do not accumulate H2A.J at early ages. We developed an antibody to the unique C terminus of H2A.J, and we showed that it readily distinguishes by immunofluorescence senescent fibroblasts from proliferating or quiescent fibroblasts in mixing experiments (Supplementary Fig. 12). The specificity of this antibody was validated by multiple criteria (see Methods section). H2A.J was seen as weak punctate staining in the nucleus of proliferating cells, and the signal increased strikingly in senescent cell nuclei (Supplementary Fig. 12). We then examined by



**Figure 8 | Mouse H2A.J accumulates with age in an organ-specific fashion.** (a) H2A.J is present at low levels in proliferating mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and increases greatly in replicatively senescent MEFs (d-SenRep) or MEFs maintained in etoposide-induced senescence for 20 days (d-SenETO). (b) Experimental timeline for the extraction of histones from the indicated C57BL/6 mouse organs. (c) Top-down deconvoluted mass spectra of intact histone H2A2 proteins extracted from mouse organs at the indicated ages. H2A.J is shown in orange and canonical H2A types 1 and 3 are shown in shades of grey. See Supplementary Table 2 for the observed and theoretical masses of these peaks and Supplementary Fig. 11 for their sequence features. (d) Relative abundance of H2A.J as the percent of all canonical H2A species by quantifying the Gly5-Arg12 tryptic peptide from H2A.J versus the same peptide from all other canonical H2A species (mean and s.d. for two biological replicates). (e) H2A.J and H3 Western blot of acid-extracted histones from the indicated mouse organs. (f) qRT-PCR analysis of *H2AFJ* (coding for H2A.J), *HIST3H2A* (coding for H2A type 3), and *HIST1H2AB* (coding for H2A type 1) mRNA levels in 1 year old mouse organs (three technical replicates). Random primers were used to prepare cDNA to quantify total RNA levels (left panel). The right panel shows the quantification of H2A.J, H2A type 3, and H2A type 1 proteins by top-down mass spectrometry from two biological replicates (mean and s.d.). The levels of H2A mRNA and proteins in 1-year-old mouse organs were normalized to the levels found in the brain.



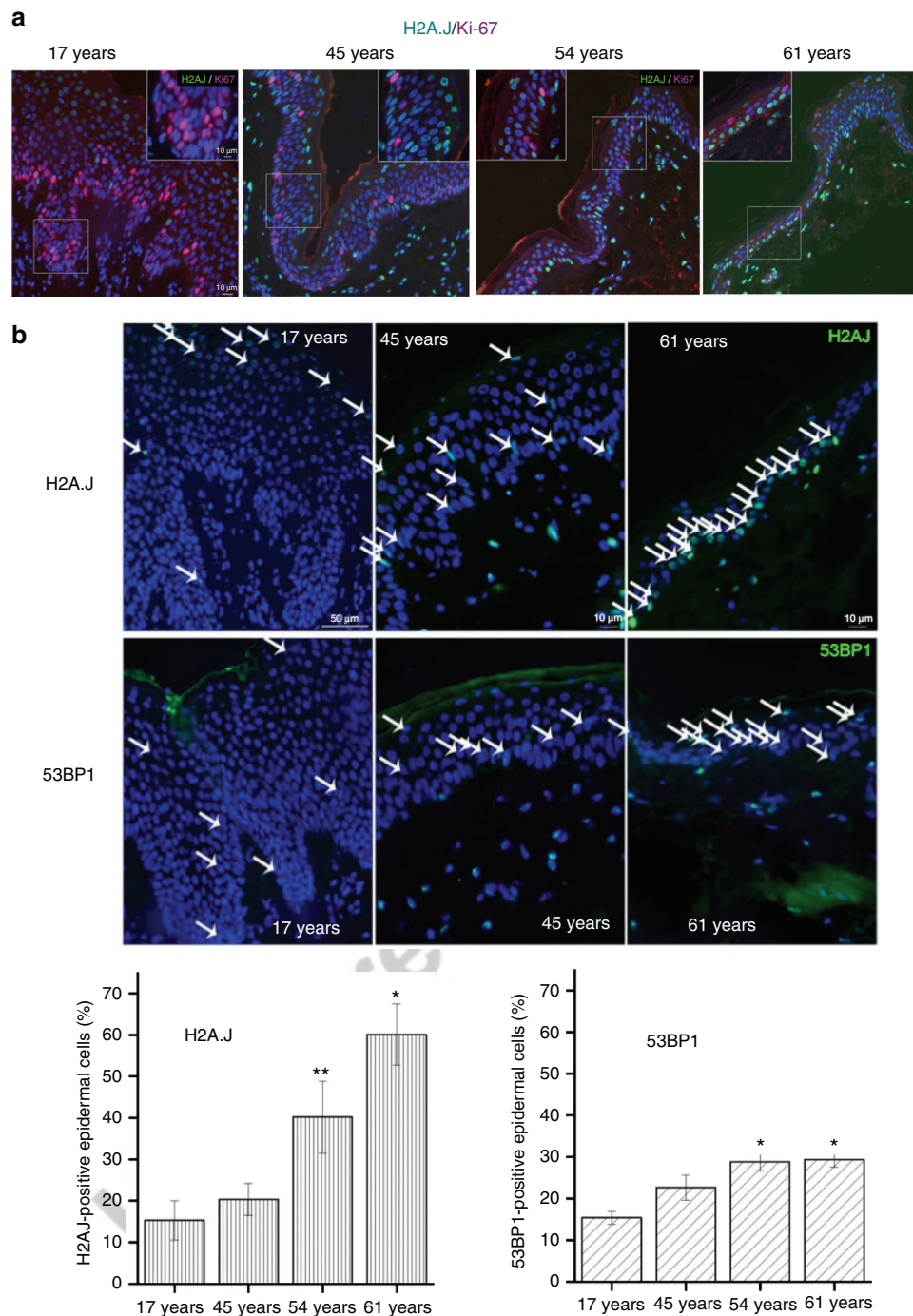
**Figure 9 | H2A.J in mouse hair follicle stem cells and epidermis with age and irradiation.** H2A.J accumulates in C57BL/6 mouse hair follicle stem and interfollicular epidermal cells at late ages (24 months) and after repeated low-dose ionizing irradiation ( $50 \times 100$  mGy) of young mice (2 months) as seen by immunofluorescence with anti-H2A.J antibodies (green) overlaid on the nuclear DNA stained with Hoechst (blue). The inserts in the 24-month sample show individual staining of nuclear DNA or H2A.J to demonstrate that H2A.J foci correspond to heterochromatic DNA foci. An example of colocalization with the CD34 surface marker displayed by hair follicle stem cells is shown in the lower panel. Counting was performed until 40 H2A.J-positive cells or 200 cells in total were registered for each skin sample. Analysis was performed with three biological replicates, and the one-sided Mann–Whitney *U*-test was used to determine the statistical significance ( $P \leq 0.05$ ).

immunofluorescence the expression of H2A.J in hair follicle stem cells (HFSC) and interfollicular epidermal cells (IEC) of young (2 months) and old (24 months) mice, and young mice that were irradiated by fractionated low-dose irradiation ( $50 \times 100$  mGy) to induce DNA damage. Less than 5% of cells stained positively for H2A.J in young mice, but this number increased significantly to 25–30% of HFSC and 10–20% of IEC in old and irradiated mice (Fig. 9). The specificity of the immunofluorescent signal was verified by its competition with an excess of antigenic peptide to the C-terminus of H2A.J, but not with a peptide from the C-terminus of canonical H2A (Supplementary Fig. 13).

We next examined sections of human skin at different ages for immunofluorescent staining with H2A.J, Ki-67 and 53BP1. Colocalization studies showed mutually exclusive staining of

epidermal cells with the proliferation marker Ki-67 and H2A.J (Fig. 10a). Ki-67 positive epidermal cells decreased with aging whereas H2A.J positive cells increased. 53BP1 is recruited to chromatin in the form of foci in cells in response to DNA damage or perturbed heterochromatin<sup>34</sup>. The percentage of epidermal cells that contained 53BP1 foci increased from 15% to nearly 30% in skin from 17- to 61-year-old individuals (Fig. 10b). Strikingly, the percentage of H2A.J positive epidermal cells increased from 15% (17-year-old skin) to 60% (61-year-old skin). Although both markers increase in the aging epidermis, the H2A.J pan-nuclear staining is much easier to detect than the small number of discrete 53BP1 foci. H2A.J accumulation may thus represent a novel biomarker of some senescent stem and skin cells in mice and humans.





**Figure 10 | H2A.J accumulates in the aging human epidermis.** (a) H2A.J and Ki-67 co-localization in sections of human skin of the indicated ages by immunofluorescent staining. H2A.J showed mutually exclusive staining with the Ki-67 proliferation marker. (b) H2A.J and 53BP1 foci increase in aging human epidermis. Arrows indicate positively-stained nuclei. A quantification of positive cells for three biological replicates is shown below the immunofluorescence images, and the one-sided Mann–Whitney *U*-test was used to determine the statistical significance (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

## Discussion

The H2A protein family has 19 members<sup>17</sup>. Eleven of these are canonical type 1,2,3 histones with a small number of amino acid differences. Most canonical histones are coded for by clustered genes on human chromosomes 1 and 6 that are expressed preferentially in S-phase for packaging newly-replicated DNA. Eight H2A family members (H2A.V, H2A.X, H2A.Z, H2A-Bbd type 1, H2A-Bbd type 2/3, macro-H2A.1 and macro-H2A.2) are clearly diverged variants with specialized functions, and are expressed independently of DNA replication<sup>11,35</sup>. The unique

*H2AFJ* gene encoding H2A.J was previously shown to be expressed independently of DNA replication<sup>18,24</sup>, but this study is the first, to the best of our knowledge, to describe H2A.J at the protein level. H2A.J differs from canonical H2A by only five amino acids involving a substitution of Val for Ala at position 11 in the N-terminal tail, and a unique C terminus containing a potentially phosphorylatable SQ motif (Fig. 1d). Its recent evolution (Supplementary Fig. 3) suggests that it may have mammalian-specific functions. Using mass spectrometry and a specific antibody, we found that H2A.J is expressed at low levels

in the chromatin of proliferating or quiescent (serum-starved) fibroblasts (around 1% of canonical H2A), but accumulates in senescent fibroblasts containing persistent DNA damage (around 10% of canonical H2A) (Fig. 1c). The correlation with persistent DNA damage (Fig. 1e) suggests that DNA-damage signalling may regulate H2A.J levels. *H2AFJ* mRNA was not expressed at higher levels in senescent cells compared to quiescent cells (Fig. 1g), but H2A.J protein levels are much higher in senescent cells with DNA damage compared to quiescent cells (Fig. 1b,c,f), so H2A.J accumulation in senescence must involve a post-transcriptional mechanism. We also observed differences in the rates of H2A.J protein accumulation with age in the mouse brain, liver, and kidney that correlated with differences in *H2AFJ* RNA levels (Fig. 8). Thus, H2A.J expression can be regulated at both the transcriptional and post-transcriptional levels. Systematic immuno-staining of tissue sections will be required to identify the cell types that express H2A.J and to investigate the basis of its tissue-specific differences in gene expression.

H2A.J depletion did not affect the induction or the maintenance of senescence induced by etoposide treatment (Supplementary Fig. 6), but it did strongly inhibit the expression of immune response and inflammatory genes, including many associated with the SASP (Figs 4 and 5). The SASP is implicated in signalling the presence of senescent cells to the immune system and in wound healing<sup>1,6</sup>. These genes are highly repressed in proliferating cells to prevent inappropriate inflammatory signals in the absence of stress, but they are highly expressed in senescent cells. Time-course experiments revealed that full derepression of these genes is a slow process occurring over 2 weeks during senescence (Fig. 5d). These findings are in agreement with previous work showing that expression of the SASP is a slow process that takes more than a week for peak expression in fibroblasts induced into senescence by DNA damage<sup>36</sup>. Regulation of SASP gene expression is complex with multiple parallel amplification pathways and inhibitory feedback loops<sup>13,37</sup>. In senescence induced by DNA damage, both persistent DNA damage signalling and p38 MAP kinase activation were required for SASP gene expression mediated by the NF- $\kappa$ B transcription factor<sup>30,36</sup>. Activation of ATM and Chk2 occurred rapidly on DNA damage, but was insufficient for SASP expression. Activation of the p38 MAP kinase was also required for SASP expression, but this activation occurred several days subsequent to senescent-inducing DNA damage by an unknown mechanism<sup>38</sup>. The delayed activation of p38 contributes to the delayed expression of the SASP genes. We found that knock-down of H2A.J also delayed and inhibited SASP gene expression (Fig. 5). Targeted chromatin immunoprecipitation experiments and genome-wide ChIP-seq revealed that H2A.J occupancy increased in senescence at inflammatory genes whose expression is dependent on H2A.J, as well as on genes whose expression is unaffected by H2A.J depletion (Fig. 7, Supplementary Fig. 10). The specificity of H2A.J action thus cannot be due to its preferential deposition at inflammatory genes. This result suggests that other factors must act in concert with H2A.J to promote strong inflammatory gene expression. The distinct C termini of H2A variants contribute to their functional specificities<sup>35</sup>. The unique H2A.J N and C-termini may affect chromatin compaction and interact differentially with protein partners. Our complementation experiments indicated that the canonical H2A C terminus could not functionally replace the H2A.J C terminus, supporting an essential role for the H2A.J C-terminal sequence (Fig. 6). It is also possible that H2A.J accumulation in senescence may act by displacing other repressive H2A variants. Further mechanistic work will be required to understand how persistent DNA damage facilitates H2A.J accumulation and how H2A.J stimulates SASP gene

expression. Study of this pathway may lead to novel approaches to decrease chronic inflammation associated with the accumulation of senescent cells during aging.

*H2AFJ* overexpression in proliferating cells increased the expression of many inflammatory and immune-response genes (Fig. 4e). The *H2AFJ* gene was amplified and over-expressed in some breast cancers<sup>28,29</sup> and other cancers (see the COSMIC database: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=H2AFJ>). *H2AFJ* over-expression in these cancers may have been selected for during tumour progression because of its ability to promote inflammatory gene expression that is pro-tumorigenic<sup>27</sup>.

The accumulation of H2A.J in senescent fibroblasts with persistent DNA damage suggested that it might be a potential biomarker for this state. Our immune staining of mouse skin showed that H2A.J was present at low levels in hair follicle stem cells and interfollicular epithelial cells of young mice (2 months), but increased significantly in these cells in old mice (2 years) or after repeated low-dose irradiation of young mice (Fig. 9). H2A.J also increased dramatically in epidermal cells of aging human skin. The strong pan-nuclear staining of H2A.J was much easier to score compared to 53BP1 foci in the aging epidermis (Fig. 10). H2A.J thus appears to be a novel biomarker for some senescent stem and skin cells. Mass spectrometry analyses also indicated that H2A.J remained at low levels in the mouse brain through one year of age. However, although present at low levels (0.7% of canonical H2A) at birth, we also observed rapid accumulation of H2A.J in the liver and kidney to reach about 11% and 16% of canonical H2A by 3 months of age (Fig. 8c,d). The early accumulation of H2A.J in the liver and kidney indicates that it very likely has tissue-specific functions that are independent of senescence. Such functions would be best studied in the future with an *H2AFJ* knock-out mouse model.

## Methods

**Cell culture.** WI-38 human embryonic fibroblasts from the ATCC were immortalized with hTERT and grown in MEM (Invitrogen #21090) + 10% Fetal Bovine Serum + 1 mM Sodium Pyruvate + 2 mM L-glutamine + 0.1 mM non-essential amino acids<sup>16,21</sup>. Cells were mycoplasma negative. Senescence was induced by incubating cells with 20  $\mu$ M etoposide, or passing non-immortalized cells until replicative senescence, or by inducing a constitutively active form of the RAF1 kinase fused to GFP and the estrogen-receptor binding domain (GFP-RAF1-ER) by the addition of 20 nM 4-hydroxy-tamoxifen (4-HT) to cells<sup>16,21</sup>. IMR90-hTERT/ER-Rasval12 were also induced into senescence by addition of 100 nM 4-HT to the medium<sup>16</sup>. SA- $\beta$ -gal assays and  $\gamma$ H2AX immunofluorescence assays were performed as described<sup>16,21</sup>. Quiescence was induced by serum limitation by incubating cells with medium containing 0.1% Fetal Bovine Serum. Mouse embryonic fibroblasts were grown to replicative senescence in 5% CO<sub>2</sub> at ambient oxygen. Senescence was also prematurely induced by incubating proliferating MEFs with 2.5  $\mu$ M etoposide for 20 days.

**shRNA Knock-down of H2AFJ.** pTRIPz-sh-No Target (Thermo RHS4743), pTRIPz-sh2-*H2AFJ* (Thermo V3THS\_302395) pTRIPz-sh3-*H2AFJ* (Thermo V3THS\_351902), and pGIPz-sh-NoTarget (RHS4346) were purchased from Thermo Scientific. The sh2-*H2AFJ* RNA targets positions 210-228 of the human *H2AFJ* coding sequence: 5'-CGCGCGTGACAACAAGAAG-3'. The sh3-*H2AFJ* RNA targets positions 265-283 of the human *H2AFJ* coding sequence: 5'-CGCAACGACGAGGAGTTAA-3'. The sh3-*H2AFJ* sequence was also transferred to pGIPz. Another pTRIPz-sh-*H2AFJ* RNA (Thermo V2THS\_156605), that we called sh1, targets a putative 3'-UTR sequence that is not transcribed in normal human fibroblasts and was not effective at knocking-down *H2AFJ*.

An sh2-resistant coding sequence with an N-terminal Flag-HA epitope: 5'-ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCTCGATGGAGGATAACCCCTA CGA CGTGGCCGACTACGCCGAGGAATGTCGCGTCCGCGGAAACAGGG CGGCAAAGTCGAGCAAAGGCCAAATCCCTCTCTCCGCGCGGGCCTG CAGTTCGCCGTGGGCGGAGTGACACAGACTGCTGCGCAAAAGGAACTACG CGGAGCGAGTGGGCGCCGGGCGCCGTGTACTCTGGCGCGGTGTGG AGTACCTTACGGCGGAGATCTGGAGCTGGCTGGCAACGCTGCCAGGGA TAATAAAAAAACAGGATAATTCCCGCCACCTGCAGCTGCCATCCGC AACGACGAGGAGTTAAACAAGCTGCTGGGCAAAGTGACCATCGCTCAGG GCGCGTCTCGCCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCAAGAAGACGGA GAGTCAGAAGACGAAGAGCAAATGA-3' was synthesized by Eurofins



Genomics and cloned as an *AgeI-MluI* fragment in the pTRIPz vector. The sh2-resistant coding sequence contains multiple silent mutations in the sequence targeted by sh2. Lentiviruses were prepared from pTRIPz plasmids by co-transfection of 293T cells with packaging plasmids as described<sup>39</sup>. WI38hTERT cells were infected with lentiviruses and stable cell populations were selected for puromycin resistance conferred by pTRIPz.

**MS Profiling of core histones.** The profiling of core histone variants was performed by ultra-high performance reverse-phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS) of acid-extracted histones either as is for histones from fibroblasts in culture, or after mild performic acid oxidation for histones extracted from mouse organs as previously described<sup>15,16</sup>. Briefly, oxidized histones were loaded and separated on a C18 Hypersil GOLD column (2.1 × 150 mm, 175 Å, 1.9 µm, Thermo) at a flow rate of 300 µl min<sup>-1</sup> with a linear gradient of 0–80% B in 13.5 min (with solvent A: H<sub>2</sub>O containing 0.1% formic acid and solvent B: ACN containing 0.1% formic acid). MS acquisition was performed on an LTQ-Orbitrap Discovery mass spectrometer (Thermo, San Jose, CA) operating in the positive ion mode (acquisition from *m/z* 500 to 2,000) using a resolution set at 30,000 (at *m/z* 400). The resulting mass spectra were deconvoluted using the Xtract software included in the Xcalibur package (Thermo). Proteins were identified by their mass as indicated in Supplementary Tables 1 and 2. Relative quantification of modified histone forms and variants was performed on deconvoluted mass spectra by dividing the intensity of a given MS peak by the sum of the intensities of the different MS peaks composing the considered spectrum. Note that the profiles shown in Figs 1b and 8c correspond to fractions of the C18 column containing H2A2 (H2A fraction 2) histones with leucine at position 52 (numeration starting from Met1). The H2A1 (H2A fraction 1) histones with methionine at position 52 elute at a distinct position (Supplementary Figs 1 and 2). Thus, to quantify the amount of H2A.J versus all other canonical H2A histones, we digested total histones with trypsin as described below, and we compared the area for the Gly5-Arg12 tryptic peptide peak from H2A.J versus the same peptide from all other canonical H2A species. H2A.J contains Val11 whereas all canonical H2A species contain Ala11 (numbering relative to Met1; Fig. 1d and Supplementary Figs 2 and 10). The relative abundance of H2A.J versus canonical H2A was thus calculated as: (Area H2A.J peptide / (Area H2A.J peptide + Area canonical H2A peptide)) × 100.

**MS analysis of histone tryptic digests.** Acid-extracted histones were first *in vitro* propionylated on lysine residues with propionic anhydride, then digested with trypsin, and finally subjected to a second round of propionylation to block the newly formed N-terminal residues<sup>15,40</sup>. Analyses of the resulting tryptic digests were then performed on an LTQ-Orbitrap Discovery mass spectrometer that was operated in the data-dependent acquisition mode, using the five most intense precursor ions. The MS survey scan was performed from *m/z* 300 to 2,000 in the Orbitrap at a resolution of 30,000 (at *m/z* 400), while the fragment ions were detected in the linear ion trap after collision-induced dissociation (CID).

**Anti-H2A.J rabbit polyclonal antibodies.** The C-terminal H2A.J peptide CTESQKTKSK was covalently linked at its N-terminal cysteine to the carrier protein bovine serum albumin through a maleimide linkage and injected into two rabbits. The N-terminal cysteine is not found in H2A.J but was added to facilitate cross-linking of the peptide. After 3 boosts, serum was collected and anti-H2A.J antibodies were purified by binding to the C-terminal H2A.J peptide attached to the Sulfolink resin (Pierce) and eluting with 100 mM glycine (pH 2.5) followed by immediate neutralization with a 1/20 volume of 1M Tris (pH 8.5).

Please note that several commercial antibody providers sell an 'anti-H2A.J' antibody using as immunogen a peptide shared with canonical H2A or the full-length H2A.J. It is highly unlikely or impossible that these antibodies specifically recognize H2A.J.

**Validation of the specificity of the purified anti-H2A.J Ab.** Multiple independent criteria were used to verify the specificity of the anti-H2A.J antibody as summarized here:

Figures 1, 2 and 8: the intensity of the H2A.J band in western blots is in excellent agreement with the amount of H2A.J determined by mass spectrometry in multiple conditions, in several cell lines, and in several mouse organs.

Supplementary Figs 5A,B: two independent shRNAs were identified that are effective in knocking-down *H2AFJ* mRNA. The H2A.J band identified by our antibody in Western blots is greatly decreased in the cells expressing these shRNAs. Furthermore, when we ectopically express a Flag-HA-tagged cDNA encoding H2A.J, we observe a novel band that migrates at the expected size for the Flag-HA-H2A.J.

Supplementary Fig. 7: cells expressing an shRNA to *H2AFJ* showed reduced staining with our anti-H2A.J Ab when compared to sh-NoTarget cells.

Supplementary Fig. 9B: the H2A.J antibody directed to the H2A.J C-terminus does not recognize an H2A.J mutant in which the C terminus of H2A.J was exchanged for the C-terminus of canonical H2A type 1.

Supplementary Fig. 12: senescent cells show much higher immunofluorescent staining with our anti-H2A.J antibody compared to proliferating cells, in agreement with the abundance difference observed by mass spectrometry.

Supplementary Fig. 13: the anti-H2A.J immunofluorescence signal observed in formalin-fixed mouse tissue sections is completely eliminated by competition with a molar excess of the H2A.J C-terminal peptide used for immunization, but not with a C-terminal canonical H2A peptide.

Supplementary Fig. 14: an Elisa peptide competition assay shows that the anti-H2A.J Ab has 1,000-fold higher affinity for the H2A.J C-terminal peptide compared to a canonical H2A C-terminal peptide.

**Radiation Schedule and tissue sampling in mice.** Young (2-month-old) and aged (24-month-old) C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany). Mice were housed four to six per cage in pathogen-free rooms (temperature 22 ± 2 °C, humidity 55 ± 10%, 12 h light–dark cycle) to minimize the risk of infections and supplied with standard laboratory diet and water ad libitum. Serological assessment was conducted at least quarterly to test for infection, and all tests were negative.

To evaluate the effects of repeated low-dose radiation with 50 × 100 mGy, C57BL/6 mice were irradiated for 10 weeks once daily from Monday to Friday (with 24 h between exposures). For the whole-body irradiation in a linear accelerator (Artiste, Siemens, Munich, Germany), the animals were placed in an 18 cm diameter Plexiglas cylinder covered by 1.5 cm thick plastic to improve photon dose homogeneity. The radiation characteristics were as follows: size of the radiation field, 30 × 30 cm; collimator angle 0°; gantry angle 0°; source surface distance, 208 cm; beam energy, 6 MV photons; dose-rate, 2 Gy min<sup>-1</sup>. Computed-tomography-based 3-dimensional dose calculations were made with the Pinnacle planning system (Philips Radiation Oncology Systems, Fitchburg, WI, USA). 72 h after the last radiation exposure, mice were anesthetized and the dorsal skin removed, fixed overnight in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) and processed for further analysis. The experimental protocol was approved by the Medical Sciences Animal Care and Use Committee of the University of Saarland.

**Tissue sampling in humans.** Human skin samples were collected from voluntary donors of varying ages. Skin biopsies were obtained from the abdomen from photo-protected areas of the skin during routine surgical procedures. Skin samples were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) and processed for further analysis. None of the donors had any chronic diseases or used any medications. Protocol procedures were approved by the local ethics committee ('Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes'), and all donors provided written informed consent.

**Immunofluorescence analysis of tissue sections.** Formalin-fixed tissues were embedded in paraffin and sectioned at a thickness of 4 µm (ref. 34). After deparaffinization by three 7-min rounds in xylene and rehydration in decreasing alcohol concentrations (100, 96, 90, 80, 70% for 3 min each), sections were boiled in citrate buffer, pH 6 (Dako Agilent pathology solutions, Santa Clara, CA, USA) for 1 h at 96 °C and incubated with Roti-Immunoblock (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Sections were incubated with primary antibodies (anti-H2A.J, 1:200; anti-Ki67, 1:200, Abcam, Cambridge, UK; anti-53BP1, 1:5,000, Novus biologicals, Littleton, CO, USA) overnight at 4 °C, and anti-CD34, 1:50, BD Biosciences, Heidelberg, Germany, 1h at RT), followed by AlexaFluor-488 or AlexaFluor-568 secondary antibodies (1:400, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) for 1h at RT. Finally, sections were mounted in VECTASHIELD with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, USA). For quantitative analysis, H2A.J-positive cells were counted visually under a Nikon E600 epifluorescent microscope (Nikon, Düsseldorf, Germany). Counting was performed until at least 40 H2A.J positive cells or 200 cells in total were registered for each skin sample. Accordingly, in aged or low-dose irradiated mice we analyzed 200–400 cells in each skin section, and averaged the results obtained from three different mice for each data point. We calculated the percentage of 53BP1-positive cells by counting at least 40 53BP1 foci with a minimum 100 cells. The one-sided Mann–Whitney *U*-test was used to determine the statistical significance ( $P \leq 0.05$ ).

**Western blots.** Acid-extracted histones or whole-cell extracts were electrophoresed in SDS-15% polyacrylamide gels and proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked and incubated with antibodies using the Li-Cor Odyssey infrared imaging system following the manufacturer's protocols. Rabbit anti-H2A.J antibody, anti-H3 (Abcam ab1791), anti-GAPDH (Abcam ab9484), and anti-HA.11 (mouse monoclonal 16B12) antibodies were all used at 1/1,000 dilutions for 1 hour incubations with membranes at room temperature. Uncropped western blots are shown in Supplementary Fig. 15.

**Ilumina Bead Chip Array transcriptome analyses.** WI38hTERT cells stably infected with pTRIPZ-sh-No Target, pTRIPZ-sh2-*H2AFJ*, pTRIPZ-sh3-*H2AFJ*, or pTRIPZ-sh2-*H2AFJ* + pTRIPZ-sh2-resistant-Flag-HA-*H2AFJ* were grown in the presence of 1 µg ml<sup>-1</sup> doxycycline for 4 days to express the shRNAs and to allow time for knock down of *H2AFJ* mRNA. One set of cells was collected for RNA extraction under proliferation conditions. Another set of cells was then treated with 20 µM etoposide for 2 weeks with change of medium after one week to induce

stable senescence. After 2 weeks in etoposide, fresh medium without etoposide was added and cells were incubated for one additional week before collecting cells under deep senescence conditions. Cells remained in senescence with persistent DNA damage under these conditions (Supplementary Figs 6 and 7). Doxycycline was maintained throughout the 3 weeks in senescence to ensure continual expression of the shRNAs. Five biological replicates were analyzed for each cell type under proliferative conditions except for the pTRIPZ-sh3-*H2AFJ* cells that were represented by four biological replicates. For etoposide-induced senescence, eight biological replicates of pTRIPZ-sh-No Target cells, four biological replicates of pTRIPZ-sh2-*H2AFJ* cells, and five biological replicates of pTRIPZ-sh3-*H2AFJ* and pTRIPZ-sh2-*H2AFJ* + pTRIPZ-sh2-resistant-*Flag-HA-H2AFJ* cells were prepared and analyzed.

RNA was extracted from 500,000 cells using Nucleospin RNA kits (Machery-Nagel). The total RNA yield (ng) was determined spectrophotometrically using the NanoDrop ND-100 (Labtech, France). Total RNA profiles were recorded using a Bioanalyzer 2100 (Agilent). RNA integrity numbers were determined, and the mean value found was  $9.8 \pm 0.24$  s.d. The coefficient of variation (CV) was 2.46%. cRNA was synthesized, amplified, and purified using the Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Life Technologies, France) following the manufacturer's instructions. Briefly, 200 ng of RNA were reverse transcribed. After second strand synthesis, the cDNA was transcribed *in vitro* and cRNA labelled with biotin-16-UTP. Labelled probes were then hybridized with beads using Illumina Bead Chip human HT-12 v4 arrays. These Bead Chips contain 47,231 unique 50-mer oligonucleotides in total, with hybridization to each probe assessed at 15 different beads on average. 28,403 probes (60.7%) are targeted at Reference Sequence (RefSeq) transcripts and the remaining 18,543 (39.3%) are for other transcripts, generally less well characterized (including predicted transcripts).

Bead Chips were scanned on the Illumina iScan Reader using Illumina iScan control software version 3 and Illumina Genome Studio software (version 2011.1) were used for preliminary data analysis. Multiple quality controls were performed and analyzed with the Illumina Genome Studio software, including scatter plots of control RNA samples from different labelling runs. The scatter plots compared duplicated control and experimental samples and were used to calculate correlation coefficients. These comparisons determined whether controls and samples from different labelling runs varied in quality. The control summary report generated by Genome Studio evaluates variations in signal intensity, hybridization signal, background signal, and the background/noise ratio for all the samples analysed in that run.

**Bead Chip bio-informatics analysis.** Raw bead chip array intensity data contained in the proprietary Illumina .idat files were analyzed using open-source Bioconductor packages<sup>41</sup>. Data was retrieved from the .idat files using the beadarray package<sup>42</sup>. Data were quantile normalized with control probes using the neqc function<sup>43</sup> in the limma R package. Batch effects were corrected with the sva package<sup>44</sup>. The gene symbols corresponding to Illumina probe ids were retrieved with the Illumina HumanHT12v4 annotation data. Differential gene expression analysis was performed with the limma package<sup>25</sup> and heat maps were constructed with pheatmap or heatmap2. Gene set enrichment analysis (GSEA)<sup>26</sup> was conducted on the sva corrected gene expression matrix (Bead Chip data) using the javaGSEA desktop application provided by the Broad Institute using the default parameters. Nominal *P*-values were calculated based on 1,000 permutations of the gene sets. A 40-member SASP gene set (Fig. 5a,b) was derived from the literature<sup>30,45</sup>: *AREG*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL5*, *CCL8*, *CCL26*, *CCR3*, *CSF2*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCL8*, *CCL20*, *HGF*, *ICAM1*, *IGFBP2*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, *IGFBP6*, *IGFBP7*, *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *IL6ST*, *IL7*, *IL13*, *MIF*, *MMP1*, *MMP3*, *MMP10*, *MMP12*, *MMP13*, *MMP14*, *OSM*, *TIMP2*, *TNFRSF10C*, *TNFRSF11B* and *TNFRSF18*.

GO analyses were performed with the goana function within the limma R package<sup>25</sup>. Phylogenetic analyses were done by aligning sequences with ClustalW and constructing trees with the R package APE (Analyses of Phylogenetics and Evolution)<sup>46</sup>. R scripts used for the transcriptomic analyses are available on GitHub (<https://github.com/CarlMann/sh-H2AFJ-transcriptome-analysis>).

**RNA-seq.** WI38hTERT cells stably transduced with pTRIPZ-sh-No Target or pTRIPZ-sh2-*H2AFJ* were grown in the presence of  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  doxycycline for 4 days to express the shRNAs and to allow time for knock-down of *H2AFJ* mRNA. One set of cells was collected for RNA extraction under proliferation conditions. Another set of cells was then treated with  $20 \mu\text{M}$  etoposide for 2 weeks to induce stable senescence. After 2 weeks in etoposide, fresh medium without etoposide was added and cells were incubated for one additional week before collecting cells under deep senescence conditions. Doxycycline was maintained throughout the 3 weeks in senescence to ensure continual expression of the shRNAs. 3 biological replicates in etoposide-induced senescence and 2 biological replicates in proliferation were analyzed for each cell line.

Ribo-Zero Magnetic Gold Kit (Epicentre, Cat #MRZG126, Madison, WI) was used to deplete ribosomal RNA. The isolated RNA was then sheared using RNA Fragmentation Reagents (Life Technologies, #AM8740, Grand Island, NY, USA) at  $80^\circ\text{C}$  for 1 min. The RNA fragment size range was mainly 100–500 bp on 2% E-gel (Life Technologies, #G4020-02, Grand Island, NY, USA). Double-stranded cDNA synthesis was primed with random hexamers using a double-strand cDNA Kit (Life

Technologies, #11917-010, Grand Island, NY, USA) following the manufacturer's protocol with some modification. Briefly, after first-strand cDNA synthesis, NucAway Spin Column (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) was used to remove dNTPs. Then, during the second strand reaction, dUTP was incorporated instead of dTTP. The reaction was then purified with QIAquick PCR spin column (Qiagen, #28106, Valencia, CA). The cDNA was then end-repaired with the End-It kit (Epicentre, Cat# ER0720, Madison, WI). After treatment with Klenow fragment (NEB, #M0212s, Ipswich, MA) and dATP, Illumina adapters were ligated to the protruding 3'-A' base (Promega Cat #M8221, Madison, WI). Ligated products were size selected on 2% E-gel (250–300 bp). The dUTP-containing second strand was removed by incubating with Uracil-DNA Glycosylase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), and the libraries were amplified with Phusion high-fidelity PCR master mix (NEB, #M0531 Ipswich, MA) and the Illumina genomic DNA primers 1.1 and 2.1 with the following conditions:  $98^\circ\text{C}$  for 30 s, 15 cycles of ( $98^\circ\text{C}$  for 10 s,  $65^\circ\text{C}$  for 30 s,  $72^\circ\text{C}$  for 30 s),  $72^\circ\text{C}$  for 5 min. The final amplified libraries were further purified by agarose gel excision and extraction. The library was subjected to 101 bp paired-end sequencing using Illumina's HiSeq 2000 Sequencer. Approximately 25 million paired-end reads were acquired for each sample

**RNA-seq bio-informatic analysis.** Quality control and adapter trimming of the fastq sequence files were done with FastQC (v0.11.2)<sup>47</sup> and the Trim Galore wrapper (v0.4.1)<sup>48</sup> for Cutadapt (v1.8.1)<sup>49</sup>. Options were set to remove Illumina TruSeq adapters and end sequences of quality inferior to 20: `trim_galore--illumina--paired--fastqc`. Successful processing was verified by re-running FastQC. Sequences were then aligned to the GRCh37 (hg19) human genome sequence using Tophat2 (v2.1.1)<sup>50,51</sup> with default parameters. The accepted\_hits.bam files produced by Tophat2 were then used with featureCounts from the Rsubread package<sup>52</sup> to assign and count the mapped fragments to genes using the hg19 annotation table provided in Rsubread. Differential gene expression analysis based on these count tables was then performed with DESeq2 (ref. 53). A script for the R specific portion of this analysis is provided on GitHub (<https://github.com/CarlMann/sh-H2AFJ-transcriptome-analysis>).

**Targeted chromatin immunoprecipitation.** Cells were crosslinked with formaldehyde 1% for 10 min and then quenched with glycine at 150 mM final concentration. Cells were washed with PBS, scraped and pelleted by centrifugation at 800 g for 10 min. Cells were resuspended in TM2 buffer (10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EGTA (pH 8.0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM PMFS, 1% Roche protease inhibitor cocktail) and transferred into Covaris-specific tubes. Volumes were adjusted to 1 ml. Sonication was then performed with a Covaris ultrasonicator S220 with the following settings: Peak incident Power : 140 W ; Duty Factor : 10% ; Cycles per burst : 200 ; duration : 20 min. Samples were then centrifuged at 14,000 g for 15 mins. at  $4^\circ\text{C}$ . Chromatin sonication was checked by treating an aliquot with RNase A and proteinase K and then running in a 2% agarose gel to check lengths of the DNA fragments. DNA concentrations were determined using a Nanodrop 2000. The protocol was optimized to yield a peak of sonicated chromatin around 300–500 bp. For each immunoprecipitation, up to 10  $\mu\text{g}$  of chromatin was used. Buffer was added to reach a volume of 500  $\mu\text{l}$ . Chromatin was prewashed using ChIP-grade protein G sepharose beads (GE Healthcare) and Sepharose beads + Normal Rabbit IgG (Cell Signaling #2729). An input of 5% (25  $\mu\text{l}$ ) was kept. 6  $\mu\text{g}$  of anti-H2A.J, 1.6  $\mu\text{g}$  of anti-H2A (Abcam 18255), or 5  $\mu\text{g}$  of control rabbit IgG were added and incubated overnight with rotation at  $4^\circ\text{C}$ . ChIP-grade protein G agarose beads were added to each IP reaction and incubated for 2 h. Beads were pelleted with brief centrifugation and supernatants were removed. Beads were washed 8 times in 10 ml low salt buffer (10 mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM PMFS, 1% PIC, 120 mM NaCl).

DNA was eluted using TE buffer + 1% SDS and by incubating at  $65^\circ\text{C}$  in a Thermomixer (1,200 r.p.m.) for 30 min. Beads were pelleted with a 1 min centrifugation at  $3,800 \times g$  and eluted chromatin supernatants were treated with proteinase K for 2 h at  $65^\circ\text{C}$  and DNA was purified using a NucleoSpin gel and PCR clean-up kit from Macherey-Nagel.

**ChIP-seq.** Cells were cross-linked as above, but then cell pellets were resuspended in 1 ml of Extraction buffer (0.25 M sucrose, 10 mM tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, PIC 1  $\times$ ) and incubated on ice for 10 min. Cells were spun at  $3,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  and supernatant was discarded. Pellet was resuspended in 300  $\mu\text{l}$  of Nuclei Lysis Buffer (50 mM TrisHCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS, 1  $\times$  PIC). Suspension was transferred in Diagenode tubes and sonicated in a Bioruptor Pico (12 cycles). Chromatin was spun at 14,000 g for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . Fragmentation was evaluated by running a fraction of the chromatin on a 1.2% Agarose gel. Chromatin was sonicated once again if necessary to obtain the appropriate range between 100 and 500 bp. For immunoprecipitation, chromatin was diluted 10-fold in ChIP dilution buffer (1.1% TritonX-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 Tris-HCl pH 8.0, 167 mM NaCl, plus a protease inhibitor cocktail). Chromatin was precleared by adding 10–15  $\mu\text{l}$  Protein A/G beads and incubated for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ . Samples were spun at  $100 \times g$  ( $4^\circ\text{C}$ ) for 1 min. 6  $\mu\text{g}$  of anti-H2A.J or 1.6  $\mu\text{g}$  of anti-H2A (Abcam 18255) were added and each sample was incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The next day, 30  $\mu\text{l}$  of Agarose A/G beads were added and incubated during 4 hours at  $4^\circ\text{C}$ . Immune complexes were recovered by spinning



down samples at 100 g for 1 min. 50 µl was collected to generate input DNA. Beads were washed 3 times using low salt wash buffer (150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 20 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0), 1 time using High Salt Wash buffer (500 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 20 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0), 1 time using LiCl buffer (0.25 M LiCl, 1% Igepal CA-630, 1% Sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) and one time using TE Buffer (10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Beads were resuspended in 50 µl of elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM DTT) and incubated with 2 µl of RNase for 30 min at 37 °C. This was followed by a 2 h incubation with 2.5 µl of proteinase K and glycogen (0.4 mg – 1 ml final) at 37 °C. Reverse crosslinking was performed by incubating overnight at 65 °C. To purify the immunoprecipitated DNA, supernatants were collected in fresh tubes and incubated with 2.2 X SPRI beads for 4 min at RT and 4 min on a magnetic rack. Supernatants was discarded and beads were washed 2 times with 80% EtOH. Beads were air-dried for 4 min, beads were resuspended in 35 µl of TrisHCl pH 8.0 and incubated 4 min at RT and then 4 min on a magnetic rack. Supernatant containing purified DNA were collected. DNA was quantify using a Qbit fluorometer. Illumina ChIP-seq libraries were then prepared with the NEXTflex CHIP-seq kit and Barcodes from Bio Scientific. 50 million single-end reads were acquired per sample. The fastq files were deposited at the SRA database under accession numbers SRR3824080, SRR3824087, SRR3824088 and SRR3824089.

**ChIP-seq data processing and analyses.** After quality filtering and adapter trimming using ea-utils fastq-mcf<sup>54</sup>, 50 bp reads were mapped to the human genome (hg19) using BWA-MEM<sup>55</sup>, considering only unique alignment. Optical and PCR duplicates were then removed using PicardTools (<http://picard.sourceforge.net>) and reads mapping in blacklisted region defined by the ENCODE consortium filtered using BedTools<sup>56</sup>. Tag density profiles were generated using deepTools bamCoverage<sup>57</sup> and a smoothing kernel with a 50-bp bandwidth. Cross-correlation was computed as described previously<sup>31</sup>. For each chromosome  $c \in C$ , the tag count vectors  $n_c^+$  and  $n_c^-$  were calculated to give the number of tags whose 5' ends map to the position  $x$  on the strand + or -. Strand cross-correlation for a strand shift  $\delta$  was then calculated as

$$X(\delta) = \sum_{c \in C} \frac{N_c}{N} \times P \left[ n_c^+ \left( x + \frac{\delta}{2} \right), n_c^- \left( x - \frac{\delta}{2} \right) \right]$$

where  $P[a,b]$  is the Pearson linear correlation coefficient between vectors  $a$  and  $b$ ,  $C$  is the set of all chromosomes,  $N_c$  is the number of tags mapped to a chromosome  $c$  and  $N$  is the total number of tags. For the meta-profiles, read counts (RPM) in non-overlapping 60 bp windows around transcription start sites (TSS) were quantified for the H2A.J, H2A, and input DNA libraries and normalized to the total number of reads. The RPM values were then used to calculate  $\log_2(H2A/Input)$  and  $\log_2(H2A.J/Input)$  around the TSS.

**RT-qPCR.** RNA was extracted from 500,000 cells using Nucleospin RNA kits (Machery-Nagel). cDNA was prepared from 1 µg of RNA using random hexamer primers or oligo-dT as indicated. Quantitative PCR was performed with a Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kits (Invitrogen) and an IQ5 thermocycler (Bio-Rad) following the manufacturer's protocols. Values were normalized to GAPDH RNA levels for human cells and to GAPDH and PPIA levels for mouse organs. DNA primers for the PCR are shown in Supplementary Table 3.

**Luminex assay of secreted inflammatory factors.** Conditioned media was isolated from four independent cultures of WI-38hTERT fibroblasts expressing either sh-NoTarget or sh3-H2AFJ RNAs. Media was analyzed from cells in proliferation or after inducing senescence by incubation with 20 µM etoposide for 9 days followed by 1 day in medium without etoposide. Cell numbers in the culture dishes were determined at the same time that media was collected and passed through 20 µm filters before freezing at -80 °C until analysis. A panel of 63 human cytokines/chemokines/growth and adhesion factors were immunoassayed in parallel using Luminex technology. This assay was performed by the Human Immune Monitoring Center (HIMC) at Stanford University. Human 63-plex kits were purchased from eBiosciences/Affymetrix and used following the manufacturer's protocol with minor modifications. Beads were added to a 96 well plate and washed in a Biotek ELx405. Samples were then added to the plate containing the mixed antibody-linked beads and incubated at room temperature for 1 hour followed by overnight incubation at 4 °C with shaking at 500-600 r.p.m. Following the overnight incubation plates were washed and then biotinylated detection antibody added for 75 min at room temperature with shaking. Plates was rewashed and streptavidin-PE was added. After incubation for 30 min and wash at room temperature, reading buffer was added to the wells and samples were measured with a Luminex 200 instrument with a lower bound of 50 beads per sample per cytokine. Custom assay control beads (Radix Biosolutions) were added to all wells. Fluorescent intensities were converted to concentrations using standard curves. The protein concentrations in the conditioned media were then normalized to the number of cells in the culture dishes at the time of collection.

**Data availability.** The Illumina idat files have been deposited in the GEO database under accession number GSE62701. RNA-seq data was deposited at the EBI Array Express under accession number E-MTAB-4920. The ChIP-seq fastq files were deposited at the SRA database under accession numbers SRR3824080, SRR3824087, SRR3824088 and SRR3824089.

R scripts used for the transcriptomic analyses are available on GitHub (<https://github.com/CarlMann/sh-H2AFJ-transcriptome-analysis>).

## References

- Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 685–705 (2013).
- Collado, M. & Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 51–57 (2010).
- Jun, J. I. & Lau, L. F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.* **12**, 676–685 (2010).
- Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* **31**, 722–733 (2014).
- Sagiv, A. & Krizhanovsky, V. Immunosurveillance of senescent cells: The bright side of the senescence program. *Biogerontology* **14**, 617–628 (2013).
- van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**, 439–446 (2014).
- Rai, T. S. & Adams, P. D. Lessons from senescence: Chromatin maintenance in non-proliferating cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 322–331 (2012).
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M. & Narita, M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* **28**, 99–114 (2014).
- Marzluff, W. F., Wagner, E. J. & Duronio, R. J. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 843–854 (2008).
- Talbert, P. B. & Henikoff, S. Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 264–275 (2010).
- Maze, I., Noh, K.-M., Soshnev, A. a. & Allis, C. D. Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 259–271 (2014).
- Duarte, L. F. *et al.* Histone H3.3 and its proteolytically processed form drive a cellular senescence programme. *Nat. Commun.* **5**, 5210 (2014).
- Chen, H. *et al.* MacroH2A1 and ATM play opposing roles in paracrine senescence and the senescence-associated secretory phenotype. *Mol. Cell* **59**, 719–731 (2015).
- Capell, B. C. *et al.* Mll1 is essential for the senescence-associated secretory phenotype. *Genes Dev.* **30**, 321–336 (2016).
- Contrepois, K., Ezan, E., Mann, C. & Fenaille, F. Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry for the fast profiling of histone post-translational modifications. *J. Proteome Res.* **9**, 5501–5509 (2010).
- Contrepois, K., Thuret, J.-Y., Courbeyrette, R., Fenaille, F. & Mann, C. Deacetylation of H4-K16Ac and heterochromatin assembly in senescence. *Epigenetics Chromatin* **5**, 15 (2012).
- Khare, S. P. *et al.* Histone-A relational knowledgebase of human histone proteins and histone modifying enzymes. *Nucleic Acids Res.* **40** (2012).
- Nishida, H., Suzuki, T., Tomaru, Y. & Hayashizaki, Y. A novel replication-independent histone H2a gene in mouse. *BMC Genet.* **6**, 10 (2005).
- Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–642 (2006).
- Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M. F. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* **21**, 43–48 (2007).
- Jeanblanc, M. *et al.* Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion. *Oncogene* **31**, 3072–3085 (2012).
- Kemp, C. J. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 460–473 (2005).
- Vindrieux, D. *et al.* PLA2R1 mediates tumor suppression by activating JAK2. *Cancer Res.* **73**, 6334–6345 (2013).
- Lopez, M. F. *et al.* Depletion of nuclear histone H2A variants is associated with chronic DNA damage signaling on drug-evoked senescence of human somatic cells. *Aging* **4**, 823–842 (2012).
- Ritchie, M. E. *et al.* Limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
- Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 15545–15550 (2005).
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073–1081 (2009).
- Cornen, S. *et al.* Candidate luminal B breast cancer genes identified by genome, gene expression and DNA methylation profiling. *PLoS ONE* **9**, e81843 (2014).
- Yao, J. *et al.* Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. *Cancer Res.* **66**, 4065–4078 (2006).



30. Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol. Med.* **16**, 238–246 (2010).
31. Kharchenko, P. V., Tolstorukov, M. Y. & Park, P. J. Design and analysis of ChIP-seq experiments for DNA-binding proteins. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1351–1359 (2008).
32. Yukawa, M. *et al.* Genome-wide analysis of the chromatin composition of histone H2A and H3 variants in mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE* **9**, e92689 (2014).
33. Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).
34. Schuler, N. & Rübner, C. E. Accumulation of DNA damage-induced chromatin alterations in tissue-specific stem cells: the driving force of aging? *PLoS ONE* **8**, e63932 (2013).
35. Bönisch, C. & Hake, S. B. Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: More or less stable? *Nucleic Acids Res.* **40**, 10719–10741 (2012).
36. Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* **11**, 973–979 (2009).
37. Malaquin, N., Carrier-Leclerc, A., Dessureault, M. & Rodier, F. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front. Genet.* **5**, 94 (2015).
38. Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* **30**, 1536–1548 (2011).
39. Barde, I., Salmon, P. & Trono, D. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr. Protoc. Neurosci.* **Chapter 4**, Unit 4–21 (2010).
40. Garcia, B. A. *et al.* Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2**, 933–938 (2007).
41. Gentleman, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**, R80 (2004).
42. Dunning, M. J., Smith, M. L., Ritchie, M. E. & Tavaré, S. Beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. *Bioinformatics* **23**, 2183–2184 (2007).
43. Shi, W., Oshlack, A. & Smyth, G. K. Optimizing the noise versus bias trade-off for Illumina whole genome expression BeadChips. *Nucleic Acids Res.* **38**, e204 (2010).
44. Leek, J. T., Johnson, W. E., Parker, H. S., Jaffe, A. E. & Storey, J. D. The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* **28**, 882–883 (2012).
45. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 99–118 (2010).
46. Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* **20**, 289–290 (2004).
47. Andrews, S. *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.* Available at <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/> (2010).
48. Krueger, F. *Trim Galore!*. Available at [[http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)] (2012).
49. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal* **17**, 10 (2011).
50. Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**, R36 (2013).
51. Trapnell, C. *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562–578 (2012).
52. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930 (2014).
53. Love, M. I., Anders, S. & Huber, W. Differential analysis of count data - the DESeq2 package. *Genome Biol.* **15** (2014).
54. Aronesty, E. *ea-utils: command-line tools for processing biological sequencing data* (2011).
55. Li, H. *Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM.* **3** (2013).
56. Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841–842 (2010).
57. Ramirez, F., Dündar, F., Diehl, S., Grüning, B. A. & Manke, T. deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**, W187–W191 (2014).

## Acknowledgements

C.M. received funding from the Fondation pour la Recherche Médicale (DEP20131128527), the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Comité de l'Essonne de la Ligue Contre le Cancer, and the CEA Plasticity and Instability of the Genome Program. C.C. was a doctoral fellow in the CEA International PhD. Program (Irtelis). B.A.B. has a Dean's fellowship at Stanford University. C.E.R. received funding from the German Research Foundation (RU 821/3-1) and the European Atomic Energy Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2011) under grant agreement n° 249689 (Low Dose Research towards Multidisciplinary Integration). M.S. was funded by NIH grants 5P01GM09913005 and 5P50HG00773502. We thank Virginie Lavilla for help with qPCR experiments, the eBio platform (Institut Français de Bioinformatique) for bioinformatics support, and the Stanford Human Immune Monitoring Center for performing the Luminex immunoassay.

## Author contributions

K.C. and F.F. performed mass spectrometry experiments and analyses, C.C., C.R., W.B., R.C., K.C., C.M., and J.Y.T. characterized shRNA vectors and performed phenotypic analyses, M.C.N., H.V., C.C., C.M. and C.R. prepared and characterized anti-H2A.J antibodies, C.E.R. and N.S. performed IHC on mice and human skin samples, C.C., C.D., and R.O. performed Illumina Bead Chip experiments, K.C. and Z.M. prepared RNA-seq libraries, J.F.D., O.B., and M.S. provided crucial resources, C.M., B.B., K.C., C.D., R.O., C.C., J.Y.T., and P.F.R. performed bio-informatic analyses, C.W. and D.B. performed the mouse DMBA + TPA experiments, C.C. and B.B. performed the ChIP experiments, K.C. and C.M. coordinated and oversaw the experiments, and C.M. wrote the manuscript with input from all authors.

## Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

**Competing interests:** The authors declare no competing interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Contrepois, K. *et al.* Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nat. Commun.* **8**, 14995 doi: 10.1038/ncomms14995 (2017).

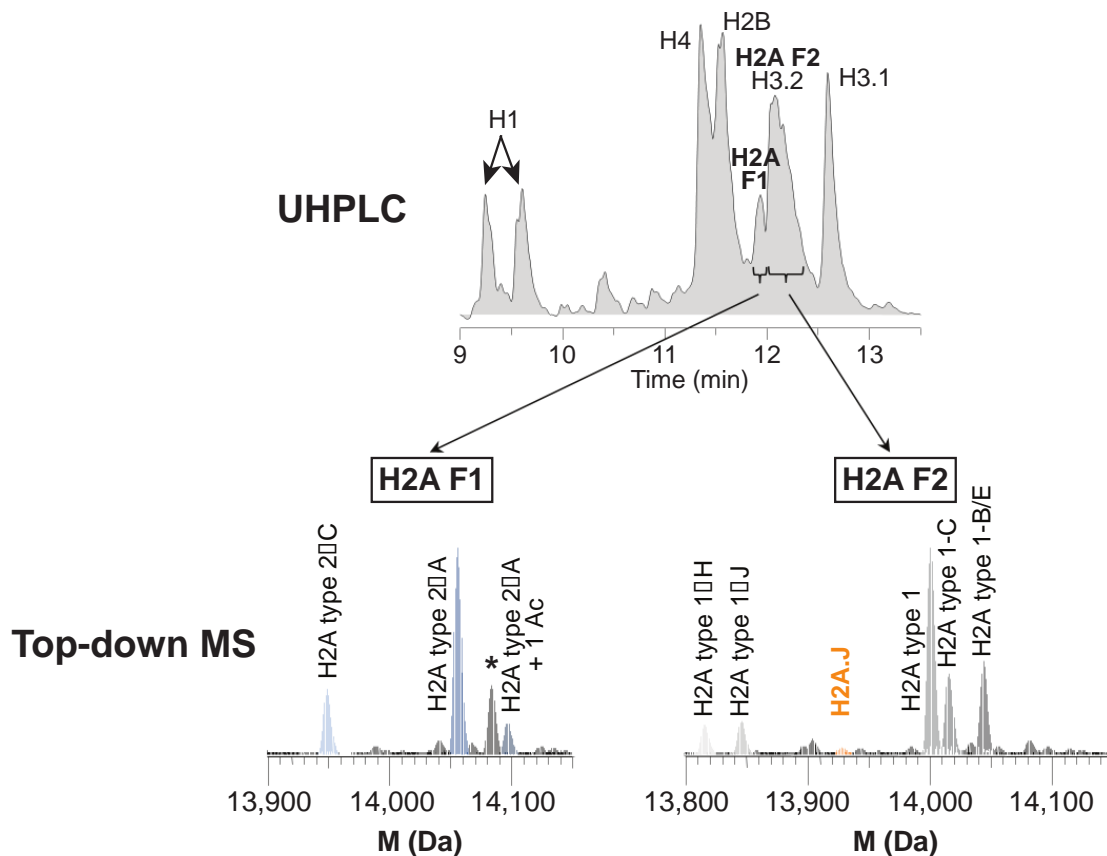
**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

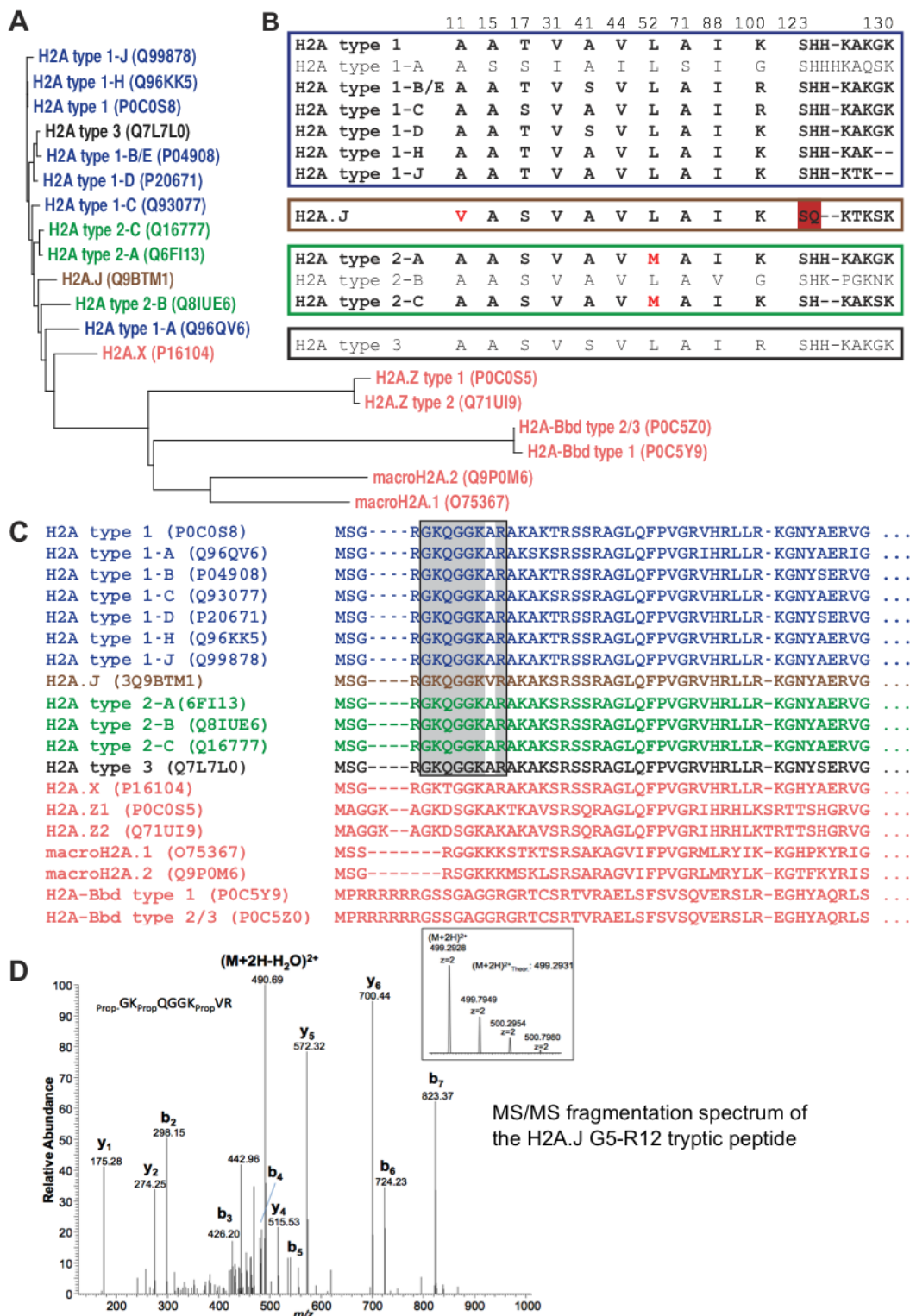
Q5



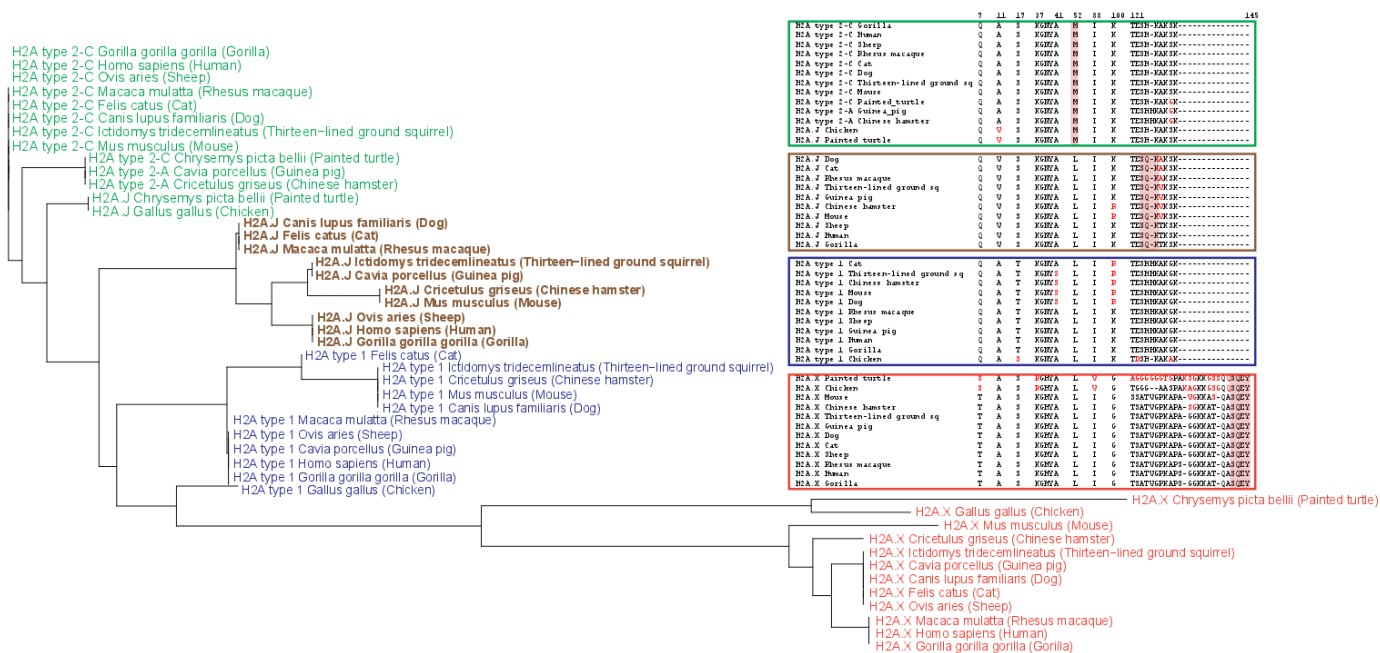
**Supplementary Figure 1.** Ultra high performance reverse-phase liquid chromatography (UHPLC) of histones and top-down mass spectrometry (Contrepois et al., 2010) of the two H2A fractions. H2A species with Met52 (H2A types 2-A and 2-C) elute in Fraction 1 (H2AF1) and are indicated as H2A1 in Fig. 1 d. H2A species with Leu52 (H2A type 1-H, H2A type 1-J, H2A.J, H2A type 1, H2A type 1-C and H2A type 1-B/E) elute in Fraction 2 (H2AF2) and are indicated as H2A2 in Fig. 1 d. See Supplementary Figs. 2,3 for a sequence alignment and phylogeny of human H2A proteins. The top-down mass spectra shown correspond to histones extracted from proliferating WI-38 human fibroblasts. Masses and accuracies of the main human H2A species observed by top-down MS are shown in Supplementary Table 1. \* = unidentified protein.

# Human H2A histones

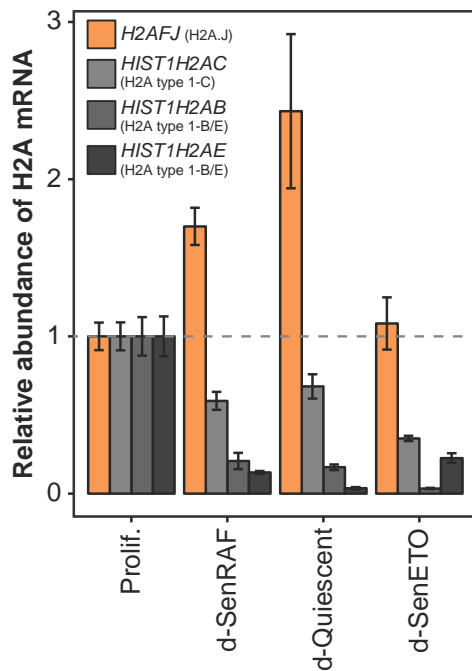
# Figure S2



**Supplementary Figure 2.** (A) Phylogenetic tree of all human H2A histones with their accession number. (B) Sequence alignment showing variation between H2A.J and the canonical H2A type 1, type 2 and type 3. H2A histones that were identified at the protein level by UHPLC-MS (see Fig. S1) are indicated in bold. (C) H2A amino-terminal sequences are shown with the peptide GKQGGKVR that is unique to H2A.J whereas GKQGGKAR is found in all canonical H2A histones and in H2A.X. These two peptides were used to quantify H2A.J levels relative to all canonical H2A + H2A.X in Fig. 1C. (D) MS/MS fragmentation spectrum of the G5-R12 tryptic peptide found in d-SenRep histones that was used to identify and quantify H2A.J. Histones were propionylated before and after trypsin digestion as indicated in the Methods.

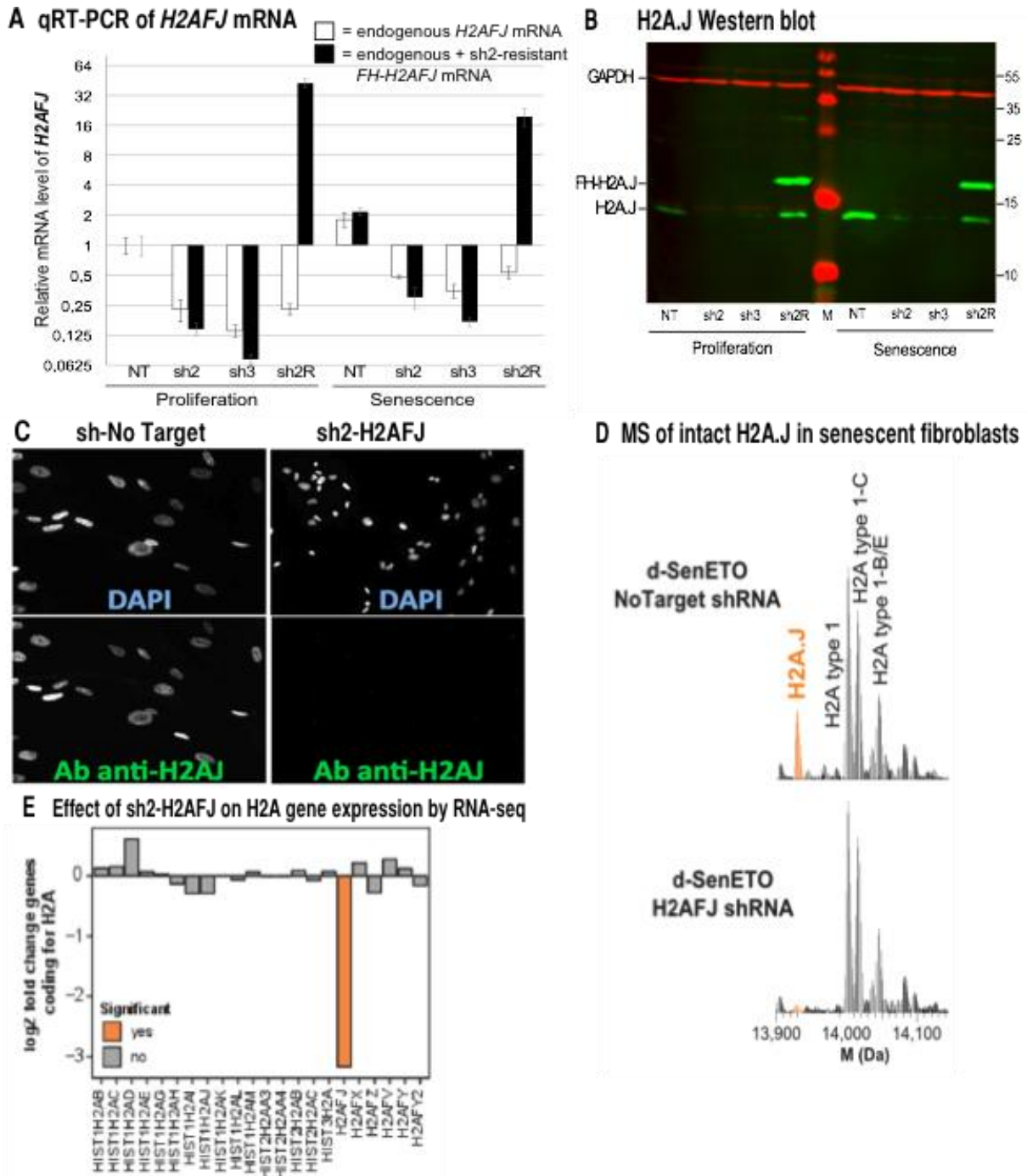


**Supplementary Figure 3.** Phylogenetic tree showing restriction of the H2A.J histone variant to the mammalian lineage, and sequence alignments of the H2A.J (brown), H2A.I (blue), H2A.2 (green), and H2A.X (red) families. The mammalian H2A.J variant is characterized by Val11 and an SQK motif 5 residues from the C-terminus of the protein. The residue at -4 from the C-terminus is hyper-variable in the H2A.J variants: it is Val in the rodent family, Thr in humans, gorilla, sheep, and Ala in most other Mammalia. The canonical H2As (H2A.I and H2A.2 families) all contain Ala11 without SQ. The H2A.X variant contains Ala11 and an SQEY motif at the C-terminus of the protein that is 12-15 residues longer than H2A.J and the canonical H2As. Note that a sequence encoded in many bird and reptilian genomes is annotated as H2A.J apparently because of a Val at position 11, but these sequences do not contain a C-terminal SQ motif (see chicken and painted turtle). These sequences also contain Met52 whereas the mammalian H2A.J species all contain Leu52. The mammalian H2A.J family may thus have evolved from an H2A sequence that acquired an A11V mutation during the evolution of the chordates followed by M52L and H124Q mutations during the evolution of the Mammalia.



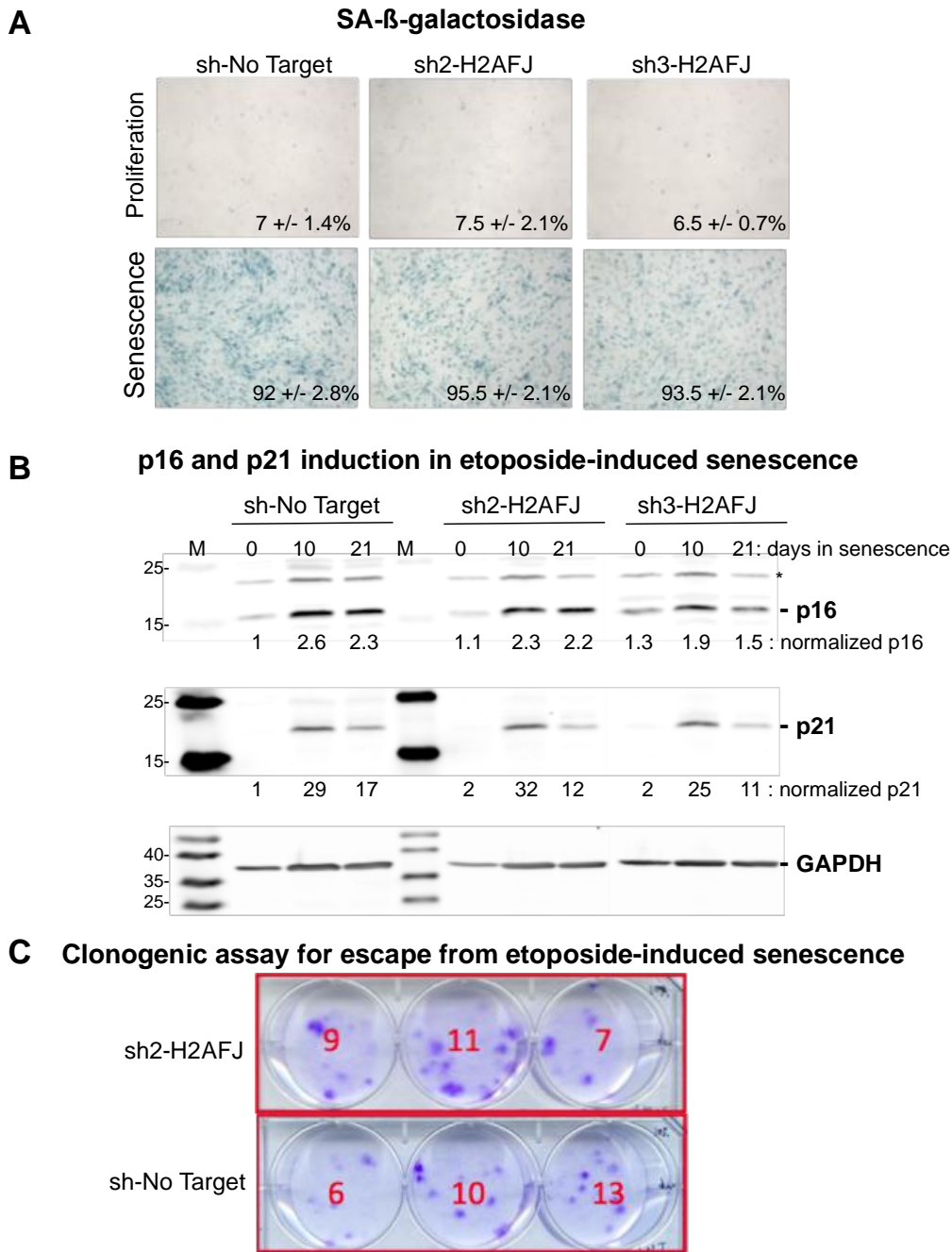
**Supplementary Figure 4.** RT-qPCR analysis of RNA levels of *H2AFJ* and selected canonical *H2A* species in senescent or quiescent cells relative to proliferating cells. Random primers were used to prepare cDNA to quantify total RNA. This experiment is an independent biological replicate of Fig. 3a. RNA levels were normalized to *GAPDH* mRNA and to the levels of *H2AFJ* mRNA in proliferating fibroblasts. RNAs were extracted from proliferating WI-38hTERT/GFP-RAF-ER fibroblasts (Prolif.), the same cells induced into quiescence by serum starvation for 20 days (d-Quiescent), induced into senescence by the expression of a hyperactive RAF kinase for 20 days (d-SenRAF), or induced into senescence by treatment with etoposide for 20 days (d-SenETO).





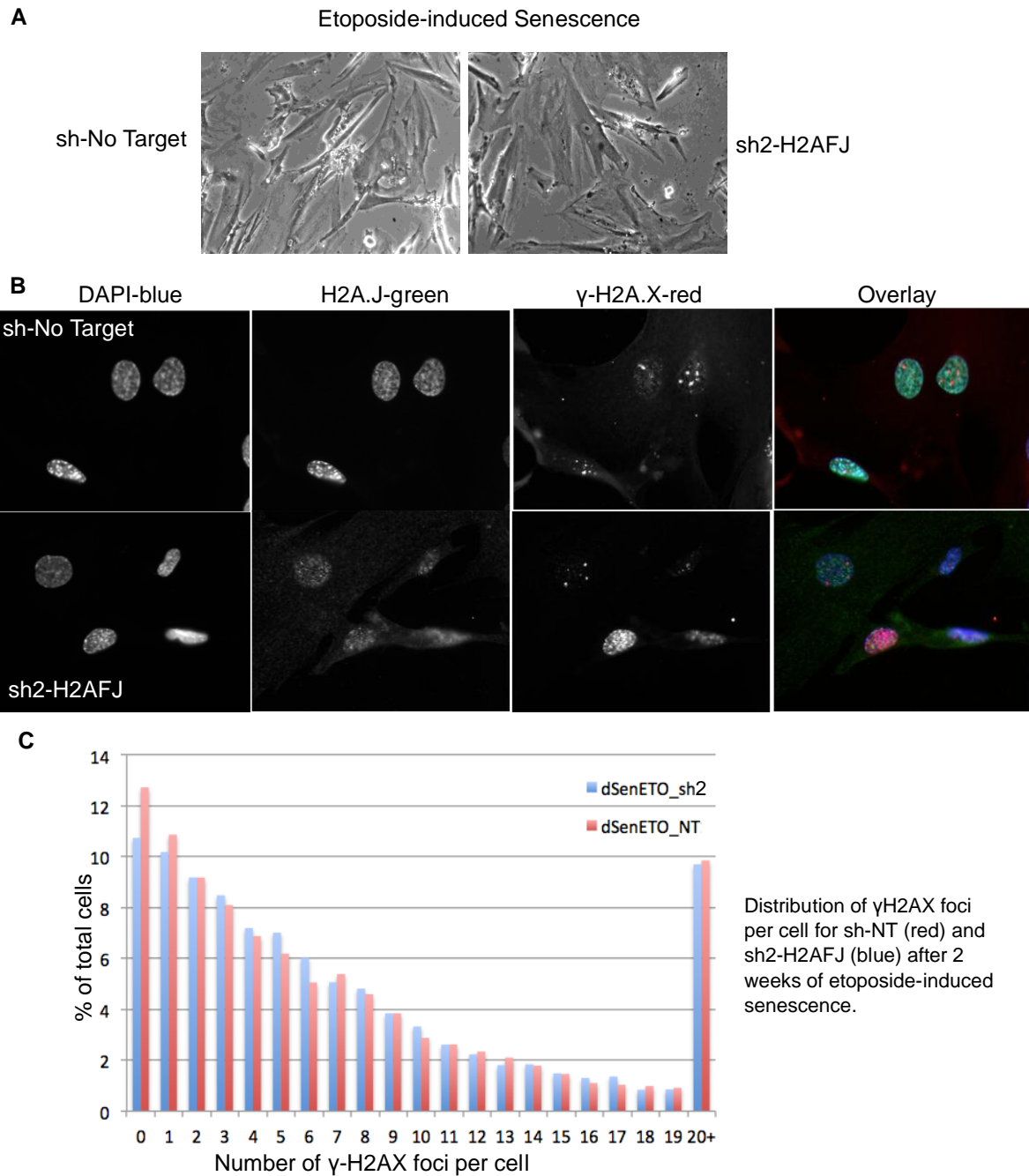
**Supplementary Figure 5.** Two distinct lentiviral shRNA sequences effectively knock-down *H2AFJ* mRNA and prevent accumulation of H2A.J in senescent human fibroblasts, and expression of an sh2-resistant *H2AFJ* cDNA restores *H2AFJ* expression. (A) RT-qPCR analysis of *H2AFJ* mRNA in proliferating and etoposide-senescent WI38hTERT fibroblasts expressing an sh-NoTarget RNA (NT), two different sh-*H2AFJ* RNAs (sh2 and sh3), or the sh2 RNA as well as an sh2-resistant *H2AFJ* mRNA. All shRNAs were expressed from pTRIPz. The black boxes show the quantity of total *H2AFJ* mRNA (endogenous + sh2 resistant-Flag-HA-*H2AFJ*) using primers within the *H2AFJ* coding sequence. The white boxes show the quantity of endogenous *H2AFJ* mRNA using a primer that is specific to the 5'-untranslated region of the endogenous *H2AFJ* mRNA. Mean and sd for n=3. (B) anti-H2A.J (green) Western blot of whole cell extracts from the same cells that were analyzed in

(A). The sh2-resistant form of *H2AFJ* also contains a Flag-HA epitope fused to the N-terminus of H2A.J (FH-H2A.J). GAPDH (red) was used as a loading control. Note that a band migrating at the level of endogenous H2A.J in cells expressing the sh2-resistant FlagHA-H2A.J cDNA is apparently due to some proteolysis of the N-terminal Flag-HA tag. (C) Indirect immunofluorescence of H2A.J in WI38hTERT fibroblasts expressing sh-No Target or sh2-H2AFJ RNAs and induced into senescence by etoposide treatment for 20 days. (D) Deconvoluted top-down mass spectra of H2A2 histones from senescent WI38hTERT fibroblasts expressing sh-No Target or sh2-*H2AFJ* RNAs. (E) Effect of sh2-*H2AFJ* on the expression of all related H2A gene sequences in the human genome as determined by RNA-seq. RNA-seq data was obtained from a biological triplicate of WI38hTERT cells expressing either sh2-*H2AFJ* or sh-NoTarget RNAs and induced into senescence by etoposide treatment for 20 days. The graph shows the log<sub>2</sub> fold-change of RNAs for the indicated H2A genes for cells expressing sh2-*H2AFJ* versus sh-NT. Only the *H2AFJ* mRNA is significantly decreased by the expression of sh2-*H2AFJ*.

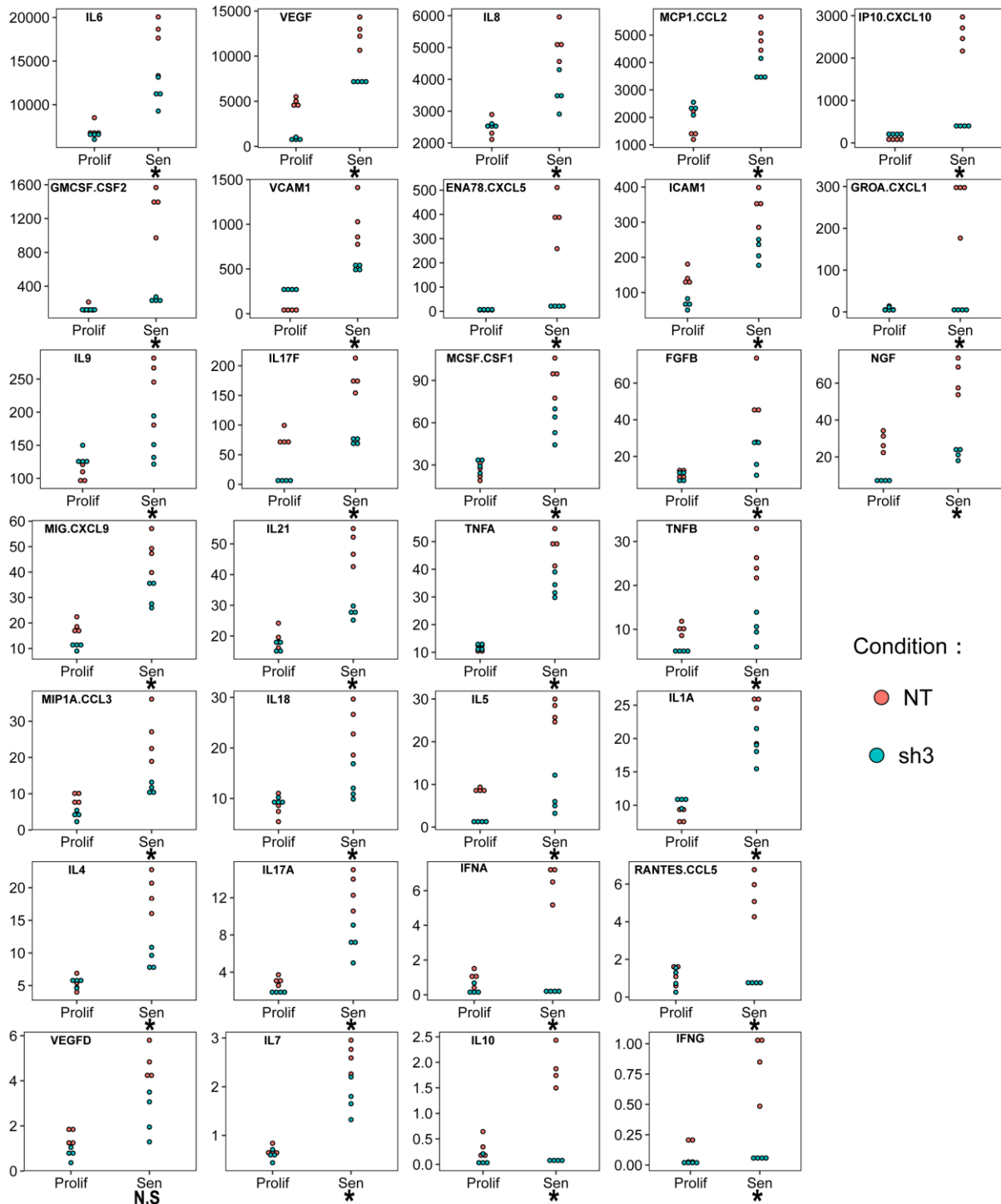


**Supplementary Figure 6.** *H2A.J* knock-down does not inhibit induction (A,B) or maintenance (C) of etoposide-induced senescence of WI-38hTERT fibroblasts. (A) WI-38hTERT fibroblasts expressing sh-No Target or sh2-*H2AFJ* or sh3-*H2AFJ* RNAs in proliferation or etoposide-induced senescence for 1 week stained for senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity. The percentage of positive cells is shown. Mean and sd for 3 fields containing at least 300 cells. (B) Immunoblot of p16 and p21 expression in the same cells after addition of etoposide for the indicated number of days. (C) WI-38hTERT fibroblasts expressing sh-No Target or sh2-*H2AFJ* RNAs were induced into senescence by treatment with 20  $\mu$ M etoposide for 2 weeks. Cells were then trypsinized and replated at a density of 10,000 cells per 35 mm dish and incubated for a further 2 weeks without etoposide to allow the proliferation of clones that had escaped senescence. Triplicate replicates of crystal violet stained cells are shown. No significant difference in senescent escape frequency was observed for fibroblasts expressing sh-No Target or sh2-*H2AFJ*.



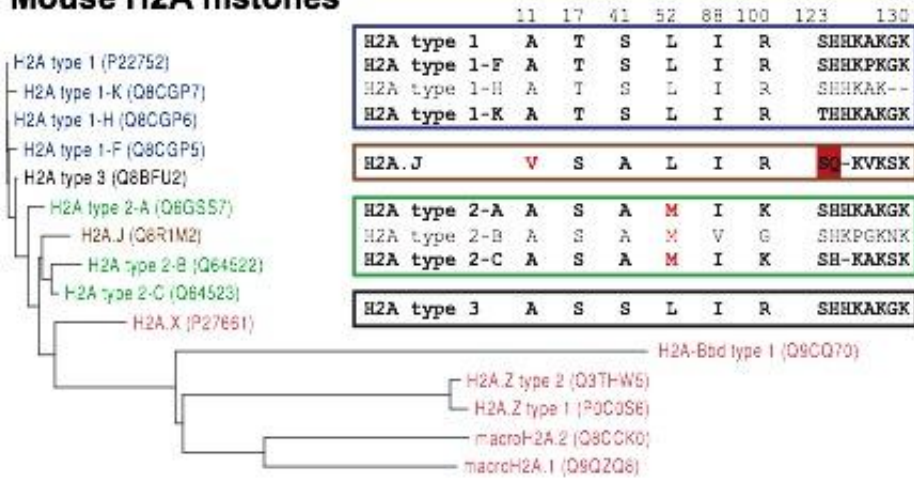


**Supplementary Figure 7.** *H2A.J* depletion does not affect the morphology, DNA compaction, or  $\gamma$ H2AX foci distribution of WI-38hTERT fibroblasts in etoposide-induced senescence. Cells expressing sh-No Target or sh2-*H2AFJ* RNAs were treated with 20  $\mu$ M etoposide for 2 weeks to induce senescence. (A) phase-contrast imaging of cell morphology. (B) Immunofluorescent staining of H2A.J and  $\gamma$ H2AX. DNA compaction was visualized with DAPI. (C) Quantification of  $\gamma$ H2AX foci per cell using an Operetta high-content image analyser.

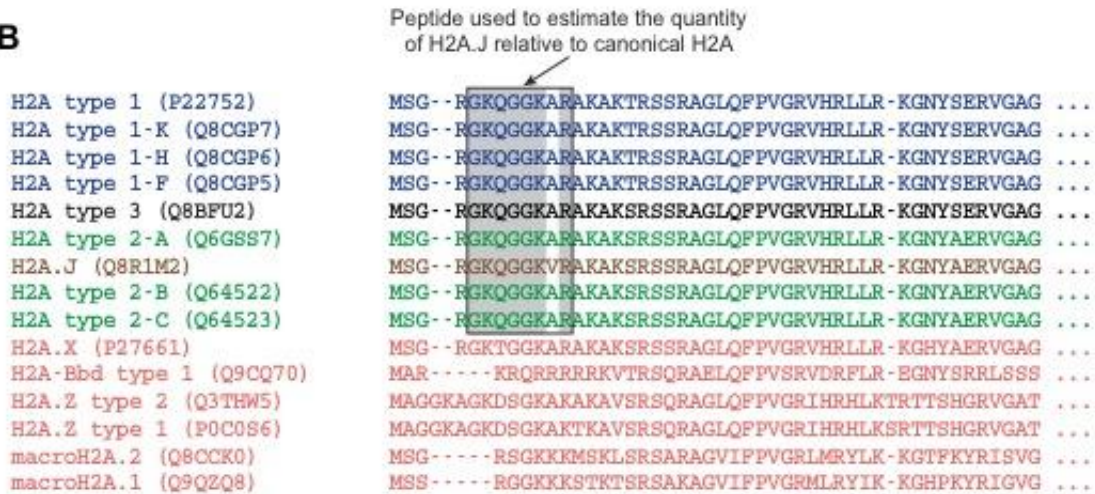


**Supplementary Figure 8.** Dot plots showing the concentration (pg/ml) of the indicated human proteins secreted into the media of WI-38hTERT cells expressing sh-NoTarget RNA (salmon color) or sh3-*H2AFJ* RNA (turquoise color) for cells in proliferation (Prolif) or senescence induced by etoposide treatment (Sen). Each dot represents a biological replicate. An asterisk below the strip-plot indicates a significant difference ( $p < .05$ ) between sh-NT and sh3.

## A Mouse H2A histones



## B

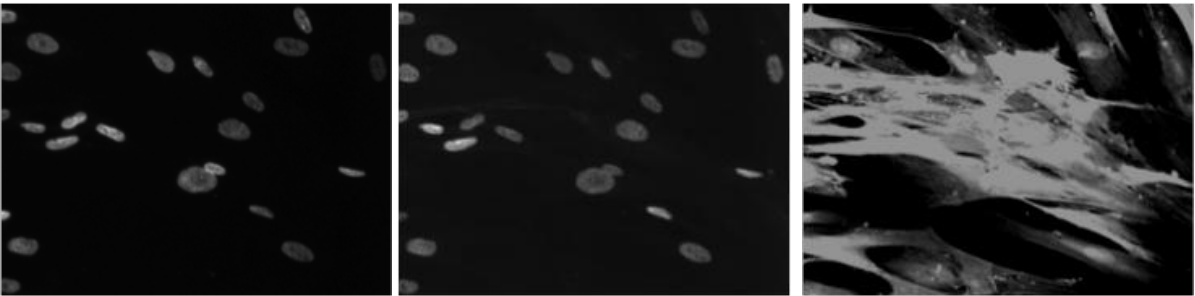


**Supplementary Figure 9. Mouse H2A histones.** (A) Phylogenetic tree of all mouse H2A histones with their accession number. Variation in amino acid sequences is shown. H2A histones that were identified at the protein level (Fig. 8) are indicated in bold. See Supplementary Table 2 for a list of masses used to identify these proteins (B) H2A amino-terminal sequences are shown with the peptide GKQGGKVR that is unique to H2A.J whereas GKQGGKAR is found in all canonical H2A histones. These two peptides were used to quantify H2A.J levels relative to all canonical H2A species in Fig. 8d.

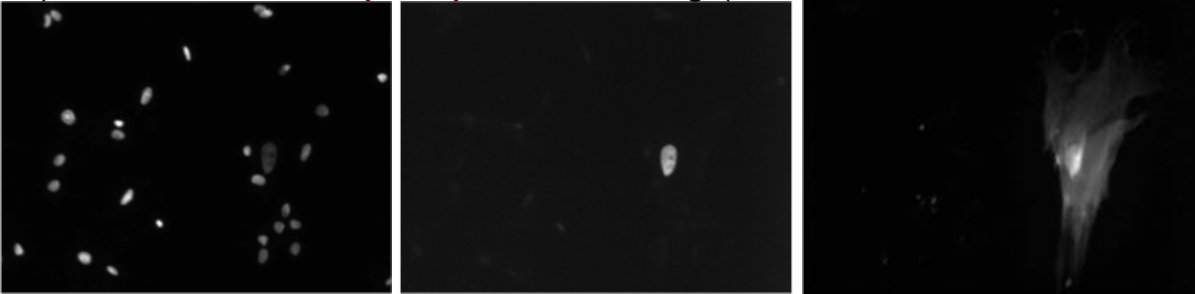
A) Proliferating



B) **Senescent (RFP)**



C) Mix **Senescent (RFP)**: Proliferating (1:50)



D) Mix Senescent: **Quiescent (RFP)** (1:50)



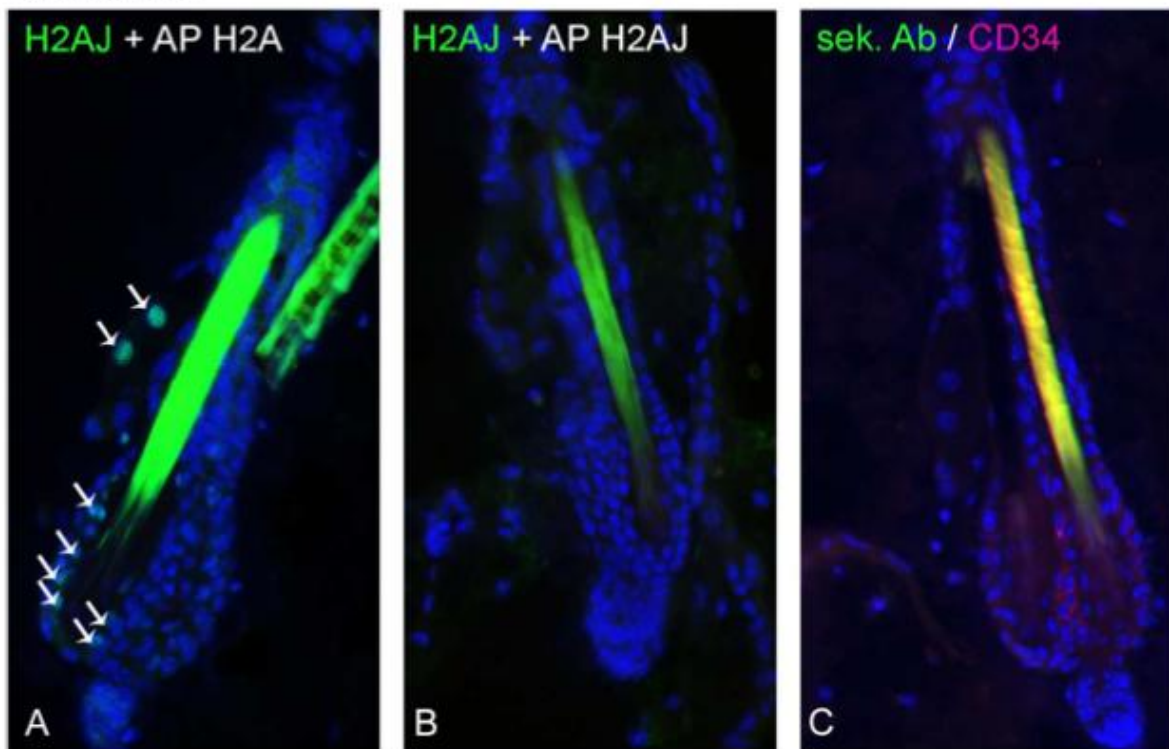
**DAPI**

**anti-H2A.J**

**RFP**

**Supplementary Figure 10.** *H2A.J immunofluorescence allows detection of senescent human fibroblasts with high sensitivity and specificity in mixing experiments.* WI-38hTERT cells expressing RFP were induced into senescence by treating with 20  $\mu$ M etoposide for 2 weeks, or incubated with medium containing only 0.1% fetal bovine serum to induce quiescence. Proliferating fibroblasts without RFP, senescent RFP cells and a mix of the two at the indicated ratios were fixed and treated for indirect immunofluorescence with rabbit anti-H2A.J antibodies and anti-rabbit-IgG-Alexa488 (green) secondary antibodies. **(A)** proliferating cells stain weakly for H2A.J **(B)** senescent-RFP cells stain strongly for H2A.J **(C)** H2A.J staining identifies the rare senescent cells in a mix (1:50) of senescent:proliferating cells. **(D)** Senescent cells without RFP were mixed with quiescent-RFP cells at a ratio of 1:50. H2A.J staining readily distinguished the rare senescent cells from the quiescent cells. Note that panels A-C show a 200x magnification whereas panel D show a 630x magnification.

24 months



**Supplementary Figure 11.** *Specificity of the H2A.J immunofluorescent signal demonstrated by competition with antigenic peptides.* Sections of 24 month old mouse skin samples were stained with antibodies to H2A.J in the presence of a 1,000-fold molar excess of the C-terminal peptide of canonical H2A (TESHHKAKGK-panel A), or the C-terminal peptide of H2A.J (TESQKTKSK-panel B). The H2A.J peptide competed out the signal whereas the canonical H2A peptide had no effect. C) The secondary Alexa-488-anti-rabbit Ab (green) alone showed no staining. The CD34 mouse Ab and the Alexa-568-anti-mouse Ab (magenta) shows the specific staining of the CD34+ hair follicle stem cells. The hair in the follicles shows broad auto-fluorescence.

**Supplementary Table 1. Masses and accuracies of the main human H2A species observed by UHPLC-MS and found in a dSenRAF sample as depicted on Fig. 1.** Theoretical and observed masses are monoisotopic masses. Theoretical masses were calculated based on primary sequences and post-translational modifications.

Histones	Accession number	PTMs <sup>a</sup>	Theoretical masses (Da)	Observed masses (Da)	$\Delta m$	Error (ppm)
H2A type 1-H	Q96KK5	N-terminal acetylation	13,808.80	13,808.68	-0.12	-8.7
H2A type 1-J	Q99878	N-terminal acetylation	13,838.81	13,838.88	0.07	5.1
H2A type 2-C	Q16777	N-terminal acetylation	13,890.81	13,890.71	-0.10	-7.2
H2A.J	Q9BTM1	N-terminal acetylation	13,921.90	13,921.82	-0.08	-5.7
H2A type 1	P0C0S8	N-terminal acetylation	13,993.92	13,993.88	-0.04	-2.9
H2A type 2-A	Q6FI13	N-terminal acetylation	13,997.86	13,997.87	0.01	0.7
H2A type 1-C	Q93077	N-terminal acetylation	14,007.91	14,007.92	0.01	0.7
H2A type 1-B/E	P04904	N-terminal acetylation	14,037.92	14,037.86	-0.06	-4.3

<sup>a</sup> Acetylation leads to a mass shift of +42.01 Da.

**Supplementary Table 2. Masses and accuracies of the main mouse H2A species observed by UHPLC-MS and found in a kidney extract (3 months, rep.2) as depicted on Fig. 2.** Theoretical and observed masses are monoisotopic masses. Theoretical masses were calculated based on primary sequences and post-translational modifications.

Histones	Accession number	PTMs <sup>a</sup>	Theoretical masses (Da)	Observed masses (Da)	$\Delta m$	Error (ppm)
H2A type 2-C	Q64523	N-terminal acetylation	13,922.80	13,922.81	0.01	0.7
H2A.J	Q8CGP6	N-terminal acetylation	13,947.92	13,947.97	0.05	3.6
H2A type 3	Q8BFU2	N-terminal acetylation	14,023.90	14,024.00	0.10	7.1
H2A type 2-A	Q6GSS7	N-terminal acetylation	14,029.85	14,029.87	0.02	1.4
H2A type 1	P2252	N-terminal acetylation	14,037.92	14,037.95	0.03	2.1



<b>H2A type1-K</b>	Q8CGP7	N-terminal acetylation	14,051.94	14,051.95	0.01	0.7
<b>H2A type 1-F</b>	Q8CGP5	N-terminal acetylation	14,063.94	14,063.99	0.05	3.6

<sup>a</sup> Acetylation leads to a mass shift of +42.01 D

### Supplementary Table 3. Primers used in this study for qPCR:

Human Primers		
H2AFJ_EXON1 (1)	for	TCGGGTGCGGTACGTTGCATTC
	rev	GGAGCGGGATTGGCCTTTGCT
H2AFJ_EXON1 (2)	for	AGCAAAGGCCAAATCCCGCTCC
	rev	CAGCTCCAGGATCTCCGCCGTA
GAPDH	for	ATGGGGAAGGTGAAGGTCTG
	rev	GGGGTCATTGATGGCAACAATA
CXCL5	for	AGCTGCGTTGCGTTTGTTC
	rev	TGGCGAACACTTGCAGATTAC
CXCL6	for	AGAGCTGCGTTGCACTTGTT
	rev	GCAGTTTACCAATCGTTTTGGGG
IL1A	for	TGGGTTCCAGTTGGAGTTT
	rev	AGCCTCCTGAATAGCTGGGA
CXCL1	for	AACAGCCACCAGTGAGCTTC
	rev	GAAAGCTTGCTCAATCCTG
CXCL2	for	GCTTCCTCCTCCTTCTGGT
	rev	GGGCAGAAAGCTTGTCTCAA
CXCL3	for	ACCCTGCAGGAAGTGCAAT
	rev	ATCCCCATGGTTCAGAAA
COL17A1	for	TTACCCGCCATGCGTATGAAG
	rev	CAGTCGAACTCGAATTTCACTCT
CCL2_promoter	for	CCCCTGCTTCCCTTTCCTAC
	rev	TATTGAAAGCGGGCAGAGGG
CCL2_exon	for	CAGCCAGATGCAATCAATGCC
	rev	TGGAATCCTGAACCACTTCT
IL1B_promoter	for	CGTTGTGCAGTTGATGTCCA
	rev	TGTCTTCCACTTTGTCCACA
IL1B_exon	for	TTCGACACATGGGATAACGAGG
	rev	TTTTTGTGTGAGTCCCGGAG
CXCL5_promoter	for	GGAGGAGCGAAGATTGGAG
	rev	CTTCCCACTGCCCATGA
CXCL5_exon	for	AGCTGCGTTGCGTTTGTTC
	rev	TGGCGAACACTTGCAGATTAC
GAPDH_promoter	for	AAAAGCGGGGAGAAAGTAGG
	rev	AAGAAGATGCGGCTGACTGT

GADPH_exon	for	CTGGGCTACACTGAGCACC
	rev	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG
BCL2A1_promoter	for	CCCGAGTAGCTGGGATTACA
	rev	CCTAGCACTTTGGGAGGACA
BCL2A1_exon	for	AGTGCTACAAAATGTTGCGTTC
	rev	GGCAATTTGCTGTCGTAGAAGTT
HIST1H2AC_EXON1 (1)	for	CGTGAGCTTAGGCCGCTGGTTTT
	rev	CGCGAGCTTTGCCTCCTTGCTTA
HIST1H2AC_EXON1 (2)	for	GCTTAGGCCGCTGGTTTTGGTGA
	rev	AACTGGAGACCAGCGCGAGAAGA
HIST1H2AC_EXON2 (1)	for	GCTCTGCTATTCTGCTGGAATGGTG
	rev	ACGTTGAGTCTAGCCCAAGAGTGAC
HIST1H2AC_EXON2 (2)	for	CTCTGCTATTCTGCTGGAATGGTGG
	rev	CGTTGAGTCTAGCCCAAGAGTGAC
HIST1H2AD_EXON1 (1)	for	CCGAGCTAAGGCTAAGACCCGCT
	rev	GACTCGCTCGGAGTAGTTGCCCT
HIST1H2AD_EXON1 (2)	for	CGGAAAGGCCCGAGCTAAGGCTA
	rev	CTCGGCCGTCAGGTACTCCAACA
HIST1H2AD_EXON2 (1)	for	TCTGCGTTTTTCAGAGCTCGGCG
	rev	TCACTCGCTTGGCGTGAATGGC
HIST1H2AD_EXON2 (2)	for	TCGCAAACCTGCCATTCCAGCGT
	rev	TCACCGCCGAGCTCTGAAAACG
HIST1H2AE_EXON1 (1)	for	GGAAGCCACTATGTCTGGACGTGGA
	rev	GAACGCGTTTTAGCTTTGCCCGAG
HIST1H2AE_EXON1 (2)	for	GCCACTATGTCTGGACGTGGAAAGC
	rev	AAACTGAAGACCGGCCCTGGAAGAA
HIST1H2AB_EXON1 (1)	for	GCAAACAAGGCGGTAAAGCTCGC
	rev	TGCAAACCTGCACGAGAAGACCG
HIST1H2AB_EXON1 (2)	for	TTTGAGTTTCTGTGGGCCGAG
	rev	TACTCAAGCACCGCCGCGAGATA
<b>Mouse Primers</b>		
H2AFJ_EXON1	for	GGCGAGGGACAACAAGAAGA
	rev	TCTGTGGGTTCACTTGCTC
HIST3H2A_EXON1	for	GAAGATGTCTGGTCGTGGCA
	rev	TATTCTAGCACAGCCGCCAG
HIST1H2AB_EXON1	for	AACGCATACATGTCTGGACGC
	rev	CGAGTAGTTGCCCTTGGCG
GAPDH	for	TTCACCACCATGGAGAAGGC
	rev	GGCATGGACTGTGGTCATGA
PPIA	for	ATGGCAAATGCTGGACCAA
	rev	GCCTTCTTTCACCTTCCCAA



- Barde, I., Salmon, P., and Trono, D. (2010). Production and titration of lentiviral vectors. *Curr. Protoc. Neurosci.*
- Contrepois, K., Ezan, E., Mann, C., and Fenaille, F. (2010). Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry for the fast profiling of histone post-translational modifications. *J Proteome Res* 9, 5501–5509.
- Contrepois, K., Thuret, J.-Y., Courbeyrette, R., Fenaille, F., and Mann, C. (2012). Deacetylation of H4-K16Ac and heterochromatin assembly in senescence. *Epigenetics Chromatin* 5, 15.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 99–118.
- Dunning, M.J., Smith, M.L., Ritchie, M.E., and Tavaré, S. (2007). Beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. *Bioinformatics* 23, 2183–2184.
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., and Yakhini, Z. (2009). GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10, 48.
- Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 16, 238–246.
- Garcia, B.A., Mollah, S., Ueberheide, B.M., Busby, S.A., Muratore, T.L., Shabanowitz, J., and Hunt, D.F. (2007). Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc* 2, 933–938.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, R80.
- Jeanblanc, M., Ragu, S., Gey, C., Contrepois, K., Courbeyrette, R., Thuret, J.Y., and Mann, C. (2012). Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion. *Oncogene* 31, 3072–3085.
- Jiao, X., Sherman, B.T., Huang, D.W., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. (2012). DAVID-WS: A stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics* 28, 1805–1806.
- Kemp, C.J. (2005). Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* 15, 460–473.
- Leek, J.T., Johnson, W.E., Parker, H.S., Jaffe, A.E., and Storey, J.D. (2012). The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 28, 882–883.
- Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20, 289–290.
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43, e47.
- Schuler, N., and Rube, C.E. (2013). Accumulation of DNA Damage-Induced Chromatin Alterations in Tissue-Specific Stem Cells: The Driving Force of Aging? *PLoS One* 8.
- Shechter, D., Dormann, H.L., Allis, C.D., and Hake, S.B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* 2, 1445–1457.
- Shi, W., Oshlack, A., and Smyth, G.K. (2010). Optimizing the noise versus bias trade-off for Illumina whole genome expression BeadChips. *Nucleic Acids Res.* 38.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545–15550.
- Vindrieux, D., Augert, A., Girard, C.A., Gitenay, D., Lallet-Daher, H., Wiel, C., Le Calve, B., Gras, B., Ferrand, M., Verbeke, S., et al. (2013). PLA2R1 mediates tumor suppression by activating JAK2. *Cancer Res.* 73, 6334–6345.

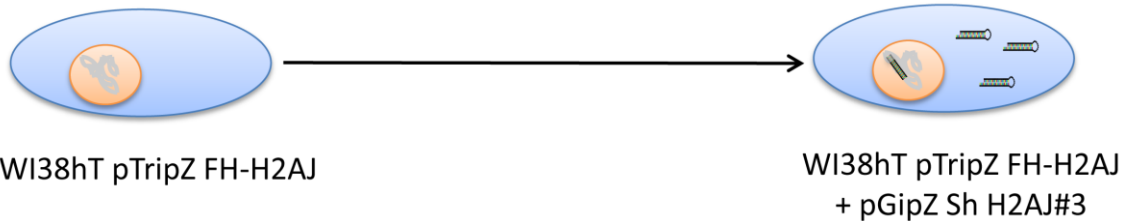
# RESULTATS COMPLEMENTAIRES

## Importance mécanistique des particularités de séquences de H2AJ

Le variant H2A.J possède plusieurs acides aminés qui diffèrent de la séquence de H2A canonique :

- A l'extrémité N-terminale, une valine en position 11 remplace une alanine : cette particularité est spécifique à H2A.J, aucun autre variant ne possède une valine à cette position.
- Sur la queue C-terminale, un motif de phosphorylation SQ semblable à celui de H2A.X peut se retrouver en position 123.

Afin d'explorer plus en détail l'importance de ces modifications, nous avons créé plusieurs lignées de fibroblastes WI38, immortalisés avec hTert, dont l'expression de H2A.J endogène est rendue silencieuse par l'expression constitutive du shH2AJ #3 (figure 26). Chacune de ces lignées est alors complétée par l'expression ectopique d'une histone, le plus souvent une version mutée de H2AJ dont la séquence a été légèrement modifiée (**figure 26**).

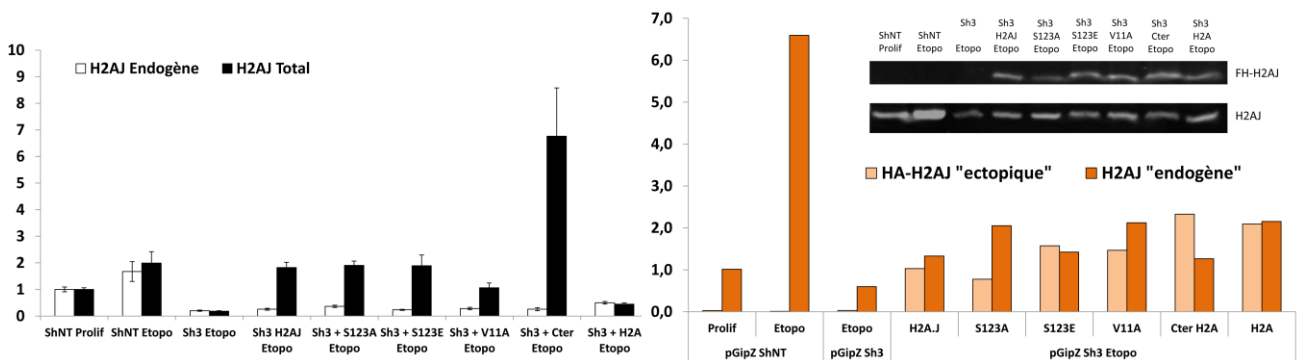


**Figure 26.** Schéma de la double transfection dans nos lignées exprimant une version mutée de H2AJ.

La liste complète des histones exprimées ectopiquement est résumée dans ce tableau :

Histone exprimée ectopiquement	Position des acides aminés	
	11	122-130
H2A canonique	A	ESHHKAKGK
H2A.J	V	ESQ-KTKSK
S123A	V	EAQ-KTKSK
S123E	V	EEQ-KTKSK
V11A	A	ESQ-KTKSK
C-ter H2A	V	ESHHKAKGK

La déplétion est exprimée constitutivement tandis que l'expression de l'histone complémentaire est sous le contrôle d'un promoteur tet-on. Il est donc possible de moduler la complémentation en faisant varier la concentration de Doxycycline. Nous avons vérifié le niveau d'expression de H2AJ endogène ainsi que le niveau d'expression de l'histone exprimée ectopiquement dans chacune de ces lignées. (Figure 27) En plus des lignées mutantes sur lesquels nous avons vérifié le niveau d'ARNm et le niveau de protéine, nous utilisons également deux lignées contrôles, l'une contenant que le pTripZ NoTarget et l'autre ne contenant que le pTripZ sh3.



**Figure 27. Vérification des lignées exprimant une version mutée de H2A.J.**

A gauche, quantité relative d'ARNm codant pour H2AJ endogène (en blanc) et H2AJ total : endogène et ectopique (en noir). A droite, Western Blot anti-H2AJ et sa quantification relative de H2AJ par rapport à GAPDH.

On peut remarquer que le niveau d'ARNm de H2AJ endogène est correctement réprimé dans toutes les lignées et que l'expression ectopique des versions mutées de H2AJ est plus ou moins proche des contrôles sauf pour le mutant « c-ter H2A ». En effet, le niveau d'ARNm semble particulièrement élevé. Cependant, on ne retrouve pas cette différence au niveau protéique. (figure 27)

En testant la complémentation de ces histones mutées sur l'expression de certains gènes du SASP (CXCL 1, CXCL 5, IL1 $\alpha$ ) après trois semaines de sénescence, plusieurs résultats apparaissent. (figure 28)

Il est possible de remarquer dans un premier temps une certaine cohérence des résultats entre les différents gènes testés. Les contrôles nous montrent bien que les gènes sont dérèprimés en sénescence (différence entre la condition prolif et shNT) et que l'expression du sh3 réduit fortement cette dérèpression. Enfin, l'expression ectopique de H2AJ permet de retrouver cette dérèpression à un niveau parfois plus élevé que la condition contrôle (NoTarget).

La mutation S123A ne semble jamais être en mesure de compléter l'absence d'expression endogène de H2AJ tandis que la mutation S123E permet la complémentation. Cette position 123 est d'ailleurs un site de phosphorylation potentielle dans la version sauvage de H2AJ. Remplacer la sérine par une alanine bloque toute phosphorylation possible tandis que la présence d'un acide glutamique

est souvent utilisée pour mimer une phosphorylation. Ces résultats semblent indiquer que cet acide aminé est important pour que H2AJ assure sa fonction.

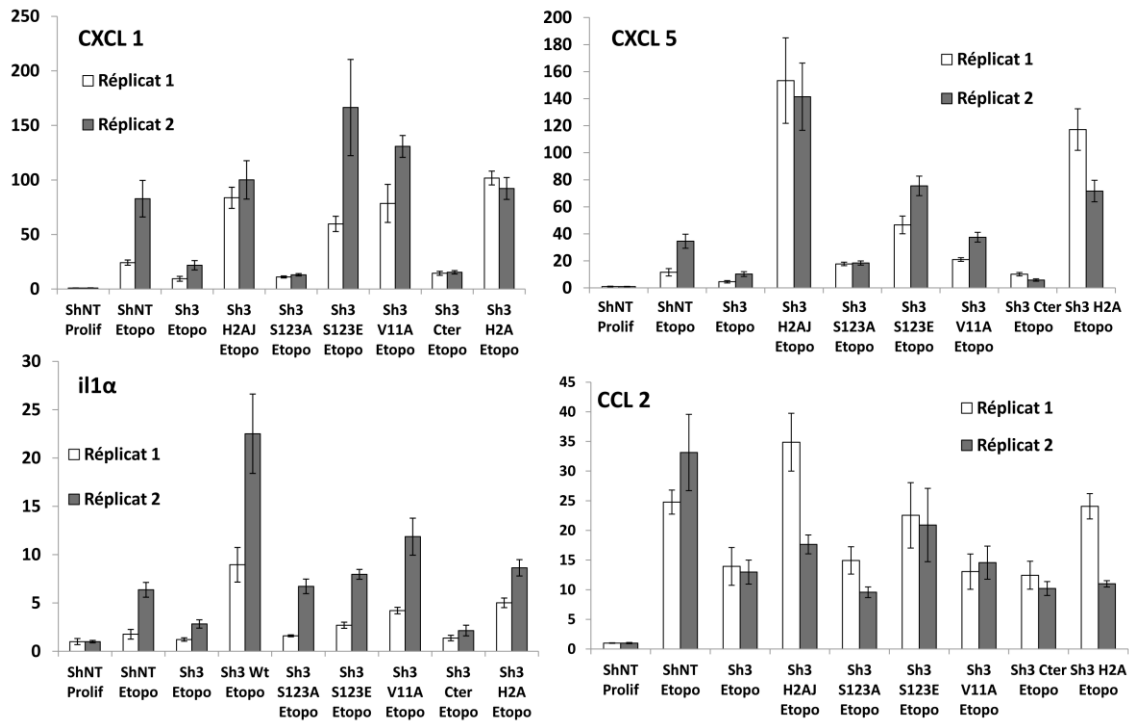


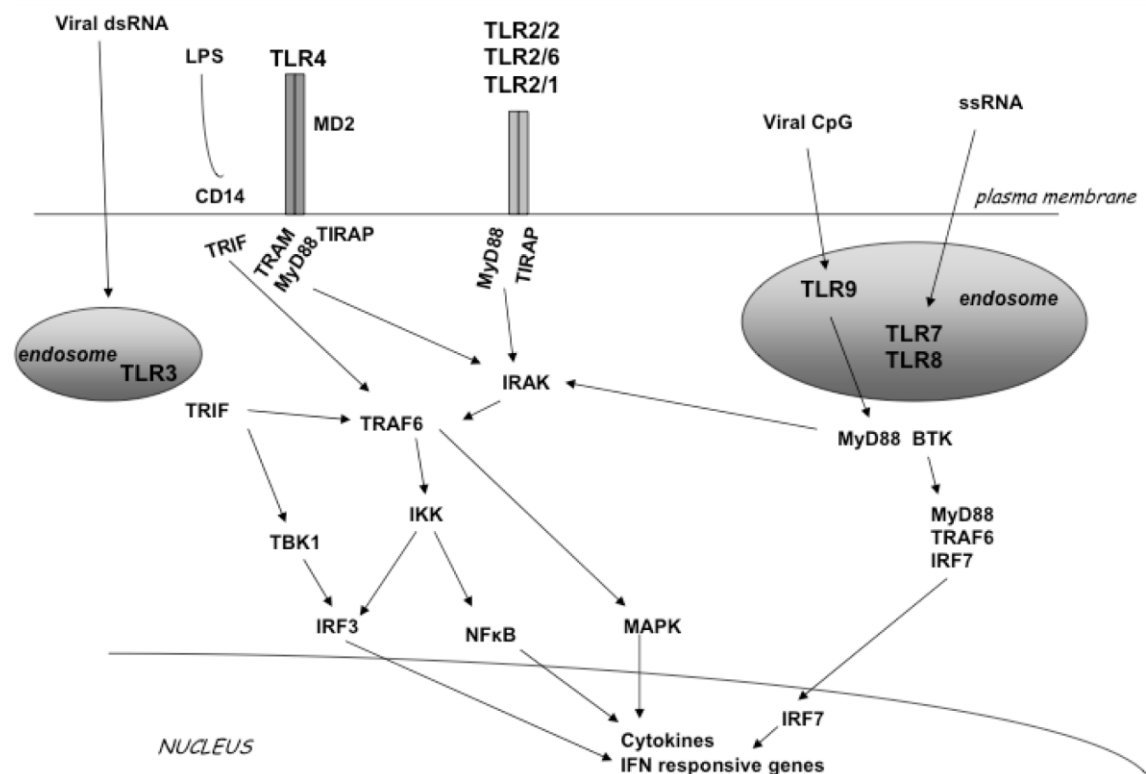
Figure 28. Quantités relatives d'ARNm obtenues par qPCR sur 4 gènes du SASP avec deux réplicats.

Ce motif SQ est d'ailleurs potentiellement phosphorylable. Ces résultats pourraient indiquer un rôle de la phosphorylation dans la réalisation de la fonction de H2AJ. La mutation de la valine en position 11 par une alanine ne semble pas impacter la capacité de H2AJ muté à compléter l'inactivation de H2AJ endogène. Alors que la modification complète de la région C-terminale ne permet plus la complémentation. Enfin, l'expression ectopique de la version canonique de H2A semble être en mesure de compléter l'expression de ces gènes à l'instar d'une version normale H2AJ. Ces résultats soulignent l'importance de la séquence C-terminale de H2AJ dans la réalisation de sa fonction. De plus, H2A semblerait être en mesure d'assurer le rôle de H2AJ.

Cependant, les résultats obtenus sur les trois gènes décrits dans la figure 2 ne sont pas forcément propres à tous les gènes du SASP, si l'on considère d'autres gènes tels que CCL2 (figure 28), on peut remarquer que la complémentation est beaucoup moins évidente et pourrait présenter un caractère hétérogène selon les gènes considérés.

## Effets de H2AJ sur les gènes d'inflammation dans le contexte de la réponse inflammatoire.

Contrairement à l'activation des cytokines et chemokines du SASP lors de la sénescence, la dépression de ces gènes dans la réponse inflammatoire possède une cinétique bien plus courte qui se compte en minutes ou en heures et non en jours. Une propriété essentielle de nos défenses immunitaires est la capacité de nos cellules à pouvoir reconnaître un corps étranger que ce soit par des protéines cytoplasmiques tel que RIG-1 (retinoic acid-inducible gene 1) capable de reconnaître de l'ADN ou de l'ARN viral (Pichlmair et al. 2006) ou par des récepteurs membranaires tel que les TLR (Toll-Like Receptors) qui sont également capables de reconnaître des motifs moléculaires associés à des pathogènes. Bien qu'impliquant des voies différentes, il est possible de retrouver des similitudes entre l'activation de gènes d'inflammation lors de l'induction de TLR et la mise en place de la sénescence. Cela tient notamment par la position centrale occupée par NFKB et MAPK dans ces voies de signalisation (**figure 29**).

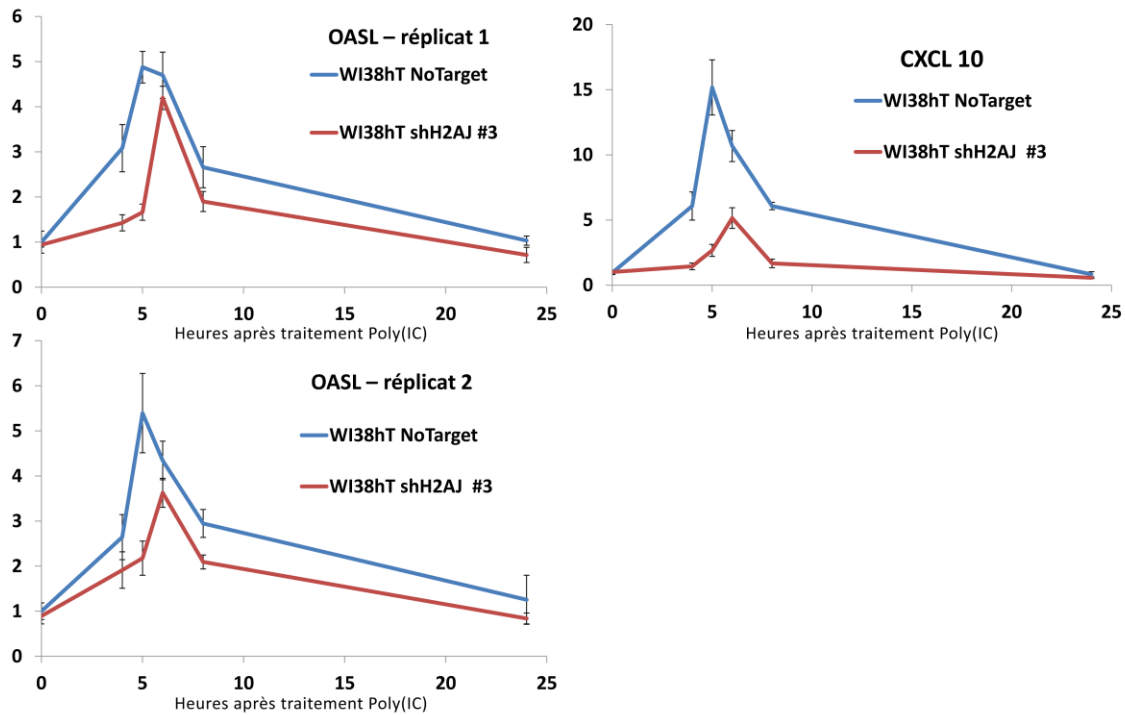


**Figure 29. Voie de transduction du signal TLR**

IRAK et TRAF6 activent NF-κB et induisent la sécrétion de cytokines. D'après (Xagorari & Chlichlia 2008)

Il est d'ailleurs possible d'activer la voie TLR en utilisant certains produits synthétiques tel que le polyinosinic :polycytidylic acid (Poly I:C), un ligand du TLR 3 qui induit une réponse type des gènes induits par les interférons (Fang et al. 2013). Cette réponse est très semblable à celle que l'on retrouve dans notre propre analyse transcriptomique lorsque nous réalisons une analyse d'enrichissement GSEA sur les gènes les plus

exprimés lors de la surexpression de H2AJ en prolifération. Nous avons donc souhaité vérifier l'impact de H2AJ lors de la réponse immunitaire. Pour cela, la voie de réponse du TLR3 fut activée par l'utilisation de Poly(I:C) sur des fibroblastes proliférants et il fut possible de mesurer l'augmentation du niveau d'ARNm de gènes d'inflammation sur une période de 24h. Lorsque l'on considère les gènes plus exprimés suite à l'utilisation de Poly(I:C) d'après la littérature (Fang et al. 2013), il est possible d'observer un effet de l'inactivation de H2A.J sur l'amplitude de la réponse inflammatoire (**figure 30**).



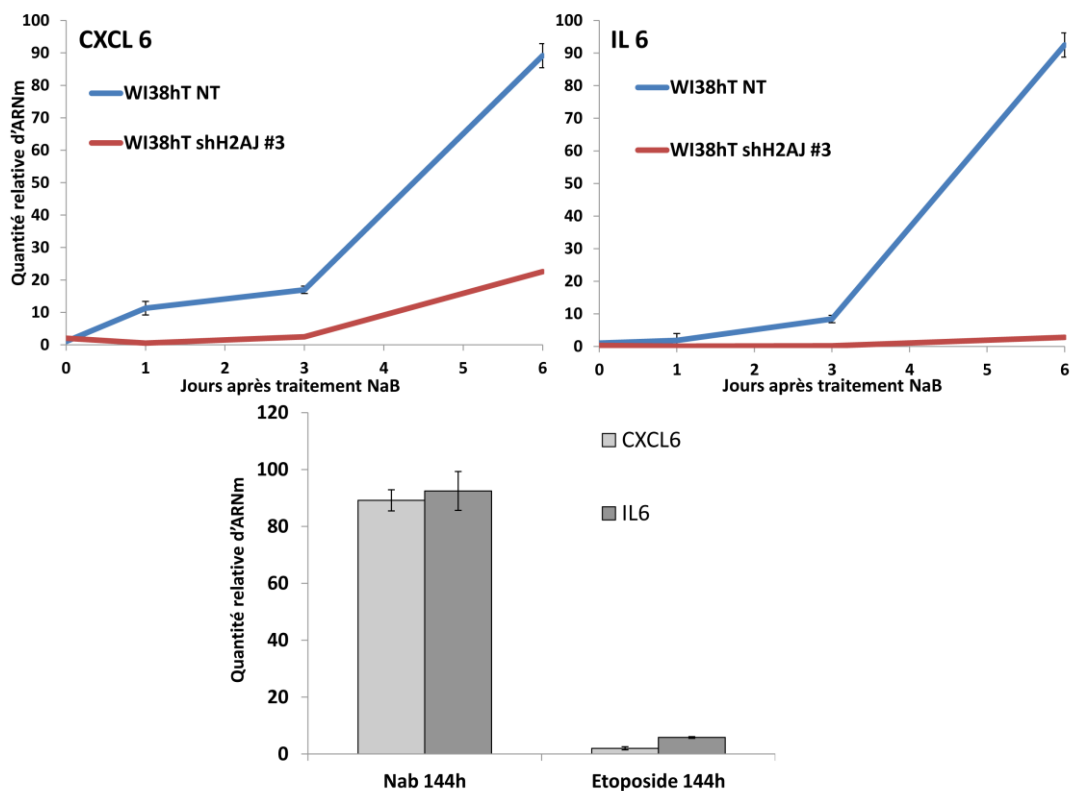
**Figure 30. Quantité relative d'ARNm après traitement Poly(IC) pour les gènes OASL et CXCL 10.**

La réponse classique est définie par une dépression des gènes très rapide avec un pic d'expression aux alentours de 6h après induction de la réponse inflammatoire. Dans le cas de l'utilisation d'un shRNA ciblant H2AJ, on peut observer que la dépression du gène CXCL 10 ou OASL se traduit par un niveau d'ARNm bien plus faible, et donc une amplitude de la réponse inflammatoire diminuée.

Ce résultat suggère que le rôle de H2AJ dans la dépression des gènes d'inflammation ne se limite pas au cas de la sénescence. Il faut toutefois considérer que ce rôle de H2AJ n'a été observé que dans le cas de CXCL 10 et OASL. Il est à noter que, pour d'autres gènes, à savoir CCL5, CXCL1, CXCL2, IL1A, IL6 ou encore IL1B, nous n'observons aucune dépression sur 24h. De surcroit, même le niveau de dépression des gènes CXCL 10 ou OASL est relativement faible pour nos lignées comparativement à ce qui est décrit dans la littérature (Fang et al. 2013). Cela pourrait provenir d'une différence entre nos lignées immortalisées et transfectées et les lignées primaires utilisées qui n'ont subi aucune modification.

## Effet de H2AJ dans un phénotype sénescé dépourvu de dommages à l'ADN mais induisant les voies des DDR.

Comme vu dans notre introduction, il existe de nombreux inducteurs de sénescence. L'irradiation ou certaines molécules thérapeutiques aux effets génotoxiques peuvent provoquer l'entrée en sénescence et l'apparition du phénotype sécrétoire (SASP) par l'altération de la structure chromatinienne et la présence de cassures sur l'ADN. Il a notamment été observé que l'usage d'inhibiteurs d'histone déacétylases (HDACi), composés utilisés lors des chimiothérapies, pouvait provoquer un phénotype sénescé et donc la production du SASP par l'induction d'un stress chromatinien mais sans présence de cassures sur l'ADN (Pospelova et al. 2009) démontrant le caractère non essentiel de ces blessures sur l'ADN pour l'entrée en sénescence. Le SASP induit par l'utilisation de HDACi apparaît très rapidement, en à peine quelques jours, comparativement à celui induit par des molécules génotoxiques qui nécessite plus d'une semaine. Cependant, dans les deux cas, il est possible d'observer une activation des voies de dommages à l'ADN avec le recrutement sur la chromatine de molécules senseurs comme le complexe MRN ou encore le complexe KAT5/TRRAP.

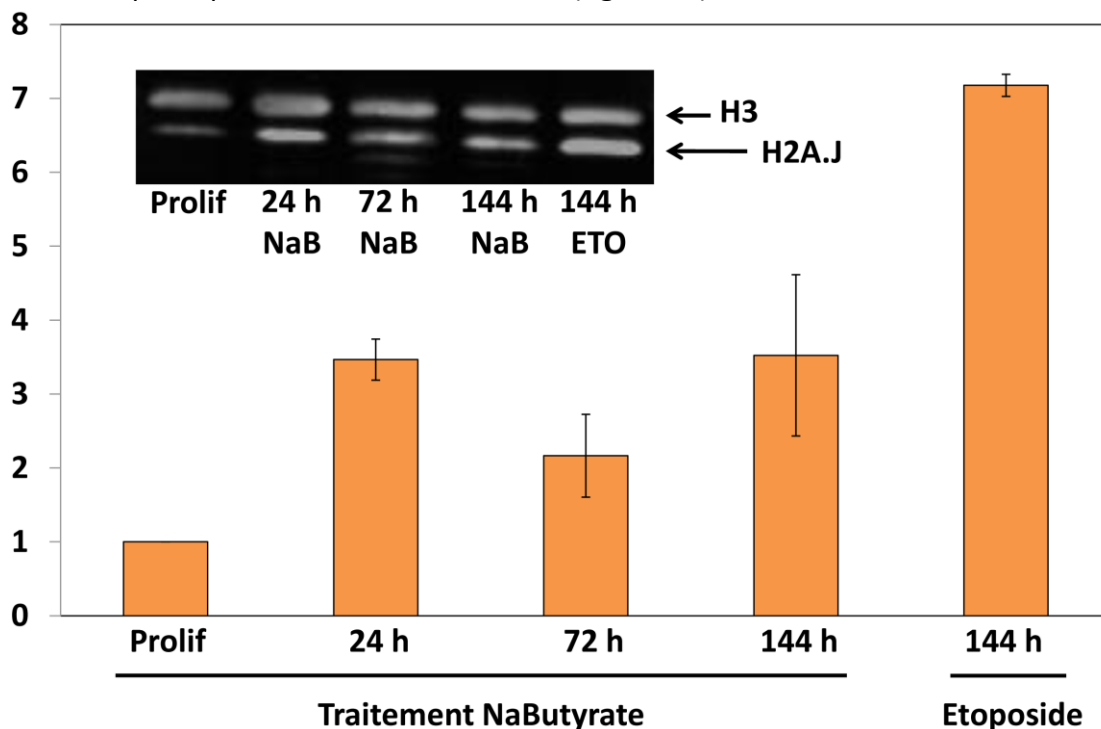


**Figure 31. Induction de l'expression de gènes d'inflammation par un traitement NaButyrate**  
Les figures du haut montrent l'effet du shH2AJ sur l'expression des gènes d'inflammation. La figure du bas met en évidence la différence dans la cinétique d'induction des gènes d'inflammation entre un traitement . NaButyrate et Etoposide.

En utilisant les lignées de fibroblastes NT et sh3, il est possible de mettre en évidence une augmentation de l'expression de ces gènes d'inflammation en à peine 3 à 4 jours. Après traitement avec un HDACi, ces gènes sont effectivement dérprimés bien plus rapidement que lorsque l'on utilise un agent génotoxique tel que l'étoposide. De plus, il est à noter que l'inactivation de H2AJ dans notre lignée sh3 réduit considérablement l'expression de ces gènes dans cette condition (**figure 31**).

Enfin, le niveau protéique de H2AJ dans les lignées NT augmente légèrement après traitement avec un HDACi (d'un facteur 2 à 3) mais stagne après 24h. Tandis qu'avec un traitement avec un agent génotoxique, l'accumulation d'H2AJ est plus importante et continue pendant au moins 10 jours.

Cela pourrait suggérer que la quantité de H2AJ n'a pas nécessairement besoin d'être très élevée pour que H2AJ assure sa fonction (**figure 32**).



**Figure 32. Quantification relative de H2AJ normalisée sur H3 à partir d'un Western Blot.**

Les voies de réponses aux dommages à l'ADN semblent donc primordiales dans l'accumulation de H2AJ. Un des acteurs centraux de cette voie est la protéine p38MAPK qui joue un rôle prépondérant dans l'induction du SASP (Acosta, O'Loghlen, Banito, Raguz, et al. 2008). Il est possible grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de bloquer la phosphorylation des cibles de p38MAPK et donc son action sur le SASP (Freund et al. 2011a). En utilisant un inhibiteur de ce type, il m'a été possible de mesurer l'accumulation de H2AJ sur une période de 10 jours.

Les résultats semblent montrer que bloquer la capacité de p38MAPK à phosphoryler n'impacte pas l'accumulation de H2AJ (**figure 33**). Ce résultat nécessite d'être



reproduit dans le cadre d'une expérience validant la bonne inhibition de l'activité kinase de p38MAPK par le composé SB203580 en vérifiant par exemple l'induction de gènes du SASP ou la phosphorylation de cible tel que HSP70 (Heat Shock Protein 70). Les expériences sont en cours et devraient être terminées sous peu. Si ce résultat est cependant confirmé, il nous indiquerait que l'accumulation de H2AJ est potentiellement indépendante d'effecteurs situés en aval de p38MAPK dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN.

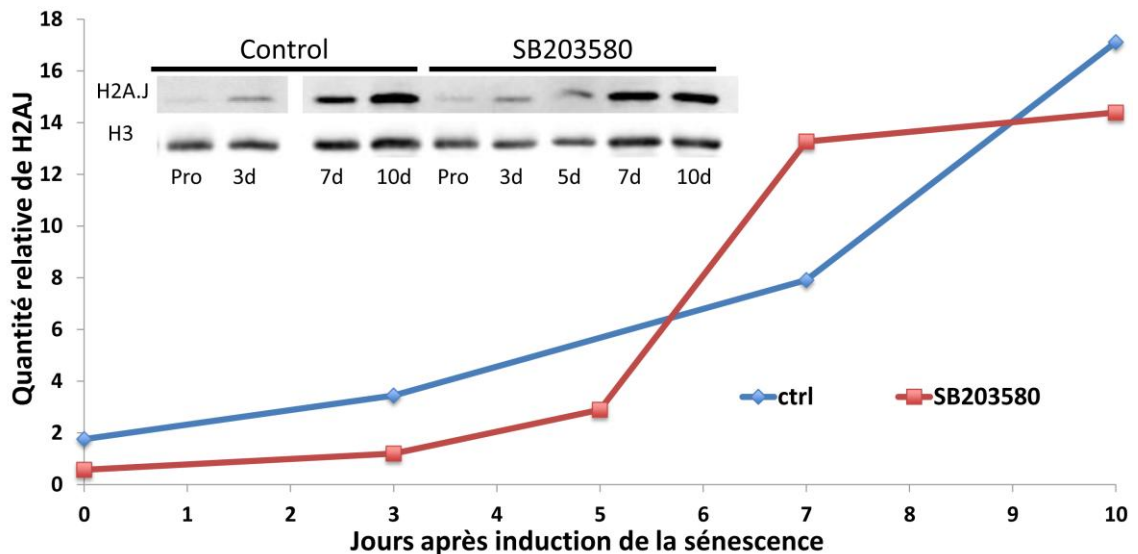
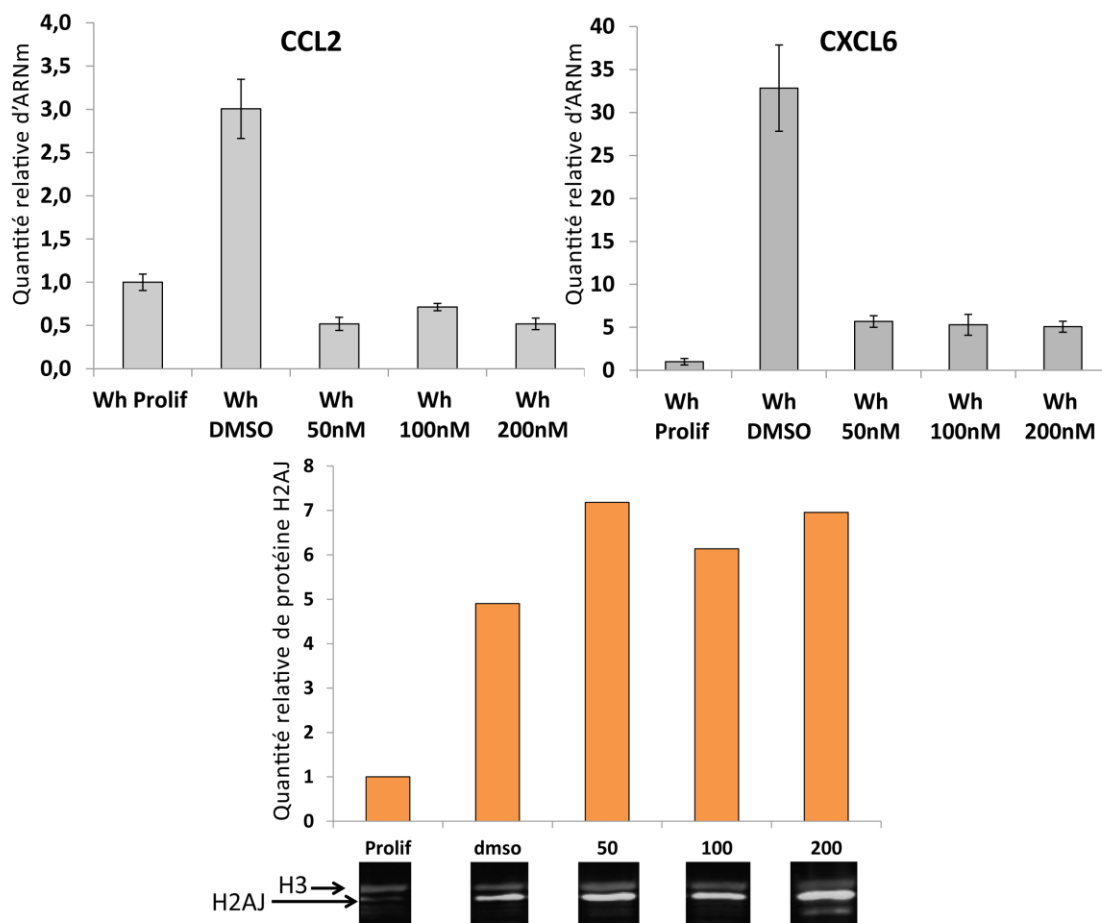


Figure 33. Accumulation de H2AJ avec ou sans traitement SB203580 dans des WI38hT NoTarget.

## Exploration de voies impliquées dans la dérégulation du SASP

De nombreuses études ont mis en évidence la régulation du SASP par un certain nombre de facteurs incluant notamment NF $\kappa$ B et la MAPK p38. (Freund et al. 2011b). De plus, mTORC1 (mammalian target of Rapamycin) participe à la production du SASP (Bartolome & Guillén 2014) notamment à la production de l'interleukine IL6 (Salama et al. 2014). Plusieurs publications ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur de mTOR : la rapamycine est en mesure de bloquer sélectivement la production de molécules du SASP sans affecter l'arrêt du cycle cellulaire (Laberge et al. 2015; Herranz et al. 2015). Cette régulation semble majoritairement jouer un rôle au niveau des ARNm. En effet, une des cibles de mTORC1, MAPKAPK2, également connu pour être un effecteur de p38MAPK, est nécessaire à la phosphorylation de la protéine ZFP36L1. Cette protéine, dans sa forme non-phosphorylée, peut se lier aux ARNm codant pour des cytokines et les déstabilise. L'activité de mTOR résulte donc en une plus grande stabilité des ARNm de cytokines. De plus, le SASP est également régulé par de complexes boucles de

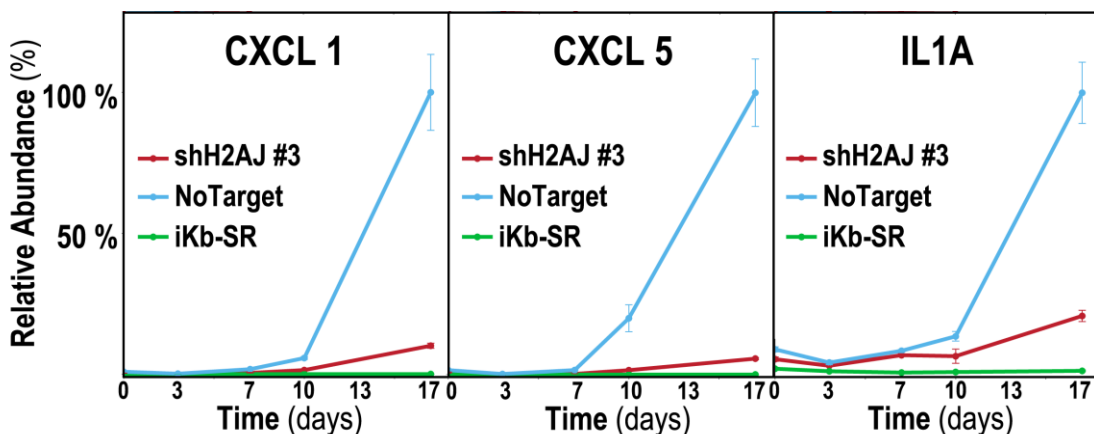
rétroaction positive. C'est ainsi que IL1 $\alpha$  a été identifié comme un régulateur pro-inflammatoire du SASP agissant par NF $\kappa$ B (Orjalo et al. 2009). Or, l'utilisation de rapamycine semble atténuer l'impact d'IL1 $\alpha$  en diminuant sa traduction. mTOR faciliterait donc la traduction d'IL1 $\alpha$  et, par conséquent, l'activation de NF $\kappa$ B. (Tomimatsu & Narita 2015). Cependant, les mécanismes d'action de mTOR ne sont pas entièrement élucidés, notamment lorsque l'on prend en compte l'ubiquité de cette protéine dans diverses voies de signalisation. J'ai donc voulu vérifier l'impact sur l'accumulation de H2AJ d'un traitement rapamycine. Dans un premier temps, l'impact de la rapamycine fut testé en mesurant l'expression relative de certains gènes avec différentes concentrations de rapamycine, puis, ces mêmes échantillons furent testés en Western Blot pour mesurer la quantité de protéines H2AJ présentes. Bien que la rapamycine ait un effet répressif important sur l'expression de certains gènes (notamment CCL2, CXCL6 et CXCL1), aucune concentration de rapamycine ne semble avoir un effet sur l'accumulation de H2AJ. Les effecteurs en aval de MTORC1 ne semblent donc pas primordiaux pour l'accumulation de H2AJ (**figure 34**).



**Figure 34. Effets de la rapamycine sur l'expression de gènes d'inflammation (en haut) et sur l'accumulation d'H2AJ (en bas)**

Trois traitements de rapamycine ont été effectués (50, 100, 200 nM) pendant 10 jours de sénescence. La rapamycine est maintenue dans le milieu pendant la durée de la culture. Une culture contrôle a été effectuée avec le solvant de la rapamycine, le DMSO.

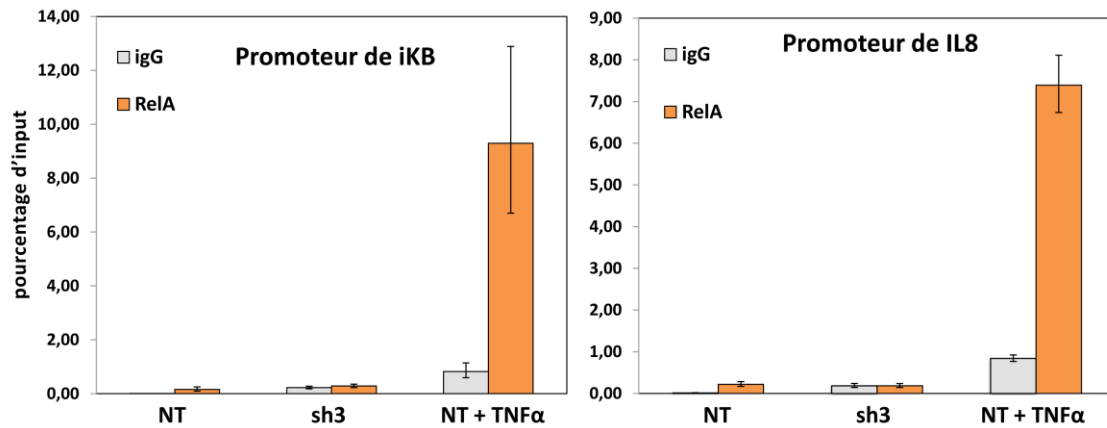
Mentionné de nombreuses fois dans ce manuscrit comme ayant un rôle central dans l'activation du SASP, il aurait été étrange d'ignorer un lien potentiel entre H2AJ et NFKB, reconnu comme un facteur de transcription majeur dans le contrôle de l'expression du SASP (Salminen & Kaarniranta 2011). A partir d'un modèle de fibroblastes sénescents induits par H-RAS<sup>V12</sup>, l'équipe du Docteur Lowe a mis en évidence que la sous-unité p65 du complexe NFKB était enrichi dans la chromatine de fibroblastes sénescents environ une semaine après leur induction. Ils ont également pu observer que p65 était phosphorylé sur la Sérine 536, une modification activatrice qui corrèle avec une expression et une sécrétion accrue de molécules inflammatoires (Chien et al. 2011). En effet, l'activation de NFKB se traduit par la translocation du complexe p50/p65 (une des formes de NFKB) dans le noyau des cellules, ce facteur de transcription peut alors se fixer au niveau des promoteurs de cytokines inflammatoires et activer leur expression. (Hayden & Ghosh 2012). Nous possédons une lignée cellulaire *ikB-SR* (*ikB* -Super Represseur) qui empêche la désolidarisation du complexe *ikB*-NFKB dans le cytoplasme et empêche donc son transfert dans le noyau et sa déposition sur la chromatine. Cette lignée empêche toute expression de gènes d'inflammation au contraire de l'inactivation du gène H2AFJ. (**figure 35**)



**Figure 35. Quantité relative d'ARNm pour trois gènes d'inflammation sur les lignées de fibroblastes NT, sh3 et iKb-SR.**

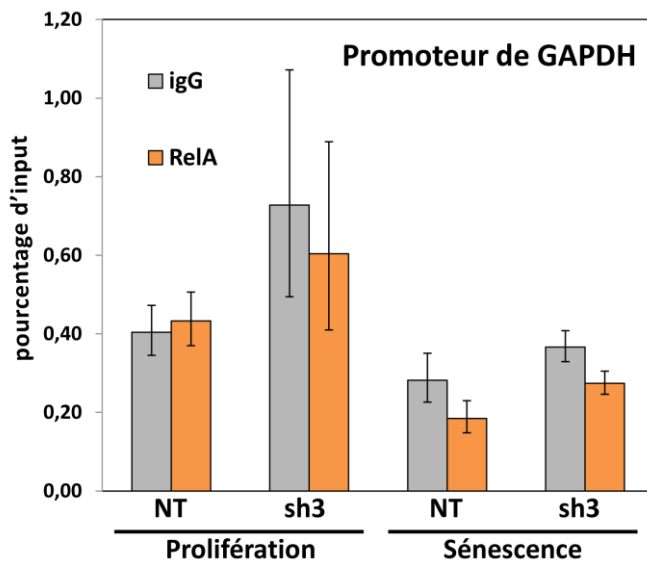
Il a été possible de vérifier si l'inactivation de H2AFJ pouvait impacter le recrutement de p65 au niveau du promoteur de ces gènes.

Dans un premier temps, afin de contrôler la qualité de notre anticorps anti-p65, nous avons testé le recrutement de cette protéine au niveau du promoteur d'IL8 et iKb. Des sites connus de déposition de cette protéine suite à un traitement TNF $\alpha$ . (Chen et al. 1998) Pour cela, nous avons réalisé une immunoprécipitation de chromatine (chIP) anti-RelA sur trois lignées proliférantes (NT, sh3 et NT ayant subi un traitement TNF $\alpha$ ). Seule la lignée où une réponse immunitaire fut déclenchée présente une amplification correcte des séquences promotrices de ces gènes après immunoprécipitation de RelA (**figure 36**).



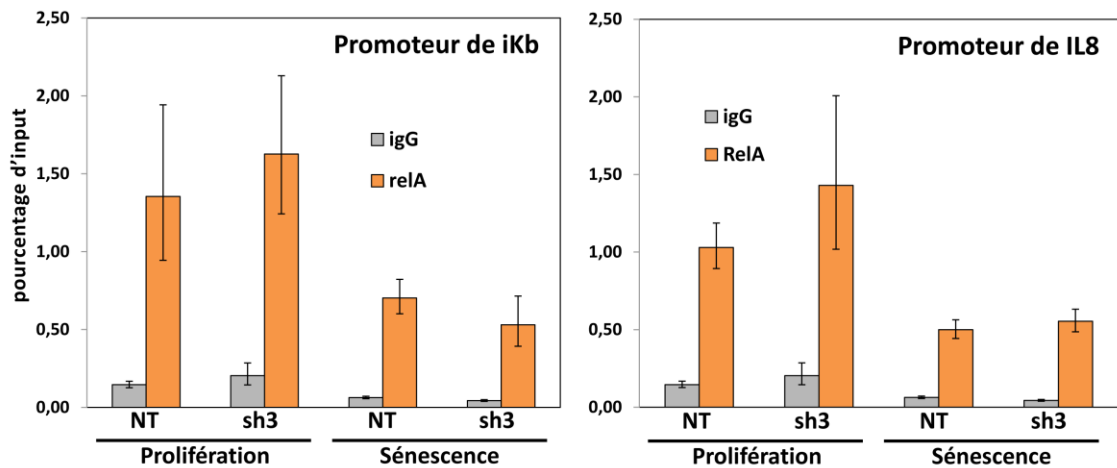
**Figure 36.** Immunoprécipitation de RelA à partir de fibroblastes en prolifération avec ou sans traitement TNFα.

Par la suite, nous avons réalisé cette immunoprécipitation sur nos lignées NoTarget et shH2AJ #3 en prolifération et en sénescence au loci des promoteurs de plusieurs gènes. L'expérience fut contrôlée par une immunoprécipitation utilisant des igG permettant d'estimer la précipitation non spécifique de la chromatine. De plus, nous avons contrôlé l'immunoprécipitation d'un locus où p53 n'est pas censé être présent (le promoteur de GAPDH) (**figure 37**).



**Figure 37.** immunoprécipitation de RelA à partir de fibroblastes en prolifération et sénescence. (contrôle négatif)

Dans un premier temps, il est possible de remarquer une très faible amplification dont la valeur est égale entre l'immunoprécipitation de RelA et celle des IgG sur le locus du promoteur de GAPDH confirmant une absence de la protéine RelA à ce locus.



**Figure 38.** Immunoprécipitation de RelA à partir de fibroblastes en prolifération et sénescence.

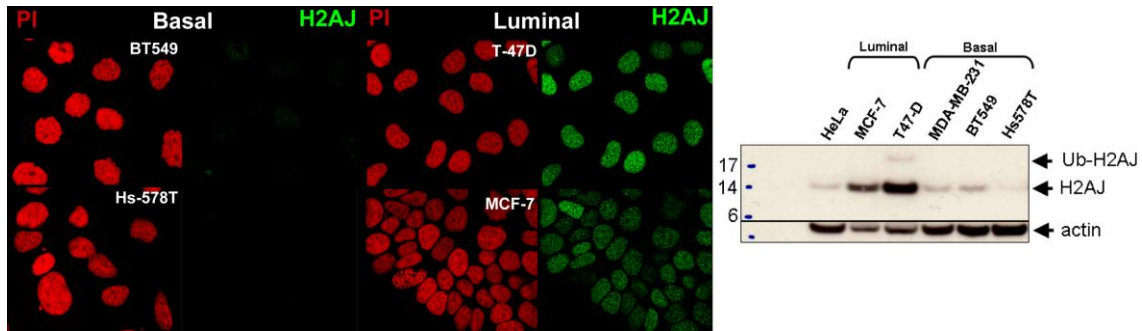
Dans un deuxième temps, lorsque l'on considère les promoteurs des gènes IL6, IL8 et iKb, plusieurs choses sont à préciser. D'une manière générale, on remarque que RelA semble bien spécifique à ces loci au vu de la différence entre le signal obtenu par l'immunoprécipitation de RelA et l'utilisation d'IgG. En comparant les conditions NT et sh3 que ce soit en prolifération ou en sénescence, il est impossible de distinguer une différence d'amplification de signal (**figure 38**).

Cela suggère que la déplétion de H2AJ n'impacte pas le recrutement de NFκB à ces loci. Cependant, il est à noter, en prolifération, une forte amplification du signal avec l'anticorps RelA. Or, cela n'est pas en accord avec la bibliographie (Freund et al. 2011b).

NFκB a donc bel et bien un rôle important pour l'expression du SASP dans notre modèle cellulaire. Malgré tout, aucune différence n'est à noter entre les conditions NT et sh3. Cela semblerait indiquer que H2AJ n'impacte pas la déposition de RelA.

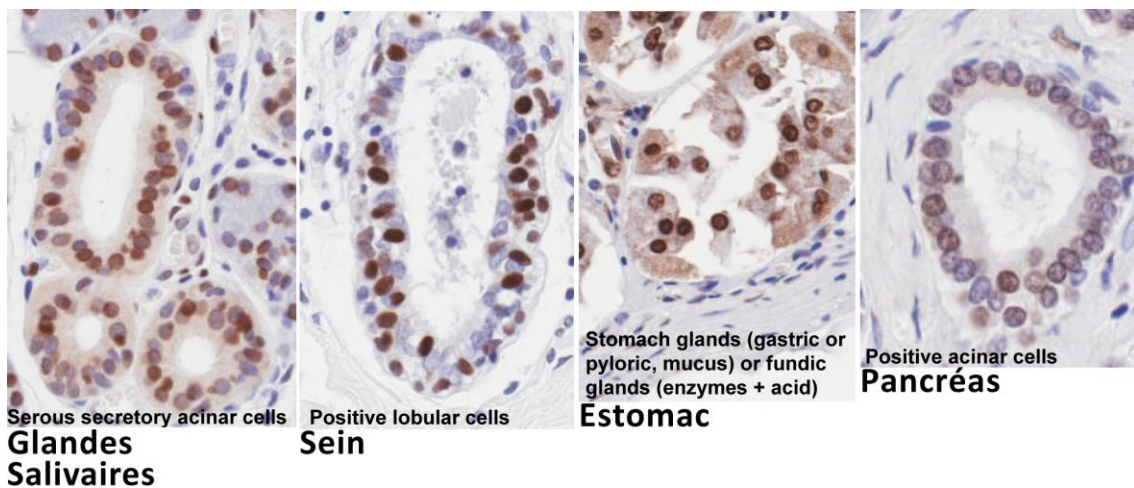
## H2AJ dans les lignées cancéreuses

En collaboration avec le docteur Christophe Redon (NCI/NIH), des analyses furent réalisées sur plusieurs lignées cancéreuses afin de tester la surreprésentation de H2AJ dans ces cellules. Les résultats obtenus (**figure 39**) montrent une présence importante de H2AJ dans les lignées cancéreuses d'origine luminale. (T47D, MCF7, BT474) et une quasi-absence de signal dans des lignées cancéreuses d'origine basale (BT549, Hs-578T) (**figure 39**).



**Figure 39. Immunofluorescence anti-H2AJ sur lignées cancéreuses basales et lumineales et Western blot anti-H2AJ sur ces mêmes lignées**

De plus, des expériences d'immunohistochimies anti-H2AJ furent réalisées par le docteur Christophe Redon sur de nombreux tissus et organes chez la souris et l'homme. De ces expériences, en est ressortie une abondance relative de H2AJ dans les cellules lumineales plutôt que basales, et souvent dans des cellules impliquées dans la sécrétion telle que les cellules glandulaires (**figure 40**).



**Figure 40. Immunohistochimies de plusieurs tissus humains adultes**  
*H2AJ semble s'accumuler dans des cellules dont la fonction est liée à la sécrétion.*

Il se pourrait donc que la présence de H2AJ dans certains cancers ne soit pas due au phénotype tumoral mais à une expression du gène déjà présente avant la tumorigénèse.

# DISCUSSION

---

## H2AJ est nécessaire à la dépression effective des gènes d'inflammation

*In vivo*, le phénotype sécrétoire de la sénescence nommé SASP est impliqué dans la communication entre les cellules sénescentes et le système immunitaire (Xue et al. 2007; van Deursen 2014). Bien que permettant la clairance des cellules sénescentes, cette inflammation peut devenir chronique si les cellules sénescentes se maintiennent, sans être éliminées, au sein d'un tissu. Cela peut aboutir au développement de diverses pathologies. Les gènes codant pour le SASP sont réprimés lors de la prolifération en l'absence de stress mais voient leur expression augmenter progressivement au cours de la sénescence, nécessitant plus d'une semaine pour obtenir une expression maximale dans les fibroblastes (Rodier et al. 2009). La régulation de l'expression de ces gènes fait intervenir de nombreuses voies de régulation (figure 6) avec l'activation de molécules tels que p38MAPK ou encore NF $\kappa$ B (Freund et al. 2011b). A l'instar de ces deux protéines, l'inactivation du gène codant pour H2AJ retarde et inhibe l'expression de gènes du SASP, ce qui se traduit par une baisse de la quantité d'ARN produits à partir de ces gènes et une réduction de la concentration en protéines inflammatoires dans le surnageant des cellules en culture. La surexpression de H2AJ en prolifération permet également l'expression de gènes d'inflammation dont le profil est semblable à celui d'une induction par l'interféron gamma, l'interféron alpha ou l'activation de NF $\kappa$ B par TNF $\alpha$ .

Ainsi, H2AJ faciliterait la dépression d'un certain nombre de gènes d'inflammation, ce qui se traduit lors de la sénescence où H2AJ s'accumule par un rôle dans l'expression des gènes du SASP.

Les expériences de cinétique réalisées ont montré que malgré l'expression de shARN ciblant H2AFJ, la dépression de ces gènes d'inflammation n'est pas totalement bloquée mais est retardée par l'absence d'accumulation de H2AJ, ce qui pourrait s'expliquer par une quantité latente de H2AJ qui parvient tout de même à s'accumuler, notre modèle ne bloquant pas à 100% l'accumulation de H2AJ. Cette hypothèse expliquerait notamment les différences obtenues entre nos deux shRNA #2 et #3 où le sh3 réduit plus efficacement l'accumulation de H2AJ, ce qui se traduit par une inhibition plus forte de l'expression des gènes du SASP. Une autre possibilité serait que la présence de H2AJ n'est pas une condition *sine qua none* à l'expression de gènes d'inflammation mais en faciliterait l'expression. Il serait possible de vérifier cette hypothèse en travaillant avec un modèle supprimant totalement l'expression de H2AJ en utilisant par exemple la technologie crispR-Cas9 (Cho et al. 2013).



De plus, quelques expériences complémentaires mimant une infection virale par l'utilisation de Poly(I :C) semblent suggérer que les lignées où H2AJ est inactivé présentent une réponse inflammatoire moins intense. Ce qui supposerait un rôle de H2AJ ne se limitant pas à la dépression du SASP lors la sénescence. Ces résultats restent à confirmer avec des réplicats supplémentaires et il serait intéressant de tester d'autres voies d'induction de gènes d'inflammation (autre que l'activation du TLR3), plus adaptées à nos lignées. Il serait envisageable de vérifier l'expression de gènes d'inflammation suite à l'activation de la voie  $TNF\alpha$ , de la voie des interférons ou encore de tester ces inductions en absence de H2AJ dans des modèles cellulaires connues pour exprimer plus fortement ces voie de signalisation (lymphocytes pour l'interféron  $\gamma$  par exemple).

## Réflexions sur les mécanismes d'action et d'accumulation de H2AJ

Sachant que H2AJ possède un rôle à jouer dans la régulation de l'expression génique, on pourrait s'attendre à retrouver la protéine spécifiquement localisée sur le génome à des sites de régulation (promoteurs, isolateurs, enhancers, sites de fixations de la RNA pol II, etc.) comme c'est le cas pour le variant H2A.Z qui est enrichi aux TSS des gènes activés (Jin et al. 2009). Afin de vérifier la localisation de H2AJ sur le génome et sa potentielle présence au niveau des gènes sur lesquels cette protéine semble agir, plusieurs expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) furent réalisées. Les résultats nous montrent un enrichissement de H2AJ entre l'état proliférant et l'état sénescence. Cependant, cette augmentation de déposition de l'histone sur la chromatine semble être uniforme quel que soit les loci considérés (excepté aux TSS). Cela suggère que l'augmentation de la déposition de H2AJ sur la chromatine a lieu de manière homogène le long de la fibre de chromatine mais que l'expression génique n'est affectée qu'à un nombre limité de sites. Ce résultat fut confirmé par ChIP-Seq tout en fournissant plusieurs contrôles sur l'expérience (déplétion de H2AJ au TSS, mesures de cross-correlation) en elle-même et écartant la possibilité que l'absence de signal spécifique à H2AJ soit due à un problème technique lors de la précipitation de la protéine. La spécificité d'action de H2AJ ne peut donc s'expliquer par une déposition différentielle aux loci des gènes qu'il régule. Ainsi, d'autres facteurs, agissant avec H2AJ, sont potentiellement impliqués dans la dépression de gènes d'inflammation. Il est possible que H2AJ interagisse spécifiquement avec des protéines partenaires, comparativement aux autres H2A, grâce aux particularités de séquences de H2AJ. Il est également possible que la séquence de H2AJ affecte la compaction de la chromatine et ainsi son accessibilité pour certains facteurs de transcription (Gomes & Wang 2016). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la déposition du facteur de transcription RelA (ou p65), une sous-unité du complexe NF $\kappa$ B, dans le contexte de

l'inactivation du gène H2AFJ. Ce facteur joue un rôle prépondérant dans l'expression du SASP et, plus généralement, de centaines de gènes liés à la réponse immunitaire (Hayden & Ghosh 2012). Cependant, nos données sur des sites connus de fixation de RelA ne semblent pas indiquer que l'absence de H2AJ empêcherait ce facteur de transcription de se déposer sur la chromatine lors de la sénescence. Cette information devra être confirmée. Nos données, en sénescence, présentent de faibles valeurs de pourcentages d'input. Ce qui pourrait s'expliquer par une faible qualité de précipitation. Or, d'un point de vue technique, il peut être difficile de précipiter p65. Certaines publications recommandent d'ailleurs un double crosslink lors de la précipitation de p65 (Nowak et al. 2005).

Cependant, si nos données préliminaires sont confirmées, cela indiquerait que le mécanisme de H2AJ ne joue pas sur la déposition de p65 sur la chromatine. Il est cependant envisageable que H2AJ soit nécessaire à l'activation de p65, indépendamment de sa déposition. Par exemple, il est connu que, pour être actif, p65 doit être sous forme hypoacétylée grâce à l'activité de HDAC3. Ainsi, la perte de cette histone deacetylase réduit considérablement l'expression de gènes d'inflammation. (Ziesché et al. 2013). De plus, il a été montré que des modifications telles que la méthylation de H3K4 peut faciliter l'acétylation d'histones proches en recrutant l'acétylase MOF (Wysocka et al. 2005; Dou et al. 2005). Nous pourrions donc envisager que le mécanisme de H2AJ ne joue pas sur l'accessibilité de la chromatine mais sur le recrutement de HDAC3, ou d'un autre partenaire, nécessaire à p65 pour déréguler les gènes d'inflammation.

Les expériences de complémentation par des versions mutées de H2AJ nous apportent diverses informations sur les particularités de séquence de H2AJ. Les mutants S123A et S123E semblent indiquer que ce motif SQ situé dans la partie C-terminale de l'histone est important pour que H2AJ assure sa fonction sur l'expression des gènes d'inflammation. H2AJ est un des rares variants de H2A possédant un motif de phosphorylation SQ en position 123. Ce site pourrait être potentiellement phosphorylé par les kinases ATM, ATR ou DNA-PK des voies de réponses aux dommages à l'ADN. Une collaboration avec le docteur François Fenaille nous a d'ailleurs permis de mettre en évidence que cette phosphorylation est possible sur la sérine S123 en mesurant par spectrométrie la quantité de H2AJ phosphorylée dans des reins de souris irradiées à 50 Gy contre des reins de souris non irradiées. Le signal obtenu est relativement faible (correspondant à environ 1% de la quantité totale de H2AJ) mais reste sans équivoque (voir annexe 4). Bloquer cette phosphorylation potentielle en remplaçant la sérine 123 par une alanine ne permet plus la dérégulation de certains gènes d'inflammation tandis que tenter de mimer cette phosphorylation par l'ajout d'un acide glutamique n'impacte pas l'expression de ces gènes. Ces données ne permettent pas de conclure avec certitude que la phosphorylation de H2AJ est une condition nécessaire à sa fonction mais soulignent l'importance de cette particularité de séquence de la queue

C-terminale de H2AJ. De plus, la version mutée C-ter renforce l'idée que cette région est primordiale pour la complémentation de H2AJ.

Le mutant exprimant ectopiquement H2A indique que l'histone canonique est en mesure de compléter H2AJ tandis que la version mutée possédant le C-ter de H2A n'est pas en mesure de compléter H2AJ. Cela semble indiquer que le C-ter de H2AJ agit en combinaison avec la Valine présente en position 11 pour permettre la dépression des gènes d'inflammation et que le C-ter de H2A en est incapable. *A contrario*, la mutation de la valine en alanine n'impacte pas le potentiel de complémentation. Enfin, il est intéressant de remarquer que H2A, au même titre que H2AJ permet de déréguler les gènes d'inflammation. Cela soulève une importante question concernant l'intérêt de l'existence de H2AJ. En effet, pourquoi existerait-il un variant assurant une fonction que pourrait assurer une histone canonique ? Dans le cadre de la sénescence, cela pourrait s'expliquer par la déplétion globale des histones observables lors de la sénescence. En effet, suite à des dommages à l'ADN dans des fibroblastes humains, a été observée une chute de la quantité globale d'histones (O'Sullivan et al. 2010). Des données récentes chez la levure démontrent que les interactions physiques entre les protéines de recombinaisons rad52 et rad51 avec les histones moduleraient leur accessibilité aux sites de cassures double-brins. Cela suggère que des processus de réparation de l'ADN par recombinaison homologue pourraient être régulés par le niveau globale d'histone (Liang et al. 2012). Ainsi, une régulation semblable pourrait jouer un rôle dans la mise en place de la sénescence. Le raccourcissement des télomères provoque la perte de la structure circulaire et la libération des facteurs protéiques dont RAP1 (repressor activator protein 1) qui se relocalise aux promoteurs de gènes nécessaires à la sénescence. Parmi ces gènes, Rap1 se retrouve aux loci de gènes d'histones qu'il réprime. Cela facilite l'entrée en sénescence en réduisant la densité de nucléosomes aux promoteurs cibles de RAP1, contrôlant ainsi le programme transcriptionnel de la sénescence (Platt et al. 2013). Cette perte globale d'histones a été observée dans des cas de sénescence répllicative (O'Sullivan et al. 2010) et induite par des oncogènes chez les mammifères (Ivanov et al. 2013). Or, l'activation des voies de dommages à l'ADN provoque l'accumulation du variant H2AJ qui permettrait donc de pallier à ce manque d'histone H2A pour l'induction de gènes d'inflammation.

Les données obtenues sur l'absence d'effet de la rapamycine sur l'accumulation de H2AJ permettent d'écarter un lien entre cette voie et l'accumulation de H2AJ réduisant la quantité des facteurs potentiels influençant l'accumulation de H2AJ. Il est également intéressant de remarquer les similitudes entre l'inactivation de H2AFJ et l'utilisation de la rapamycine pour bloquer l'activité de mTORC1. En effet, elles ont toutes deux pour effet de limiter la production du SASP en sénescence sans présenter d'effet de réversion sur l'arrêt prolifératif. Il serait intéressant de pouvoir confirmer que mTOR et H2AJ assurent leurs fonctions indépendamment l'un de l'autre. Pour cela, il serait possible de tester si la rapamycine permet de réduire d'une amplitude encore plus

grande l'expression du SASP dans nos lignées shH2AJ. S'il s'avère que c'est effectivement le cas, il serait possible d'envisager H2AJ comme une cible thérapeutique potentielle en synergie avec un traitement rapamycine afin de pallier aux effets délétères du SASP sans risquer de compromettre le mécanisme de défense contre les cancers que représente l'entrée en sénescence. En effet, la rapamycine et les inhibiteurs de mTOR sont couramment utilisés comme immunosuppresseurs en limitant le développement des cellules T (Huang et al. 2003) ou étudiés comme molécules anti-tumorales (Ciuffreda et al. 2010). Mais dans l'optique de cibler uniquement les cellules sénescents et leur capacité à produire des molécules inflammatoires, la rapamycine ne doit pouvoir impacter que mTORC1 et non mTORC2 qui est impliqué dans la voie Akt/PKB, un régulateur de la survie cellulaire, ce qui n'est possible qu'à de faibles doses (Sarbasov et al. 2006). Une stratégie possible serait donc une utilisation combinée de la rapamycine à faible concentration et d'un blocage de l'accumulation de H2AJ pour réduire l'inflammation chronique du SASP sans affecter la survie des cellules et leur capacité à entrer en sénescence.

Grâce aux expériences menées sur des cellules sénescents induites par des inhibiteurs de HDACs, il a pu être montré que la quantité de H2AJ n'avait pas besoin d'atteindre un niveau élevé pour permettre d'observer ses effets. Ainsi, dans un cas où la cinétique de dérégulation des gènes d'inflammation est bien plus courte que pour la sénescence induite par dommages à l'ADN, l'inactivation de H2AJ provoque une réduction importante de l'expression des gènes d'inflammation. Il se pourrait donc que, bien que s'accumulant spécifiquement dans des cas de sénescence avec dommages à l'ADN, H2AJ conserve la même fonction pour l'activation du SASP même quand cette dernière possède une cinétique différente (induction en quelques jours à peine) et semble donc faire intervenir d'autres voies d'activation. Ces informations indiquent qu'il pourrait être intéressant de vérifier le rôle que pourrait jouer H2AJ dans d'autres modèles d'induction de sénescence même si cette protéine ne semble pas s'accumuler spécifiquement. En effet, l'équipe du Dr Blagosklonny a montré que des lignées humaines HT1080 induites en sénescence par la surexpression de p21 ou de p16 (les inhibiteurs de cyclines respectivement en aval des voies DDR et des voies RAS/RAF/MEK-ERK) ne présentent pas de dommages à l'ADN et au vu de la nature de l'induction de sénescence ne devrait pas induire les voies de réponse aux dommages à l'ADN. Mais à l'instar de la sénescence induite par NaButyrate, cette induction p21- ou p16-dépendant présentent une activation de ces voies postérieurement à l'arrêt prolifératif et à l'entrée en sénescence (Pospelova et al. 2009). Il est alors possible d'envisager un rôle pour H2AJ dans l'induction du SASP qui ne se limiterait pas aux cas de sénescence induits par des dommages persistants à l'ADN.

## **H2AJ, un potentiel marqueur de stress lié au vieillissement**

L'accumulation spécifique de H2AJ dans des fibroblastes sénescents induits par dommages à l'ADN confère à cette protéine un potentiel de biomarqueur pour cet état physiologique. L'intérêt d'identifier pour la sénescence est renforcé par l'idée qu'il n'existe que peu de marqueurs réellement spécifiques de la sénescence et que l'identification de cellules sénescents nécessite, à l'heure actuelle, l'utilisation conjointe de plusieurs marqueurs.

Les analyses réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr Rübe ont montré que, sur un modèle murin, H2AJ s'accumule avec l'âge dans les cellules souches de follicules pileux et les cellules épithéliales interfolliculaires entre un âge précoce (2 mois) et un âge avancé (2 ans). Le signal H2AJ augmente également dans ces cellules après une série d'irradiation de faible intensité. H2AJ pourrait donc être un marqueur de la sénescence de ces cellules souches et épithéliales.

Des analyses en spectrométrie de masses sur des organes murins ont également montré que H2AJ s'accumulait avec l'âge dans plusieurs organes notamment dans le foie et le rein, mais pas dans des organes comme le cerveau. L'accumulation très précoce de H2AJ dans certains organes pourrait être indépendante de la sénescence et être due à des mécanismes spécifiques à certains tissus. De nombreuses analyses en immunohistochimie réalisées par le docteur Christophe Redon sur des coupes de tissus humains ont également permis de montrer une présence hétérogène de H2AJ dans l'organisme avec une localisation plus importante de la protéine dans les cellules dont la fonction est liée à la sécrétion et dont la localisation est proche d'une lumière (acini pancréatiques, glandes salivaires, épithélium transitoire de la vessie, etc.).

Enfin, H2AJ semble s'accumuler dans certains cancers. Les données obtenues sur des cancers du sein confirment que H2AJ semble s'accumuler préférentiellement dans des lignées luminales et non basales même dans un contexte d'induction tumorale. Ces données semblent cohérentes avec celles de la littérature qui montrent des effets hétéroclites sur l'expression de H2AFJ selon le type cellulaire et le contexte physiologique (cellules cancéreuses, prolifératrices, sénescents,...).

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

Les travaux précédant mon arrivée au laboratoire ont permis de mettre en évidence un enrichissement avec le temps d'un variant d'histone H2A.J en condition de sénescence accompagnée de dommages à l'ADN : sénescence répliquative et induites par un stress génotoxique.

Le travail réalisé durant ces trois années de thèse a abouti à la caractérisation d'un variant très peu étudié dans la littérature. H2AJ, dont l'accumulation résulte vraisemblablement d'un phénomène post-traductionnel, est nécessaire à la bonne dépression de gènes d'inflammation du SASP lors de la sénescence. La caractérisation de H2AJ est pour le moment majoritairement descriptive. Une plus grande investigation concernant ce variant permettrait de mieux comprendre le phénotype sénescence, son rôle dans l'expression génique du SASP et ses implications fonctionnelles.

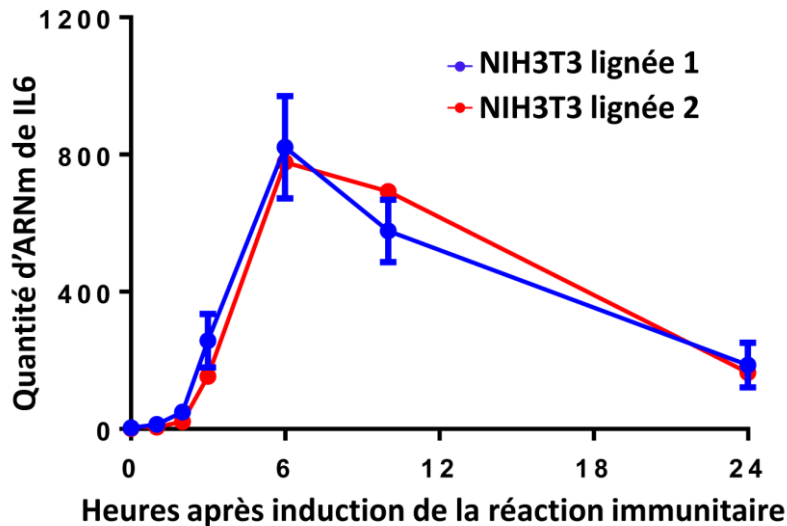
De plus amples informations seront à fournir dans l'avenir en ce qui concerne les mécanismes impliqués dans l'accumulation spécifique de H2AJ et dans son mode d'action sur l'expression des gènes. Enfin, le rôle de H2AJ *in vivo* pourrait révéler de nouvelles fonctions de cette histone dans un contexte physiologique différent de la sénescence.

## H2AJ *in vivo*

Afin d'explorer plus en détail le rôle physiologique de H2AJ, un modèle de souris où le gène H2AFJ a été invalidé en utilisant la technologie de nucléases TALEN est en cours d'élevage au laboratoire. Les souris dépourvues de H2AJ sont viables et fertiles même pour les individus homozygotes. Ainsi, il sera possible d'étudier à plusieurs échelles (organismes, organes, tissus, cellules) l'impact de l'absence totale de l'expression de H2AFJ. De plus, il sera possible de dériver des cultures primaires (ex. MEF) pour des analyses *in vitro*.

Ce modèle sera utilisé dans un premier temps pour vérifier l'impact de l'absence de H2AJ sur des individus d'âges variables pouvant révéler un rôle de H2AJ dans le vieillissement : espérance de vie, développement de pathologies, aptitudes physiques, etc. Il sera également possible de vérifier l'effet du knock-out de H2A.J sur l'expression de gènes dans le foie ou le rein où il est possible d'observer une accumulation précoce de H2A.J.

Les cultures primaires que l'on pourrait obtenir de ces souris pourraient nous permettre de tester l'impact de H2AJ sur la réponse immunitaire. En effet, l'expression de gènes induits par l'activation de TLR3 chez des cellules 3T3 est bien plus forte que ce que l'on peut obtenir sur nos cellules WI38hT (**figure 41**).



*Figure 41. Induction d'une réponse inflammatoire sur cellules 3T3 après traitement Poly(I:C).*

Des fibroblastes primaires d'embryons de souris pourraient être un modèle plus adaptés pour comprendre le rôle de H2AJ en dehors de la sénescence.

Comme expliqué dans la partie précédente, H2AJ est surexprimé dans la lignée de cancer d'origine luminale de sein T47D. Nous disposons grâce à notre collaboration avec le docteur Christophe Redon de clones T47D où H2AJ a subi un knock-out. Nous avons soumis ces lignées à une analyse transcriptomique et nous cherchons actuellement à valider un éventuel effet de l'absence de H2AJ sur l'expression de gènes pouvant influencer le pouvoir tumorigène de ces cellules. En effet, compte-tenu du caractère pro-tumorigène du SASP (Colotta et al. 2009), il ne serait pas absurde de considérer que H2AJ ait été sélectionné pour favoriser la progression tumorale. Or, il se pourrait que cette surexpression ne soit que le résultat d'une surexpression préexistante au développement du phénotype tumoral. Selon les résultats obtenus, ces données apporteront des informations précieuses sur la fonction de H2AJ dans la maintenance de la chromatine et son importance fonctionnelle.



## Etude du mécanisme d'action de H2AJ

Afin d'exploiter les données obtenues par nos mutants de complémentation, nous prévoyons une analyse transcriptomique de la totalité de nos lignées afin de vérifier l'impact des mutations de séquence de H2AJ sur l'expression des gènes du SASP. Cette expérience est en cours et devrait révéler l'importance des variations de séquence de H2AJ par rapport à H2A canonique. Cela nous permettra également de comprendre dans quelle mesure l'accumulation de H2AJ ne se limite pas à pallier un déficit en H2A canonique mais est bel et bien spécifiquement nécessaire ou non à la dépression des gènes codant pour le SASP. De plus, les analyses de nos lignées exprimant des versions mutées de H2AJ nous apporteront des informations sur les séquences fonctionnellement importantes de la protéine. Nous pourrions donc utiliser des peptides spécifiques afin de réaliser des expériences de précipitation qui révélerait un partenaire important.

Afin d'élucider le mécanisme d'action de H2AJ, il sera également nécessaire d'identifier des partenaires interagissant différemment avec H2AJ et H2A canonique. Pour cela, il est possible d'adapter nos protocoles de ChIP afin d'envisager la réalisation d'expériences de co-immunoprécipitation. Nous possédons notamment deux lignées exprimant ectopiquement des versions taguées de H2AJ et H2A. Dans la mesure où les interactions fonctionnelles qui nous intéressent concernent les protéines déposées sur la chromatine, il serait nécessaire d'effectuer ces expériences sur diverses fractions cellulaires notamment des fractions chromatiniennes.

Il serait également intéressant de s'intéresser aux profils de modifications post-traductionnelles des histones lors de la déplétion de H2AJ ainsi que l'état de méthylation de l'ADN. En effet, H2AJ pourrait agir sur l'apparition de marques épigénétiques nécessaires à l'expression du SASP tel que le niveau d'acétylation qui peut influencer l'accessibilité de la chromatine.

Cette accessibilité pourrait d'ailleurs être mesurée en observant la position des nucléosomes au niveau des promoteurs des gènes du SASP dans les conditions d'inactivation du gène H2AFJ. Il serait envisageable de prévoir des expériences de sensibilité à la MNase couplées à des qPCRs ciblant les zones promotrices et TSS des gènes du SASP. Cela permettrait de vérifier un éventuel rôle de H2AJ dans la compaction ou décompaction de la chromatine sur des régions potentiellement impacté par ce changement structurelle.

## Accumulation de H2AJ au cours de la sénescence

La quantité de l'ARNm codant pour H2AJ ne varie que très légèrement dans des conditions d'arrêt du cycle cellulaire (sénescence et quiescence). Or, l'accumulation de H2AJ ne s'observe que majoritairement dans les conditions de sénescence où des dommages à l'ADN persistent à long-terme. Ce phénomène s'explique par une régulation post-transcriptionnelle de la protéine.

Plusieurs hypothèses permettant d'expliquer la régulation post-transcriptionnelle furent testées mais il reste cependant beaucoup de choses à vérifier notamment en ce qui concerne les interactions protéines-protéines de H2AJ.

Ainsi, il serait intéressant de précipiter H2AJ dans le compartiment cytoplasmique ou dans une fraction nucléoplasmique afin d'identifier, par spectrométrie de masse, les protéines interagissant préférentiellement avec H2AJ, et qui pourraient favoriser sa déposition lors de la sénescence. De plus, cela permettrait de mettre en évidence d'éventuelles interactions avec d'autres variants lors de la formation de nucléosomes *de novo*.

Il serait également pertinent d'identifier les molécules clés des voies d'induction de la sénescence nécessaire à l'accumulation de H2AJ. D'après mes résultats, bloquer l'activité kinase de p38MAPK ou l'activité de mTOR ne semble pas impacter l'accumulation de H2AJ. Bien que ces résultats doivent être validés, d'autres effecteurs en amont des voies de réponses aux dommages à l'ADN pourraient être responsables de l'accumulation de H2AJ tel que l'activité des phosphokinases ATM/ATR. Il pourrait être envisageable de vérifier si ces kinases sont en mesure de phosphoryler H2AJ comme elles sont en mesure de le faire pour H2AX. Pour cela, le laboratoire travaille sur des nucléosomes contenant ou non H2AJ, reconstitués *in vitro*.

Ces expériences permettront de déterminer les acteurs essentiels dans la régulation de l'accumulation de H2AJ et aideront à comprendre les voies mises en jeu.

## Bibliographie

- Abbott, D.W. et al., 2001. Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: Implications for transcriptional activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), pp.41945–41949.
- Acosta, J.C., O’Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., et al., 2008. Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell*, 133(6), pp.1006–1018.
- Acosta, J.C., O’Loughlen, A., Banito, A., Raguz, S., et al., 2008. Control of senescence by CXCR2 and its ligands. *Cell Cycle*, 7(19), pp.2956–2959.
- Ahmad, K. & Henikoff, S., 2002. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Molecular Cell*, 9(6), pp.1191–1200.
- Albig, W. & Doenecke, D., 1997. The human histone gene cluster at the D6S105 locus. *Human Genetics*, 101(3), pp.284–294.
- Alimonti, A. et al., 2010. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 120(3), pp.681–693.
- Allen, N.D., Plagge, A. & Kelsey, G., 2000. *Directed mutagenesis in embryonic stem cells*,
- ALLFREY, V.G., FAULKNER, R. & MIRSKY, A.E., 1964. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51(1938), pp.786–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC300163/> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14172992> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC300163>.
- Allis, C.D. et al., 1980. Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eucaryote, tetrahymena thermophila. *Cell*, 20(3), pp.609–617. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867480903074>.
- Amor, D.J. et al., 2004. Human centromere repositioning “in progress”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), pp.6542–7. Available at: <http://www.pnas.org/content/101/17/6542.long>.
- Angelov, D. et al., 2004. SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *The EMBO journal*, 23(19), pp.3815–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=522799&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Arents, G. & Moudrianakis, E.N., 1995. The histone fold: A ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization (paired-element motif/archaeal histones/centromeric CENP-A/transcription/evolution). *Biochemistry*, 92(November), pp.11170–11174.
- Asakura, S. & Oosawa, F., 1954. Interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. *Journal of Chemical Physics*, 22(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), pp.1255–1256.
- Atadja, P. et al., 1995. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(18), pp.8348–52. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41154&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Babu, A., Verma, R.S. & Patil, S.R., 1987. Alul-resistant chromatin of chromosome 18: classification, frequencies and implications. *Chromosoma*, 95(3), pp.163–166. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3038486>.
- Bai, X.-Y. et al., 2011. miR-335 and miR-34a Promote renal senescence by suppressing mitochondrial antioxidative enzymes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 22(7), pp.1252–1261.
- Baker, D.J. et al., 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), pp.232–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3468323&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Balentien, E. et al., 1990. Recombinant expression, biochemical characterization, and biological activities of the human MGSA/gro protein. *Biochemistry*, 29(44), pp.10225–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2271650>.
- Balkwill, F. & Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet*, 357(9255), pp.539–545.
- Bandyopadhyay, D. et al., 2002. Down-regulation of p300/CBP histone acetyltransferase activates a senescence checkpoint in human melanocytes. *Cancer Research*, 62(21), pp.6231–6239.
- Bannister, A.J. et al., 2005. Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(18), pp.17732–17736.
- Bannister, A.J. & Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), pp.381–395. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3193420&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bannister, A.J., Schneider, R. & Kouzarides, T., 2002. Histone methylation: Dynamic or static? *Cell*, 109(7), pp.801–806.
- Bao, Y. et al., 2004. Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *The EMBO journal*, 23(16), pp.3314–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=514500&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Barrero, M.J. et al., 2013. Macrohistone Variants Preserve Cell Identity by Preventing the Gain of H3K4me2 during Reprogramming to Pluripotency. *Cell Reports*, 3(4), pp.1005–1011.
- Barski, A. et al., 2007. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, 129(4), pp.823–837.
- Bartholomew, J.N., Volonte, D. & Galbiati, F., 2009. Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway. *Cancer Research*, 69(7), pp.2878–2886.
- Bartkova, J. et al., 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444(7119), pp.633–637. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17136093>.
- Bartolome, A. & Guillén, C., 2014. Role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) complexes in pancreatic  $\beta$ -cell mass regulation. *Vitamins and hormones*, 95, pp.425–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24559928> [Accessed October 16, 2016].

- Bassett, A. et al., 2009. The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Current Opinion in Genetics and Development*, 19(2), pp.159–165.
- Bassing, C.H. et al., 2003. Histone H2AX: A dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell*, 114(3), pp.359–370.
- Bavik, C. et al., 2006. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Research*, 66(2), pp.794–802.
- Baxter, J., Merckenschlager, M. & Fisher, A.G., 2002. Nuclear organisation and gene expression. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(3), pp.372–376.
- Beauséjour, C.M. et al., 2003. Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO Journal*, 22(16), pp.4212–4222.
- Beauséjour, C.M. et al., 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal*, 22(16), pp.4212–22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=175806&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>.
- Becker, P.B. & Hörz, W., 2002. ATP-DEPENDENT NUCLEOSOME REMODELING. *Annu. Rev. Biochem.*, 71, pp.247–73.
- Begley, L. et al., 2005. CXCL12 overexpression and secretion by aging fibroblasts enhance human prostate epithelial proliferation in vitro. *Aging Cell*, 4(6), pp.291–298.
- Belmont, A.S., Sedat, J.W. & Agard, D.A., 1987. A three-dimensional approach to mitotic chromosome structure: evidence for a complex hierarchical organization. *The Journal of cell biology*, 105(1), pp.77–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2114920&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>.
- Bernstein, E. & Hake, S.B., 2006. The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem Cell Biol*, 84(4), pp.505–517. Available at: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdfplus/10.1139/o06-085>.
- Binet, R. et al., 2009. WNT16B is a new marker of cellular senescence that regulates p53 activity and the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Cancer Research*, 69(24), pp.9183–9191.
- Birchler, J.A., Pal Bhadra, M. & Bhadra, U., 2000. Making noise about silence: Repression of repeated genes in animals. *Current Opinion in Genetics and Development*, 10(2), pp.211–216.
- Bischof, O. et al., 2002. Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO Journal*, 21(13), pp.3358–3369.
- Blasco, M., Finkel, T. & Serrano, M., 2007. The common biology of cancer and ageing. *Nature*, 448(7155), pp.767–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17700693>.
- Bloom, C.I. et al., 2013. Transcriptional Blood Signatures Distinguish Pulmonary Tuberculosis, Pulmonary Sarcoidosis, Pneumonias and Lung Cancers. *PLoS ONE*, 8(8).
- Bode-Böger, S.M., Scalera, F. & Martens-Lobenhoffer, J., 2005. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) accelerates cell senescence. *Vascular Medicine*, 10(2), pp.65–71. Available at: [http://vmj.sagepub.com/content/10/2\\_suppl/S65.abstract](http://vmj.sagepub.com/content/10/2_suppl/S65.abstract).
- Bodnar, A.G. et al., 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into

- normal human cells. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349), pp.349–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9454332>.
- Bouchet-Marquis, C., Dubochet, J. & Fakan, S., 2006. Cryoelectron microscopy of vitrified sections: A new challenge for the analysis of functional nuclear architecture. *Histochemistry and Cell Biology*, 125(1–2), pp.43–51.
- Boulard, M. et al., 2006. The NH2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Mol Cell Biol*, 26(4), pp.1518–1526. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1367197/pdf/1780-05.pdf>.
- Bracken, A.P. et al., 2007. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes and Development*, 21(5), pp.525–530.
- Braig, M. et al., 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, 436(7051), pp.660–665. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079837> <http://www.nature.com/nature/journal/v436/n7051/pdf/nature03841.pdf>.
- Brookes, S. et al., 2002. INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *EMBO Journal*, 21(12), pp.2936–2945.
- Brown, J.P., Wei, W. & Sedivy, J.M., 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5327), pp.831–834.
- Bunz, F. et al., 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282(5393), pp.1497–1501. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/282/5393/1497.full.pdf>.
- Byvoet, P. et al., 1972. The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 148(2), pp.558–567.
- Campisi, J., 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in cell biology*, 11(11), pp.S27–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684439>.
- Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F., 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), pp.729–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17667954> [Accessed August 8, 2013].
- Canino, C. et al., 2012. SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. *Oncogene*, 31(26), pp.3148–3163. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020330>.
- Capell, B.C. et al., 2016. Mll1 is essential for the senescence-associated secretory phenotype. *Genes and Development*, 30(3), pp.321–336.
- Castro, P. et al., 2003. Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate*, 55(1), pp.30–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12640658>.
- De Cecco, M. et al., 2013. Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell*, 12(2), pp.247–256.
- Celeste, A. & Petersen, S., 2002. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, 296(5569), pp.922–7. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11934988><http://www.sciencemag.org/content/296/5569/922.short>.
- Cesare, A.J. & Reddel, R.R., 2010. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature reviews. Genetics*, 11(5), pp.319–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351727>.
- Chadwick, B.P., Valley, C.M. & Willard, H.F., 2001. Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domains capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome. *Nucleic acids research*, 29(13), pp.2699–705. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55781&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chadwick, B.P. & Willard, H.F., 2001. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *Journal of Cell Biology*, 152(2), pp.375–384.
- Chakravarthy, S. et al., 2005. Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol*, 25(17), pp.7616–7624. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16107708><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1190287/pdf/0544-05.pdf>.
- Chang, B.-D. et al., 2002. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), pp.389–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=117570&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>.
- Chen, F.E. et al., 1998. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature*, 391(6665), pp.410–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450761> [Accessed October 16, 2016].
- Chen, H. et al., 2015. MacroH2A1 and ATM Play Opposing Roles in Paracrine Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype Article MacroH2A1 and ATM Play Opposing Roles in Paracrine Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype. , pp.1–13.
- Chen, P., Zhao, J., Wang, Y., et al., 2013. H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin. *Genes and Development*, 27(19), pp.2109–2124.
- Chen, P., Zhao, J. & Li, G., 2013. Histone Variants in Development and Diseases. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(7), pp.355–365. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1673852713000970> [Accessed July 9, 2013].
- Chen, Q. & Ames, B.N., 1994. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), pp.4130–4134.
- Chen, Z. et al., 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436(7051), pp.725–730.
- Cheung, P., Allis, C.D. & Sassone-Corsi, P., 2000. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, 103(2), pp.263–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11057899>.
- Cheung, W.L. et al., 2003. Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*, 113(4), pp.507–517.
- Chien, Y. et al., 2011. Control of the senescence-associated secretory phenotype by



- NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & development*, 25(20), pp.2125–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21979375> [Accessed October 16, 2016].
- Chilosi, M. et al., 2013. Premature lung aging and cellular senescence in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and COPD/emphysema. *Translational Research*, 162(3), pp.156–173.
- Cho, S.W. et al., 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology*, 31(3), pp.230–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23360966>.
- Choo, J.H. et al., 2006. Allele-specific deposition of macroH2A1 in imprinting control regions. *Human Molecular Genetics*, 15(5), pp.717–724.
- Churikov, D., Zalenskaya, I.A. & Zalensky, A.O., 2004. Male germline-specific histones in mouse and man. *Cytogenetic and Genome Research*, 105(2–4), pp.203–214.
- Ciuffreda, L. et al., 2010. The mTOR pathway: a new target in cancer therapy. *Current cancer drug targets*, 10(5), pp.484–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20384580> [Accessed October 16, 2016].
- Clapier, C.R. & Cairns, B.R., 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry*, 78, pp.273–304.
- Collado, M. et al., 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436(7051), p.642. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079833>.
- Collins, N. et al., 2002. An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nature genetics*, 32(4), pp.627–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12434153>.
- Colotta, F. et al., 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), pp.1073–1081.
- Comings, D.E., 1972. The structure and function of chromatin. *Advances in human genetics*, 3, pp.237–431. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4578264> [Accessed September 9, 2016].
- Contrepolis, K. et al., 2012. Deacetylation of H4-K16Ac and heterochromatin assembly in senescence. *Epigenetics & chromatin*, 5(1), p.15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3487866&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Contrepolis, K. et al., 2010. Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry for the fast profiling of histone post-translational modifications. *Journal of Proteome Research*, 9(10), pp.5501–5509.
- Coppé, J.-P. et al., 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *The Journal of biological chemistry*, 281(40), pp.29568–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16880208> [Accessed January 18, 2016].
- Coppé, J.-P. et al., 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*, 6(12), pp.2853–68. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2592359&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed January 10, 2015].
- Coppé, J.-P. et al., 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*, 5, pp.99–118. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4166495&tool=pmc>

- entrez&rendertype=abstract [Accessed November 20, 2014].
- Coppé, J.-P. et al., 2011. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *The Journal of biological chemistry*, 286(42), pp.36396–403. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3196093&tool=pmc> entrez&rendertype=abstract [Accessed February 18, 2016].
- Cornen, S. et al., 2014. Candidate luminal B breast cancer genes identified by genome, gene expression and DNA methylation profiling. *PLoS ONE*, 9(1).
- Costanzi, C. & Pehrson, J.R., 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, 393(6685), pp.599–601. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634239> [Accessed September 11, 2016].
- Courtois-Cox, S. et al., 2006. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, 10(6), pp.459–472.
- Courtois-Cox, S., Jones, S.L. & Cichowski, K., 2008. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*, 27, pp.2801–2809.
- Cremer, T. et al., 2000. Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 10(2), pp.179–212. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11186332>.
- Cremer, T. & Cremer, C., 2001. Chromosome Territories, Nuclear Architecture and Gene Regulation in Mammalian Cells. *Nature Reviews Genetics*, 2(4), pp.292–301. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/35066075>.
- Crescenzi, E., Palumbo, G. & Brady, H.J.M., 2003. Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *The Biochemical journal*, 375(Pt 2), pp.263–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1223693&tool=pmc> entrez&rendertype=abstract.
- Cuenda, A. & Rousseau, S., 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta*, 1773, pp.1358–1375.
- d’Adda di Fagagna, F., 2008. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature reviews. Cancer*, 8(7), pp.512–522.
- Dai, C.Y. & Enders, G.H., 2000. p16<sup>INK4a</sup> can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene*, 19(13), p.1613. Available at: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=8918349&site=ehost-live>.
- Dang, W. et al., 2009. Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature*, 459(7248), pp.802–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08085>.
- Dannenberg, J.H. et al., 2000. Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G1 control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes and Development*, 14(23), pp.3051–3064.
- Davey, C.A. et al., 2002. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 319(5), pp.1097–1113.
- Davis, T. & Kipling, D., 2009. Assessing the role of stress signalling via p38 MAP kinase in the premature senescence of Ataxia Telangiectasia and Werner syndrome fibroblasts. *Biogerontology*, 10(3), pp.253–266.

- Deal, R.B. & Henikoff, S., 2010. Capturing the dynamic epigenome. *Genome biology*, 11(10), p.218. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3218653&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Debacq-Chainiaux, F. et al., 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*, 4(12), pp.1798–806. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010931>.
- Debidda, M., Williams, D.A. & Zheng, Y., 2006. Rac1 GTPase regulates cell genomic stability and senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), pp.38519–38528.
- Dellago, H. et al., 2013. High levels of oncomiR-21 contribute to the senescence-induced growth arrest in normal human cells and its knock-down increases the replicative lifespan. *Aging Cell*, 12(3), pp.446–458.
- Denoyelle, C. et al., 2006. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nature cell biology*, 8(10), pp.1053–1063.
- Deschênes-Simard, X. et al., 2013. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes and Development*, 27(8), pp.900–915.
- van Deursen, J.M., 2014. The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), pp.439–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24848057> [Accessed October 16, 2016].
- Dhalluin, C. et al., 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399(6735), pp.491–496.
- Dhawan, P. & Richmond, A., 2002. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *Journal of leukocyte biology*, 72(1), pp.9–18.
- Dhomen, N. et al., 2009. Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell*, 15(4), pp.294–303.
- Dierick, J.F. et al., 2002. Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Letters*, 531(3), pp.499–504.
- Dimri, G.P. et al., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), pp.9363–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40985&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dimri, G.P. et al., 2000. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Molecular and cellular biology*, 20(1), pp.273–285.
- Dirac, A.M.G. & Bernards, R., 2003. Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), pp.11731–11734.
- Dixon, J.R. et al., 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), pp.376–380. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11082><http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature11082>.

- Dominski, Z. et al., 1999. Stem-loop binding protein facilitates 3'-end formation by stabilizing U7 snRNP binding to histone pre-mRNA. *Molecular and cellular biology*, 19(5), pp.3561–3570.
- Dou, Y. et al., 2005. Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell*, 121(6), pp.873–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15960975> [Accessed October 16, 2016].
- Doyen, C. et al., 2006. Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Molecular and cellular biology*, 26(3), pp.1156–64. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1347033&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>.
- Duarte, L.F. et al., 2014. Histone H3.3 and its proteolytically processed form drive a cellular senescence programme. *Nature communications*, 5, p.5210. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4235654&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>.
- Dubochet, J. & Sartori Blanc, N., 2001. The cell in absence of aggregation artifacts. *Micron*, 32(1), pp.91–99.
- Dunleavy, E.M. et al., 2009. HJURP Is a Cell-Cycle-Dependent Maintenance and Deposition Factor of CENP-A at Centromeres. *Cell*, 137(3), pp.485–497.
- Efeyan, A. et al., 2009. Limited role of murine ATM in oncogene-induced senescence and p53-dependent tumor suppression. *PLoS ONE*, 4(5).
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*, 15(2), pp.188–200.
- Elsaesser, S.J., Goldberg, A.D. & Allis, C.D., 2010. New functions for an old variant: No substitute for histone H3.3. *Current Opinion in Genetics and Development*, 20(2), pp.110–117.
- di Fagagna, F. d'Adda et al., 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), pp.194–198. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature02118>.
- Fakan, S. & van Driel, R., 2007. The perichromatin region: A functional compartment in the nucleus that determines large-scale chromatin folding. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 18(5), pp.676–681.
- Falk, M., Lukášová, E. & Kozubek, S., 2008. Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to  $\gamma$ -radiation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(12), pp.2398–2414.
- Fang, F. et al., 2013. A synthetic TLR3 ligand mitigates profibrotic fibroblast responses by inducing autocrine IFN signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(6), pp.2956–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23956427> [Accessed October 16, 2016].
- Filion, G.J. et al., 2010. Systematic Protein Location Mapping Reveals Five Principal Chromatin Types in Drosophila Cells. *Cell*, 143(2), pp.212–224.
- Filippakopoulos, P. et al., 2012. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell*, 149(1), pp.214–231.
- Finch, J.T. & Klug, A., 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(6), pp.1897–901. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=430414&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), pp.239–247.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), pp.806–811. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486653> <http://www.nature.com/nature/journal/v391/n6669/pdf/391806a0.pdf>.
- Fischle, W. et al., 2005. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, 438(7071), pp.1116–1122.
- Fischle, W., Mootz, H.D. & Schwarzer, D., 2015. Synthetic histone code. *Current Opinion in Chemical Biology*, 28, pp.131–140.
- Fischle, W., Wang, Y. & Allis, C.D., 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), pp.172–183.
- Follmer, N.E. & Francis, N.J., 2012. Preparation of *Drosophila* tissue culture cells from different stages of the cell cycle for chromatin immunoprecipitation using centrifugal counterflow elutriation and fluorescence-activated cell sorting. *Methods in Enzymology*, 513, pp.251–269.
- Foltz, D.R. et al., 2010. Centromere specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell*, 137(3), pp.472–484.
- Fraga, M.F. & Esteller, M., 2007. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends in Genetics*, 23(8), pp.413–418.
- FRANKLIN, S.G. & ZWEIDLER, A., 1977. Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature*, 266(5599), pp.273–275. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/266273a0> [Accessed September 10, 2016].
- Freund, A. et al., 2012. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular biology of the cell*, 23(11), pp.2066–75. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3364172&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Freund, A., Patil, C.K. & Campisi, J., 2011a. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO journal*, 30(8), pp.1536–48. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3102277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Freund, A., Patil, C.K. & Campisi, J., 2011b. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO journal*, 30(8), pp.1536–48. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3102277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 2, 2016].
- Fry, C.J. & Peterson, C.L., 2001. Chromatin remodeling enzymes: Who's on first? *Current Biology*, 11(5).
- Fumagalli, M. et al., 2012. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature cell biology*, 14(4), pp.355–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3717580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Fussner, E. et al., 2012. Open and closed domains in the mouse genome are configured as 10-nm chromatin fibres. *EMBO reports*, 13(11), pp.992–996. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2012.139>.
- Gansauge, S. et al., 1997. The induction of apoptosis in proliferating human fibroblasts by oxygen radicals is associated with a p53- and p21(WAF1CIP1) induction. *FEBS Letters*, 404(1), pp.6–10.
- Gardner, K.E., Allis, C.D. & Strahl, B.D., 2011. Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *Journal of Molecular Biology*, 409(1), pp.36–46.
- Gautier, T. et al., 2004. Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO reports*, 5(7), pp.715–20. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1299093&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Georgakopoulou, E.A. et al., 2013. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging*, 5(1), pp.37–50.
- Gil, J. et al., 2004. Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nature cell biology*, 6(1), pp.67–72.
- Gil, J. & Peters, G., 2006. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(9), pp.667–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921403>.
- Gilbert, N. & Ramsahoye, B., 2005. The relationship between chromatin structure and transcriptional activity in mammalian genomes. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 4(2), pp.129–142. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102269>.
- Gineitis, A.A. et al., 2000. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *Journal of Cell Biology*, 151(7), pp.1591–1597.
- Gire, V. et al., 2004. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *The EMBO journal*, 23(13), pp.2554–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=449769&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Goldstein, S. et al., 1994. Overexpression of plasminogen activator inhibitor type-1 in senescent fibroblasts from normal subjects and those with Werner syndrome. *Journal of Cellular Physiology*, 161(3), pp.571–579.
- Gomes, A.L.C. & Wang, H.H., 2016. The Role of Genome Accessibility in Transcription Factor Binding in Bacteria. *PLoS Computational Biology*, 12(4).
- Gordon, J.R.S. & Brieva, J.C., 2012. Unilateral Dermatoheliosis. *New England Journal of Medicine*, 366(16), p.e25. Available at: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMicm1104059> [Accessed October 18, 2016].
- Gosselin, K. et al., 2009. Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death. *The American journal of pathology*, 174(2), pp.423–35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2630552&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Gossen, M. & Bujard, H., 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), pp.5547–51. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1319065><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC49329>.
- Green, M.R., 2008. Senescence: Not Just for Tumor Suppression. *Cell*, 134(4), pp.562–564.
- Hake, S.B. & Allis, C.D., 2006. Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the “H3 barcode hypothesis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), pp.6428–6435.
- Hansen, J.C., 2012. Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre? *The EMBO Journal*, 31(7), pp.1621–1623.
- Harp, J.M. et al., 2000. Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 56(12), pp.1513–1534.
- Haupt, Y. et al., 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630), pp.296–9. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/246170a0><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9153395>.
- Hayden, M.S. & Ghosh, S., 2012. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century : remarkable progress and outstanding questions. , pp.203–234.
- Hayflick, L. & Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), pp.585–621. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482761901926>.
- He, J. et al., 2008. The H3K36 demethylase Jhdm1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15(Ink4b). *Nature structural & molecular biology*, 15(11), pp.1169–75. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2612995&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Hemann, M.T. & Narita, M., 2007. Oncogenes and senescence: Breaking down in the fast lane. *Genes and Development*, 21(1), pp.1–5.
- Henikoff, S. & Ahmad, K., 2005. Assembly of variant histones into chromatin. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, pp.133–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212490> [Accessed October 16, 2016].
- Heo, K. et al., 2008. FACT-Mediated Exchange of Histone Variant H2AX Regulated by Phosphorylation of H2AX and ADP-Ribosylation of Spt16. *Molecular Cell*, 30(1), pp.86–97.
- Herbig, U. et al., 2006. Cellular senescence in aging primates. *Science*, 311(5765), p.1257. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16456035](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16456035).
- Herbig, U. et al., 2004. Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21 CIP1, but Not p16 INK4a. , 14, pp.501–513.
- Herranz, N. et al., 2015. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nature cell biology*, 17(9), pp.1205–17. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4589897&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Hirano, T., 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature*



- Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), pp.311–322. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm1909>  
<http://www.nature.com/nrm/journal/v7/n5/full/nrm1909.html>  
<http://www.nature.com/nrm/journal/v7/n5/pdf/nrm1909.pdf>.
- Hirota, T. et al., 2005. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*, 438(7071), pp.1176–1180.
- Hoare, M., Young, A.R.J. & Narita, M., 2011. Autophagy in cancer: Having your cake and eating it. *Seminars in Cancer Biology*, 21(6), pp.397–404.
- Horikoshi, M., 2013. Histone acetylation: from code to web and router via intrinsically disordered regions. *Curr Pharm Des*, 19(28), pp.5019–5042.
- Howman, E. V et al., 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), pp.1148–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15551&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hsu, J.-Y. et al., 2000. Mitotic Phosphorylation of Histone H3 Is Governed by Ipl1/aurora Kinase and Glc7/PP1 Phosphatase in Budding Yeast and Nematodes. *Cell*, 102(3), pp.279–291. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400000349>.
- Huang, S., Bjornsti, M.-A. & Houghton, P.J., 2003. Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer biology & therapy*, 2(3), pp.222–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12878853> [Accessed October 16, 2016].
- Iizuka, M. & Smith, M.M., 2003. Functional consequences of histone modifications. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(2), pp.154–160. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X03000200>.
- Imhof, A. & Bonaldi, T., 2005. “Chromatomics” the analysis of the chromatome. *Molecular bioSystems*, 1(2), pp.112–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16880972>.
- Itahana, K. et al., 2003. Control of the Replicative Life Span of Human Fibroblasts by p16 and the Polycomb Protein Bmi-1. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), pp.389–401. Available at: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/23/1/389>.
- Ivanov, A. et al., 2013. Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *The Journal of cell biology*, 202(1), pp.129–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23816621> [Accessed July 30, 2013].
- Ivanov, a. et al., 2013. Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *The Journal of Cell Biology*, 202(1), pp.129–143. Available at: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201212110> [Accessed December 14, 2015].
- Iwasa, H., Han, J. & Ishikawa, F., 2003. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cells*, 8(2), pp.131–144.
- Jacobs, J.J. et al., 1999. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*, 397(6715), pp.164–168.
- Jansen, L.E.T. et al., 2007. Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *Journal of Cell Biology*, 176(6), pp.795–805.
- Jeanblanc, M. et al., 2012. Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion. *Oncogene*, 31(25), pp.3072–85. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020327> [Accessed May 24, 2013].
- Jenuwein, T. & Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science*, 293(5532), pp.1074–1080. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498575>.
- Jeyapalan, J.C. et al., 2007. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(1), pp.36–44.
- Jin, C. et al., 2009. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark “nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions. *Nature genetics*, 41(8), pp.941–5. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.409>.
- Jun, J.-I. & Lau, L.F., 2010. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature cell biology*, 12(7), pp.676–85. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2070>.
- Kadauke, S. et al., 2012. Tissue-specific mitotic bookmarking by hematopoietic transcription factor GATA1. *Cell*, 150(4), pp.725–737.
- Kaeberlein, M., McVey, M. & Guarente, L., 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes and Development*, 13(19), pp.2570–2580.
- Kamijo, T. et al., 1998. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), pp.8292–7. Available at: <http://www.pnas.org/content/95/14/8292.abstract>.
- Kamijo, T. et al., 1997. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, 91(5), pp.649–659.
- Kang, T.-W. et al., 2011. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479(7374), pp.547–551. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10599>.
- Karch, K.R. et al., 2013. Identification and interrogation of combinatorial histone modifications. *Frontiers in Genetics*, 4(DEC).
- Katakura, Y. et al., 1999. Transforming growth factor beta triggers two independent-senescence programs in cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 255(1), pp.110–115.
- Kato, D. et al., 1998. Features of replicative senescence induced by direct addition of antenapedia-p16(INK4A) fusion protein to human diploid fibroblasts. *FEBS Letters*, 427(2), pp.203–208.
- Khorasanizadeh, S., 2004. The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation. *Cell*, 116(2), pp.259–272.
- Kim, J. et al., 2009. RAD6-Mediated Transcription-Coupled H2B Ubiquitylation Directly Stimulates H3K4 Methylation in Human Cells. *Cell*, 137(3), pp.459–471.
- Kim, K.S., Seu, Y.B., et al., 2007. Induction of cellular senescence by insulin-like growth factor binding protein-5 through a p53-dependent mechanism. *Molecular biology of the cell*, 18(11), pp.4543–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2043568&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Kim, K.S., Kim, M.-S., et al., 2007. Regulation of replicative senescence by insulin-like growth factor-binding protein 3 in human umbilical vein endothelial cells. *Aging cell*, 6(4), pp.535–45.
- Kim, W.Y. & Sharpless, N.E., 2006. The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell*, 127(2), pp.265–275.

- Kimmelman, A.C., 2011. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes and Development*, 25(19), pp.1999–2010.
- Kitagawa & Hieter, 2001. Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(9), pp.678–687.
- Kobor, M.S. et al., 2004. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biology*, 2(5).
- Kong, X. et al., 2012. Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology*, 56(3), pp.1150–1159.
- Korotchikina, L.G. et al., 2010. The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging*, 2(6), pp.344–352.
- Kortlever, R.M. & Bernards, R., 2006. Senescence, wound healing and cancer: The PAI-1 connection. *Cell Cycle*, 5(23), pp.2697–2703.
- Kosar, M. et al., 2011. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- And insult-dependent manner, and follow expression of p16ink4a. *Cell Cycle*, 10(3), pp.457–468.
- Kothapalli, N. et al., 2005. Biological functions of biotinylated histones. In *Journal of Nutritional Biochemistry*. pp. 446–448.
- Kovacheva, M. et al., 2014. Sustained conditional knockdown reveals intracellular bone sialoprotein as essential for breast cancer skeletal metastasis. *Oncotarget*, 5(14), pp.5510–5522.
- Krishnamurthy, J. et al., 2004. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *Journal of Clinical Investigation*, 114(9), pp.1299–1307.
- Krishnan, V. et al., 2011. Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(30), pp.12325–30. Available at: <http://www.pnas.org/content/108/30/12325.long>.
- Krizhanovsky, V. et al., 2008. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell*, 134(4), pp.657–667.
- Krtolica, A. et al., 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), pp.12072–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=59769&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kuilman, T. et al., 2008. Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell*, 133(6), pp.1019–1031.
- Kuilman, T. & Peeper, D.S., 2009. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews. Cancer*, 9(2), pp.81–94. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2560><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19132009>.
- Kumar, S. et al., 1993. Expression of interleukin-1 in early passage fibroblasts from aging individuals. *Experimental Gerontology*, 28(6), pp.505–513.
- Kumazaki, T., 1993. Modulation of gene expression during aging of human vascular endothelial cells. *Hiroshima J Med Sci*, 42(2), pp.97–100.
- Laberge, R.-M. et al., 2015. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-

- associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature cell biology*, 17(8), pp.1049–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4691706&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Lan, X., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G., 1999. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current Opinion in Genetics and Development*, 9(2), pp.140–147.
- Lange, M. et al., 2008. Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes and Development*, 22(17), pp.2370–2384.
- Lee, A.C. et al., 1999. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), pp.7936–7940.
- Lee, H.-S. et al., 2010. A cooperative activation loop among SWI/SNF, gamma-H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair. *The EMBO journal*, 29(8), pp.1434–1445. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.27>.
- Lehmann, B.D. et al., 2008. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 68(19), pp.7864–7871.
- Di Leonardo, A. et al., 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes and Development*, 8(21), pp.2540–2551.
- Leontieva, O. V. & Blagosklonny, M. V., 2010. DNA damaging agents and p53 do not cause senescence in quiescent cells, while consecutive re-activation of mTOR is associated with conversion to senescence. *Aging*, 2(12), pp.924–935.
- Levine, A.J., 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3), pp.323–331.
- Levine, B. & Kroemer, G., 2008. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 132(1), pp.27–42.
- Lewis, D.A. et al., 2008. UVB-induced Senescence in Human Keratinocytes Requires a Functional Insulin-like Growth Factor-1 Receptor and p53. *Molecular Biology of the Cell*, 19(4), pp.1346–1353. Available at: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E07-10-1041>.
- Li, A. et al., 2005. Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry*, 44(7), pp.2529–2535.
- Li, G. et al., 2005. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nature structural & molecular biology*, 12(1), pp.46–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15580276>.
- Liang, D. et al., 2012. Histone dosage regulates DNA damage sensitivity in a checkpoint-independent manner by the homologous recombination pathway. *Nucleic Acids Research*, 40(19), pp.9604–9620.
- Lin, A.W. et al., 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes and Development*, 12(19), pp.3008–3019.
- Liton, P.B. et al., 2005. Induction of TGF-beta1 in the trabecular meshwork under cyclic mechanical stress. *Journal of cellular physiology*, 205(3), pp.364–71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3143836&tool=pmc>

- entrez&rendertype=abstract.
- Liu, D. & Hornsby, P.J., 2007. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Research*, 67(7), pp.3117–3126.
- van der Loo, B. et al., 2000. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *The Journal of experimental medicine*, 192(12), pp.1731–44.
- Lossaint, G. et al., 2011. Chk1 is dispensable for G2 arrest in response to sustained DNA damage when the ATM/p53/p21 pathway is functional. *Oncogene*, 30(41), pp.4261–4274.
- Lowe, S.W. & Sherr, C.J., 2003. Tumor suppression by Ink4a-Arf: Progress and puzzles. *Current Opinion in Genetics and Development*, 13(1), pp.77–83.
- Lu, C., Vickers, M.F. & Kerbel, R.S., 1992. Interleukin 6: a fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(19), pp.9215–9219. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1409627>.
- Lu, S.Y. et al., 2006. Ripe areca nut extract induces G1 phase arrests and senescence-associated phenotypes in normal human oral keratinocyte. *Carcinogenesis*, 27(6), pp.1273–1284.
- Lu, X. & Hansen, J.C., 2004. Identification of Specific Functional Subdomains within the Linker Histone H10 C-terminal Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), pp.8701–8707.
- Luger, K. et al., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), pp.251–260.
- Luk, E. et al., 2010. Stepwise histone replacement by SWR1 requires dual activation with histone H2A.Z and canonical nucleosome. *Cell*, 143(5), pp.725–736.
- Lukas, J. et al., 1995. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*, 375(6531), pp.503–506.
- Lusser, A. & Kadonaga, J.T., 2003. Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *BioEssays*, 25(12), pp.1192–1200.
- Maehara, K., Takahashi, K. & Saitoh, S., 2010. CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Molecular and cellular biology*, 30(9), pp.2090–2104.
- Maeshima, K. et al., 2014. Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma*, 123(3), pp.225–237.
- Maeshima, K. & Eltsov, M., 2008. Packaging the genome: The structure of mitotic chromosomes. *Journal of Biochemistry*, 143(2), pp.145–153.
- Maier, J. a et al., 1990. Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 alpha antisense oligomer. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4976), pp.1570–1574.
- Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F. & Ferbeyre, G., 2007. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes and Development*, 21(1), pp.43–48.
- Marcotte, R., Lacelle, C. & Wang, E., 2004. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(10–11 SPEC. ISS.), pp.777–783.
- Marcoux, S. et al., 2013. Expression of the senescence marker p16INK4a in skin biopsies of acute lymphoblastic leukemia survivors: a pilot study. *Radiation*

- oncology (London, England)*, 8, p.252. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3827993&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Margueron, R., Trojer, P. & Reinberg, D., 2005. The key to development: Interpreting the histone code? *Current Opinion in Genetics and Development*, 15(2), pp.163–176.
- Marsden, M.P.F. & Laemmli, U.K., 1979. Metaphase chromosome structure: Evidence for a radial loop model. *Cell*, 17(4), pp.849–858.
- Martin, J. a et al., 2004. Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clinical orthopaedics and related research*, (427 Suppl), pp.S96–S103.
- Marzluff, W.F. et al., 2002. The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics*, 80(5), pp.487–498.
- Mason, D.X., Jackson, T.J. & Lin, A.W., 2004. Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene*, 23(57), pp.9238–9246.
- McKittrick, E. et al., 2004. Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), pp.1525–30. Available at: <http://www.pnas.org/content/101/6/1525.long>.
- McQuibban, G.A. et al., 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood*, 100(4), pp.1160–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149192>.
- Mehta, I.S. et al., 2007. Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells. In *Annals of the New York Academy of Sciences*. pp. 250–263.
- Meissner, A., 2010. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nature biotechnology*, 28(10), pp.1079–88. Available at: <http://www.nature.com/gate1.inist.fr/nbt/journal/v28/n10/full/nbt.1684.html>.
- Messner, S. & Hottiger, M.O., 2011. Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends in Cell Biology*, 21(9), pp.534–542.
- Di Micco, R. et al., 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 444(7119), pp.638–642.
- Michaloglou, C. et al., 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436(August), pp.720–724.
- Millis, a J. et al., 1992. Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Experimental cell research*, 201, pp.373–379.
- Minamino, T. et al., 2002. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*, 105(13), pp.1541–1544.
- Misteli, T., 2007. Beyond the Sequence: Cellular Organization of Genome Function. *Cell*, 128(4), pp.787–800.
- Mito, Y., Henikoff, J.G. & Henikoff, S., 2005. Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nature genetics*, 37(10), pp.1090–1097.
- Mizuguchi, G. et al., 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science (New York, NY)*, 303(5656), pp.343–348. Available at: <papers://361aed09-ebce-4b55-aeec-a0834473af1d/Paper/p37>.
- Moiseeva, O. et al., 2006. DNA damage signaling and p53-dependent senescence after

- prolonged beta-interferon stimulation. *Molecular biology of the cell*, 17(4), pp.1583–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1415317&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Moussa Benhamed, Utz Herbig, Tao Ye, A.D. and O.B., 2012. Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Nature cell biology*, 14, pp.266–275.
- Moyzis, R.K. et al., 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(18), pp.6622–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=282029&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Muntoni, A. & Reddel, R.R., 2005. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Human Molecular Genetics*, 14(SUPPL. 2).
- Musselman, C. a et al., 2012. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nature structural & molecular biology*, 19(12), pp.1218–27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3645987&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed May 29, 2013].
- Muthurajan, U.M. et al., 2011. The linker region of macroH2A promotes self-association of nucleosomal arrays. *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), pp.23852–23864.
- Nakanishi, S. et al., 2009. Histone H2BK123 monoubiquitination is the critical determinant for H3K4 and H3K79 trimethylation by COMPASS and Dot1. *Journal of Cell Biology*, 186(3), pp.371–377.
- Nardella, C. et al., 2011. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 11(7), pp.503–511. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3057>.
- Narita, M., 2007. Cellular senescence and chromatin organisation. *British journal of cancer*, 96(5), pp.686–91. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603636>.
- Narita, M. et al., 2003. Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence State University of New York at Stony Brook. , 113, pp.703–716.
- Nasmyth, K., 2005. How might cohesin hold sister chromatids together? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360(1455), pp.483–496. Available at: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/royptb/360/1455/483.full.pdf>.
- Naumova, N. et al., 2013. Organization of the mitotic chromosome. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6161), pp.948–53. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/342/6161/948.abstract>.
- Naylor, R.M., Baker, D.J. & van Deursen, J.M., 2012. Senescent Cells: A Novel Therapeutic Target for Aging and Age-Related Diseases. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 93(1), pp.105–116. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4051295&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Ness, K.K. et al., 2015. Frailty in childhood cancer survivors. *Cancer*, 121(10), pp.1540–1547.
- Nishida, H. et al., 2005. A novel replication-independent histone H2a gene in mouse. *BMC genetics*, 6, p.10.



- Nora, E.P. et al., 2012. Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature*, 485, pp.381–385.
- Noren Hooten, N. et al., 2010. microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS ONE*, 5(5).
- Nowak, D.E., Tian, B. & Brasier, A.R., 2005. Two-step cross-linking method for identification of NF- $\kappa$ B gene network by chromatin immunoprecipitation. *Biotechniques*, 39(5), pp.715–725. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16315372](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16315372).
- O’Sullivan, R.J. et al., 2010. Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nature structural & molecular biology*, 17(10), pp.1218–25. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1897>.
- Ogryzko, V. V et al., 1996. Human Fibroblast Commitment to a Senescence-Like State in Response to Histone Deacetylase Inhibitors Is Cell Cycle Dependent. , 16(9), pp.5210–5218.
- Ohtani, K., DeGregori, J. & Nevins, J.R., 1995. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(December), pp.12146–12150.
- Ohuchida, K. et al., 2004. Radiation to Stromal Fibroblasts Increases Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells through Tumor-Stromal Interactions. *Cancer Research*, 64(9), pp.3215–3222.
- Olins, D.E. & Olins, A.L., 2003. Chromatin history: our view from the bridge. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(10), pp.809–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14570061>.
- Olivieri, F. et al., 2013. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing research reviews*, 12(4), pp.1056–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23688930> [Accessed February 16, 2016].
- Olsen, C.L. et al., 2002. Raf-1-induced growth arrest in human mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal cells during conversion. *Oncogene*, 21(41), pp.6328–6339.
- Ono, T., Yamashita, D. & Hirano, T., 2013. Condensin II initiates sister chromatid resolution during S phase. *Journal of Cell Biology*, 200(4), pp.429–441.
- Orjalo, A. V et al., 2009. Cell surface-bound IL-1 $\alpha$  is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(40), pp.17031–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2761322&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Owen-Hughes, T., 2003. Pathways for remodelling chromatin. *Biochemical Society Transactions*, 31(5).
- PACKER, L. & FUEHR, K., 1977. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature*, 267(5610), pp.423–425. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/267423a0>.
- Palm, W. & de Lange, T., 2008. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annual Review of Genetics*, 42(1), pp.301–334. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genet.41.110306.130350>

- Palmer, A.K. et al., 2015. Cellular Senescence in Type 2 Diabetes: A Therapeutic Opportunity. *Diabetes*, 64(7), pp.2289–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26106186> [Accessed September 9, 2016].
- Pandey, N.B. et al., 1990. Introns in histone genes alter the distribution of 3' ends. *Nucleic acids research*, 18(11), pp.3161–3170.
- Parapuram, S.K. et al., 2010. Distinct Signature of Altered Homeostasis in Aging Rod Photoreceptors: Implications for Retinal Diseases. *PLoS ONE*, 5(11).
- Parrinello, S. et al., 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature cell biology*, 5(8), pp.741–747.
- Parrinello, S. et al., 2005. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *Journal of cell science*, 118(Pt 3), pp.485–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15657080>.
- Passarge, E., 1979. Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *American journal of human genetics*, 31(2), pp.106–15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1685768&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Paulson, J.R. & Laemmli, U.K., 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12(3), pp.817–828.
- Pearson, M. et al., 2000. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*, 406(6792), pp.207–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910364>.
- Pehrson, J.R. & Fried, V. a, 1992. MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5075), pp.1398–1400.
- Perche, P. & Robert-nicoud, M., 2013. du nucléosome : le rôle des variants de l' histone H2A. , 19(April), pp.1137–1145.
- Peters, D.M. et al., 2002. Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 283(3), pp.C878–C884.
- Petersen, S. et al., 2001. AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature*, 414(6864), pp.660–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4729367&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Pfau, R. et al., 2008. Members of a family of JmjC domain-containing oncoproteins immortalize embryonic fibroblasts via a JmjC domain-dependent process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), pp.1907–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2538857&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Pichlmair, A. et al., 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5801), pp.997–1001. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038589> [Accessed October 16, 2016].
- Pilch, D.R. et al., 2003. Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochemistry and Cell Biology*, 81(3), pp.123–9. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->

- 0041732381&partnerID=tZOtx3y1.
- Place, R.F., Noonan, E.J. & Giardina, C., 2005. HDAC inhibition prevents NF-KB activation by suppressing proteasome activity: Down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes IKB. *Biochemical Pharmacology*, 70(3), pp.394–406.
- Platt, J.M. et al., 2013. Rap1 relocalization contributes to the chromatin-mediated gene expression profile and pace of cell senescence. *Genes and Development*, 27(12), pp.1406–1420.
- Te Poele, R.H. et al., 2002. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 62(6), pp.1876–1883.
- Pospelova, T. V et al., 2009. Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(24), pp.4112–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19946210> [Accessed October 16, 2016].
- Prado, F., Jimeno-González, S. & Reyes, J.C., 2016. Histone availability as a strategy to control gene expression. *RNA biology*, pp.1–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27211514> [Accessed September 11, 2016].
- Rai, T.S. & Adams, P.D., 2012. Lessons from senescence: Chromatin maintenance in non-proliferating cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(3–4), pp.322–331.
- Rajagopalan, S., 2014. HLA-G-mediated NK cell senescence promotes vascular remodeling: implications for reproduction. *Cellular & molecular immunology*, 0(0), p.0. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24998350>.
- Ramirez, R.D. et al., 2001. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes and Development*, 15(4), pp.398–403.
- Rasmussen, T.P. et al., 1999. Messenger RNAs encoding mouse histone macroH2A1 isoforms are expressed at similar levels in male and female cells and result from alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 27(18), pp.3685–3689.
- Rasoamanantena, P. et al., 1994. Altered regulation of fibronectin gene expression in Werner syndrome fibroblasts. *Experimental cell research*, 213(1), pp.121–127.
- Rea, S. et al., 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406(6796), pp.593–599.
- Rebbaa, A. et al., 2003. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*, 22(18), pp.2805–2811.
- Redon, C. et al., 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current opinion in genetics & development*, 12(2), pp.162–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893489>.
- Reimann, M. et al., 2010. Tumor Stroma-Derived TGF-β Limits Myc-Driven Lymphomagenesis via Suv39h1-Dependent Senescence. *Cancer Cell*, 17(3), pp.262–272.
- Richmond, T.J. & Davey, C.A., 2003. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423(6936), pp.145–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789217>.
- Rinehart, C.A. et al., 1999. The role of interleukin-1 in interactive senescence and age-related human endometrial cancer. *Experimental cell research*, 248(2), pp.599–607.
- Rodier, F. et al., 2010. Persistent DNA damage signaling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. , 11(8), pp.973–979.

- Rodier, F. et al., 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology*, 11(8), pp.973–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2743561&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Rodier, F., Campisi, J. & Bhaumik, D., 2007. Two faces of p53: Aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Research*, 35(22), pp.7475–7484.
- Rogakou, E.P. et al., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), pp.5858–5868.
- Rogakou, E.P. et al., 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), pp.9390–9395.
- Rogakou, E.P. & Sekeri-Pataryas, K.E., 1999. Histone variants of H2A and H3 families are regulated during in vitro aging in the same manner as during differentiation. *Experimental Gerontology*, 34(6), pp.741–754.
- Roninson, I.B., 2003. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Research*, 63(11), pp.2705–2715.
- Rosen, N. et al., 2003. GeneLoc: Exon-based integration of human genome maps. In *Bioinformatics*.
- Ryba, T. et al., 2010. Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Research*, 20(6), pp.761–770.
- Ryu, S.J., Oh, Y.S. & Park, S.C., 2007. Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell death and differentiation*, 14(5), pp.1020–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17290286>.
- Sadaie, M. et al., 2013. Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. , pp.1800–1808.
- Sage, J. et al., 2000. Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G1 control and immortalization. *Genes and Development*, 14(23), pp.3037–3050.
- Sakabe, K., Wang, Z. & Hart, G.W., 2010. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *PNAS*, 107, pp.19915–19920.
- Salama, R. et al., 2014. Cellular senescence and its effector programs. , pp.99–114.
- Salminen, A. & Kaarniranta, K., 2011. Control of p53 and NF- $\kappa$ B signaling by WIP1 and MIF: Role in cellular senescence and organismal aging. *Cellular Signalling*, 23(5), pp.747–752.
- Sanchez, R. & Zhou, M.M., 2009. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Current opinion in drug discovery & development*, 12(5), pp.659–665.
- Sarbassov, D.D. et al., 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell*, 22(2), pp.159–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16603397> [Accessed October 16, 2016].
- Sarkar, D. et al., 2004. Human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseold-35): A potential link between aging and inflammation. *Cancer Research*, 64(20), pp.7473–7478.

- Sarkar, S. et al., 2004. Influence of cytokines and growth factors in ANG II-mediated collagen upregulation by fibroblasts in rats: role of myocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 287(Nb 50), pp.H107–H117.
- Sarkisian, C.J. et al., 2007. Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nature cell biology*, 9(5), pp.493–505. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17450133>.
- Sato, I. et al., 1993. Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 195(2), pp.1070–1076. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7690550](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7690550).
- Schadendorf, D. et al., 1993. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 151(5), pp.2667–75. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/151/5/2667.abstract>.
- Schmitz, M.L. & de la Vega, L., 2015. New Insights into the Role of Histone Deacetylases as Coactivators of Inflammatory Gene Expression. *Antioxidants & redox signaling*, 23(1), pp.85–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24359078> [Accessed February 18, 2016].
- Seluanov, A. et al., 2001. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Molecular and cellular biology*, 21(5), pp.1552–64. Available at: [http://apps.webofknowledge.com/full\\_record.do?product=UA&search\\_mode=GeneralSearch&qid=61&SID=P1hyFVyAaARMY6yxmoN&page=1&doc=1](http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=61&SID=P1hyFVyAaARMY6yxmoN&page=1&doc=1).
- Serrano, M., Lin, A.W., et al., 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell*, 88(5), pp.593–602.
- Serrano, M., Lin, A.W., et al., 1997. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16 INK4a. , 88, pp.593–602.
- Sexton, T. & Cavalli, G., 2015. The role of chromosome domains in shaping the functional genome. *Cell*, 160(6), pp.1049–1059.
- Shah, P.P. et al., 2013. Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes and Development*, 27(16), pp.1787–1799.
- Sharpless, N.E., 2005. INK4a/ARF: A multifunctional tumor suppressor locus. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 576(1–2), pp.22–38.
- Sharpless, N.E. & DePinho, R. a, 2005. Cancer: Crime and punishment. *Nature*, 436(7051), pp.1–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079829>.
- Sharpless, N.E. & Sherr, C.J., 2015. Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), pp.397–408. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc3960>.
- Shay, J.W. & Bacchetti, S., 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*, 33(5), pp.787–791. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804997000622>.
- Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M. & Wright, W.E., 1991. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Experimental Cell Research*, 196(1),

- pp.33–39.
- Shay, J.W. & Roninson, I.B., 2004. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*, 23(16), pp.2919–2933.
- Shelton, D.N. et al., 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Current biology : CB*, 9(17), pp.939–945.
- Shi, X. et al., 2006. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*, 442(7098), pp.96–99.
- Shi, Y. et al., 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119(7), pp.941–953.
- Shiio, Y. & Eisenman, R.N., 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), pp.13225–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=263760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shimizu, I. et al., 2014. DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metabolism*, 20(6), pp.967–977.
- Shumaker, D.K. et al., 2006. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), pp.8703–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1472659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Skene, P.J. & Henikoff, S., 2013. Histone variants in pluripotency and disease. *Development (Cambridge, England)*, 140, pp.2513–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23715545>.
- Smolle, M. et al., 2012. Chromatin remodelers Isw1 and Chd1 maintain chromatin structure during transcription by preventing histone exchange. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(9), pp.884–892. Available at: <http://www.nature.com/nsmb/journal/v19/n9/full/nsmb.2370.html>.
- Sofueva, S. et al., 2010. BRCT domain interactions with phospho-histone H2A target Crb2 to chromatin at double-strand breaks and maintain the DNA damage checkpoint. *Molecular and cellular biology*, 30(19), pp.4732–43. Available at: </pmc/articles/PMC2950532/?report=abstract>.
- Stein, G.H. et al., 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Molecular and cellular biology*, 19(3), pp.2109–17. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84004&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Strahl, B.D. & Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), pp.41–45.
- Strukov, Y.G. & Belmont, A.S., 2009. Mitotic chromosome structure: Reproducibility of folding and symmetry between sister chromatids. *Biophysical Journal*, 96(4), pp.1617–1628.
- Stucki, M. et al., 2005. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123(7), pp.1213–1226.
- Stucki, M. & Jackson, S.P., 2006. γH2AX and MDC1: Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair*, 5(5), pp.534–543.
- Studitsky, V.M. et al., 2004. Chromatin remodeling by RNA polymerases. *Trends in*

- Biochemical Sciences*, 29(3), pp.127–135.
- Su, D. et al., 2012. Structural basis for recognition of H3K56-acetylated histone H3-H4 by the chaperone Rtt106. *Nature*, 483(7387), pp.104–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3439842&tool=pmc&rentertype=abstract%5Cnhttp://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22307274&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2:/publication/doi/10.1038/nature10861%5C>.
- Sullivan, K.F., 2001. A solid foundation: Functional specialization of centromeric chromatin. *Current Opinion in Genetics and Development*, 11(2), pp.182–188.
- Sung, S. & Amasino, R.M., 2004. Vernalization and epigenetics: How plants remember winter. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(1), pp.4–10.
- Suram, A. & Herbig, U., 2014. The replicometer is broken: Telomeres activate cellular senescence in response to genotoxic stresses. *Aging Cell*, 13(5), pp.780–786.
- Suzuki, M. & Boothman, D. a, 2008. Stress-induced Premature Senescence (SIPS). *Journal of Radiation Research*, 49(2), pp.105–112. Available at: [files/1023/Suzuki and Boothman - 2008 - Stress-induced Premature Senescence \(SIPS\).pdf](files/1023/Suzuki%20and%20Boothman%20-%20Stress-induced%20Premature%20Senescence%20(SIPS).pdf).
- Swedlow, J.R. & Hirano, T., 2003. The making of the mitotic chromosome: Modern insights into classical questions. *Molecular Cell*, 11(3), pp.557–569.
- Tagami, H., Ray-gallet, D. & Nakatani, Y., 2004. Mediate Nucleosome Assembly Pathways Dependent or Independent of DNA Synthesis. *Assembly*, 116(1), pp.51–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14718166>.
- Takahashi, A. et al., 2012. DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C Cdh1 in senescent cells. *Molecular Cell*, 45(1), pp.123–131.
- Takata, H. et al., 2013. Chromatin Compaction Protects Genomic DNA from Radiation Damage. *PLoS ONE*, 8(10).
- Tan, M. et al., 2011. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, 146(6), pp.1016–1028.
- Thangavel, C. et al., 2011. Therapeutically activating RB: Reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 18(3), pp.333–345.
- Thompson, P.R. & Fast, W., 2006. Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? *ACS chemical biology*, 1(7), pp.433–441.
- Tolstorukov, M.Y. et al., 2012. Histone Variant H2A.Bbd Is Associated with Active Transcription and mRNA Processing in Human Cells. *Molecular Cell*, 47(4), pp.596–607.
- Tomimatsu, K. & Narita, M., 2015. Translating the effects of mTOR on secretory senescence. *Nature cell biology*, 17(10), pp.1230–1232. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3244>.
- Toussaint, O., Medrano, E.E. & Von Zglinicki, T., 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology*, 35(8), pp.927–945.
- Treinin, I. et al., 1999. Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis. *Molecular and cellular biology*, 19(1), pp.321–329.



- Trojer, P. & Reinberg, D., 2007. Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Molecular Cell*, 28(1), pp.1–13.
- Trougakos, I.P. et al., 2006. Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(1), pp.88–92.
- Tsukiyama, T., 2002. The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(6), pp.422–429.
- Turner, B.M., 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell*, 111(3), pp.285–291.
- Tuveson, D.A. et al., 2004. Endogenous oncogenic K-rasG12D stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell*, 5(4), pp.375–387.
- Tzatsos, A. et al., 2009. Ndy1/KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the Ink4a/Arf locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), pp.2641–2646.
- Vaquero, A., Loyola, A. & Reinberg, D., 2003. The constantly changing face of chromatin. *Science of aging knowledge environment : SAGE KE*, 2003(14), p.RE4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12844523>.
- Varley, H. et al., 2002. Molecular characterization of inter-telomere and intra-telomere mutations in human ALT cells. *Nature genetics*, 30(3), pp.301–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919561>.
- Vaziri, H. et al., 1997. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO Journal*, 16(19), pp.6018–6033.
- Vermeulen, M. et al., 2007. Selective Anchoring of TFIID to Nucleosomes by Trimethylation of Histone H3 Lysine 4. *Cell*, 131(1), pp.58–69.
- Wade Harper, J. et al., 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4), pp.805–816.
- Wajapeyee, N. et al., 2008. Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell*, 132(3), pp.363–374.
- Wang, E., 1995. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Research*, 55(11), pp.2284–2292.
- Wang, J. et al., 2011. Inhibition of activated pericentromeric SINE/Alu repeat transcription in senescent human adult stem cells reinstates self-renewal. *Cell Cycle*, 10(17), pp.3016–3030.
- Wang, Y. et al., 2012. Autophagic activity dictates the cellular response to oncogenic RAS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), pp.13325–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3421174&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>.
- Wang, Z.F. et al., 1996. The protein that binds the 3' end of histone mRNA: A novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing. *Genes and Development*, 10(23), pp.3028–3040.
- Ward, I.M. et al., 2003. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), pp.19579–19582.
- Weake, V.M. & Workman, J.L., 2008. Histone Ubiquitination: Triggering Gene Activity.

- Molecular Cell*, 29(6), pp.653–663.
- Weber, J.D. et al., 1999. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature cell biology*, 1(1), pp.20–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559859>.
- Wei, S., Wei, W. & Sedivy, J.M., 1999. Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Research*, 59(7), pp.1539–1543.
- Wei, W., Hemmer, R.M. & Sedivy, J.M., 2001. Role of p14 ARF in Replicative and Induced Senescence of Human Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 21(20), pp.6748–6757.
- West, M.D. et al., 1996. Altered expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during cellular senescence. *Experimental gerontology*, 31(1–2), pp.175–193.
- West, M.D., Pereira-Smith, O.M. & Smith, J.R., 1989. Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity. *Experimental Cell Research*, 184(1), pp.138–147.
- West, M.H. & Bonner, W.M., 1980. Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry*, 19(14), pp.3238–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7407044>.
- Wiel, C., 2014. caractérisation de nouveaux régulateurs de la sénescence induite par un stress incogénique dans les cellules épithéliales humaines. *thèse de l'université de Lyon*.
- de Wit, N.J.W. et al., 2005. Analysis of differential gene expression in human melanocytic tumour lesions by custom made oligonucleotide arrays. *British journal of cancer*, 92(12), pp.2249–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15900300><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2361822>.
- Wlaschek, M. et al., 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1–3), pp.41–51.
- Woodcock, C.L.F., Frado, L.L.Y. & Rattner, J.B., 1984. The higher-order structure of chromatin: Evidence for a helical ribbon arrangement. *Journal of Cell Biology*, 99(1), pp.42–52.
- Wu, R.S., Tsai, S. & Bonner, W.M., 1982. Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells. *Cell*, 31(2 PART 1), pp.367–374.
- Wysocka, J. et al., 2005. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell*, 121(6), pp.859–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15960974> [Accessed October 16, 2016].
- Xagorari, A. & Chlichlia, K., 2008. Toll-like receptors and viruses: induction of innate antiviral immune responses. *The open microbiology journal*, 2, pp.49–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088911><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2593046>.
- Xie, Z. et al., 2012. Lysine succinylation and lysine malonylation in histones. *Mol Cell Proteomics*, 11(5), pp.100–107. Available at: <http://www.mcponline.org/content/11/5/100.full.pdf>.
- Xin, M.G. et al., 2003. Senescence-enhanced oxidative stress is associated with

- deficiency of mitochondrial cytochrome c oxidase in vascular endothelial cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 124(8–9), pp.911–919.
- Xu, D. et al., 2009. Covalent modifications of histones during mitosis and meiosis. *Cell Cycle*, 8(22), pp.3688–3694.
- Xu, M. et al., 2008. Beta-catenin expression results in p53-independent DNA damage and oncogene-induced senescence in prelymphomagenic thymocytes in vivo. *Molecular and cellular biology*, 28(5), pp.1713–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2258783&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Xu, Y. et al., 2012. Histone H2A.Z Controls a Critical Chromatin Remodeling Step Required for DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular Cell*, 48(5), pp.723–733.
- Xue, W. et al., 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445(7128), pp.656–60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4601097&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Yang, F. et al., 2005. Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. *Cancer Research*, 65(19), pp.8887–8895.
- Yang, G. et al., 2006. The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), pp.16472–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1637606&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Yang, N.C. & Hu, M.L., 2005. The limitations and validities of senescence associated-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Experimental Gerontology*, 40(10), pp.813–819.
- Yang, Z. & Klionsky, D.J., 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature cell biology*, 12(9), pp.814–22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3616322&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Yao, J. et al., 2006. Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. *Cancer Research*, 66(8), pp.4065–4078.
- Yoda, K. et al., 2000. Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(13), pp.7266–7271. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10840064> <http://www.pnas.org/content/97/13/7266> <http://www.pnas.org/content/97/13/7266.full.pdf> <http://www.pnas.org/content/97/13/7266.full.pdf+html?frame=sidebar>.
- Young, A.P. et al., 2008. VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nature cell biology*, 10(3), pp.361–369.
- Young, A.R.J. et al., 2009. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes and Development*, 23(7), pp.798–803.
- Young, A.R.J. & Narita, M., 2009. SASP reflects senescence. *EMBO reports*, 10(3), pp.228–30. Available at: <http://embor.embopress.org/content/10/3/228.abstract>.

- Yu, Q. et al., 2015. DNA-damage-induced type I interferon promotes senescence and inhibits stem cell function. *Cell reports*, 11(5), pp.785–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25921537> [Accessed February 8, 2016].
- Yukawa, M. et al., 2014. Genome-wide analysis of the chromatin composition of histone H2A and H3 variants in mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 9(3).
- Zalensky, A.O. et al., 2002. Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B): Molecular cloning and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), pp.43474–43480.
- Zeitlin, S.G., Shelby, R.D. & Sullivan, K.F., 2001. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 155(7), pp.1147–1157.
- Zeng, L. et al., 2010. Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature*, 466(7303), pp.258–262. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09139>.
- Zhang, H.S., Postigo, A.A. & Dean, D.C., 1999. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell*, 97(1), pp.53–61. Available at: <papers2://publication/uuid/A831F8DA-1794-4854-8673-B66B42F68B64>.
- Zhang, R. et al., 2005. Formation of macroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Developmental Cell*, 8(1), pp.19–30.
- Zhou, V.W., Goren, A. & Bernstein, B.E., 2011. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature reviews. Genetics*, 12(1), pp.7–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21116306>.
- Zhu, J. et al., 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes and Development*, 12(19), pp.2997–3007.
- Ziesché, E. et al., 2013. The coactivator role of histone deacetylase 3 in IL-1-signaling involves deacetylation of p65 NF-κB. *Nucleic acids research*, 41(1), pp.90–109. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23087373> [Accessed October 16, 2016].
- Zindy, F. et al., 1997. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*, 15(2), pp.203–11. Available at: <http://www.nature.com/onc/journal/v15/n2/abs/1201178a.html>.
- Zlatanova, J. et al., 2009. The Nucleosome Family: Dynamic and Growing. *Structure*, 17(2), pp.160–171.

## Annexes

### Annexe 1. Liste des histone-acetyltransferases (HAT)

HAT family	HAT enzyme	Organisms known	Complex	Specificity	Function
GNAT	Gcn5	Yeast to humans	SAGA, ADA ADA2	H3, H2B	Coactivator
	PCAF	Human, mice	PCAF	H3, H4	Coactivator
	Hat1	Yeast	HatB	H4 [K5, K12], H2B	Histone deposition, silencing
	Elp3	Yeast to humans	Elongator	H3, H4	Transcriptional elongation
	Hpa2	Yeast		H3, H4	Unknown
MYST	ATF-2	Humans, mice		H2B, H4	Sequence-specific transcription factor
	Sas2	Yeast		H4 [K16]	Silencing
	Sas3	Yeast	NuA3	H3, H4, H2A	Silencing
	MORF	Humans		H4>H3	Unknown
	TIP60	Humans	TIP60	H4>>H3, H2A	HIV Tat interaction, DNA repair, Apoptosis
	Esa1	Humans	NuA4	H4, H2A	Cell cycle progression
	MOF	Drosophila	MSL	H4 [K16]	X- chromosome hyperactivation dosage compensation
	HBO1	Humans	HBO1	H3, H4	DNA replication
	MOZ	Humans	AML1	H3, H4> H2A	Transcription activation, others?
	P300/CBP	p300	Multicelular organisms		H2A, H2B, H3, H4
CBP		Multicelular organisms		H2A, H2B, H3, H4	Coactivator
Hormone Receptor Coactivators	ACTR	Humans, mice		H3>H4	Hormone Receptor coactivators
	SRC-1	Humans, mice		H3>H4	Hormone Receptor coactivators
	TIF2	Humans, mice			Hormone Receptor coactivators
TAFII250	TAFII250	Yeast to humans	TFIID	H3>H4,H2A	TBP-associated factor/ Cell cycle progression
TFIIIC	TFII220	Humans			
	TFII110	Humans	TFIIIC	H3, H4 >H2A	RNA polymerase III –mediated transcription
	TFII90	Humans			
Nut1	Nut1	Humans	Mediator	H3>>H4	RNA polymerase II –mediated transcription

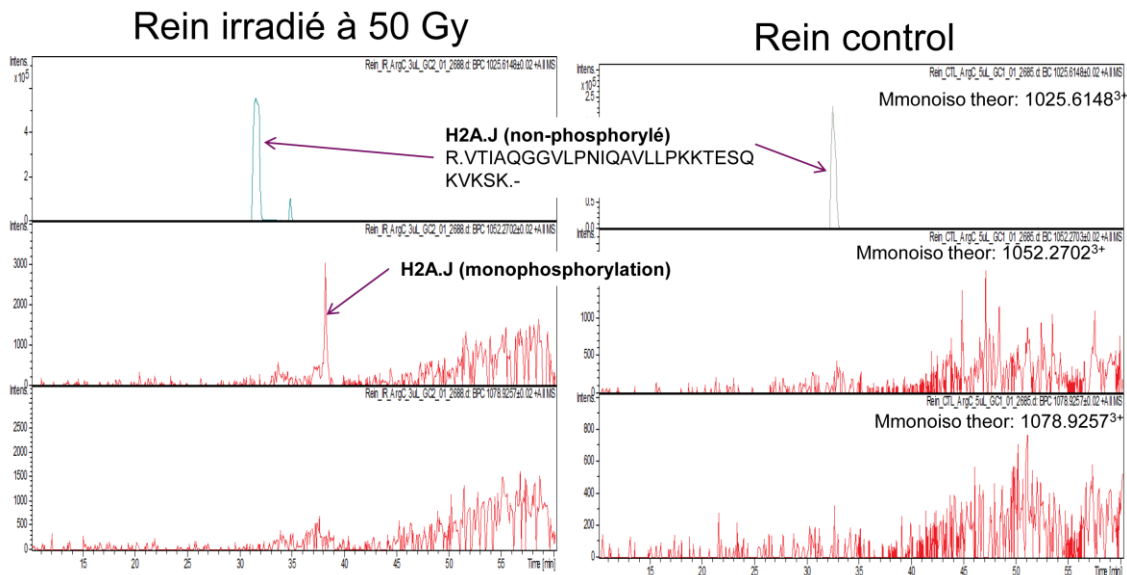
### Annexe 2. Liste des histone-deacetylases (HDAC)

HDAC group	HDACs members	TSA sensitivity	NAD <sup>+</sup> dependence	Localization	Function
Class I (Rpd3)	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	Yes	No	Nuclear and ubiquitous localization.	Involved in a variety of functions, such as transcriptional repression and cell differentiation.
Class II (Hda1)	HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10	Yes	No	Tissue-specific expression.	Transcriptional repression, microtubule regulation
Class III (yeast Sir2)	Sir2, HST1-4 Homologues in different organisms from yeast to humans. (Arabidopsis, C. elegans D. Melanogaster, etc...) e.g. Human Sirt1-7	No	Yes	Some are nuclear, others cytoplasmic and mitochondrial.	Involvement in silencing. Connection with aging. Function in development, gene repression and DNA repair.

### Annexe 3. Liste des histone-methyltransferases (HMT)

HMT group	HMT	Specificity	Function
Arginine	PRMT1	H4-R3 (non-histone proteins)	Transcriptional activation (signal transduction, etc)
	PRMT2	Unknown	Coactivator of estrogen receptor
	PRMT3	Unknown	Cytoplasmic (mitosis?)
	PRMT4/ CARM1	H3-R2, -R17, -R26. (Also at the C-terminal)	Transcriptional coactivator
	PRMT5	H2A, H4 (non-histone proteins)	Transcriptional repressor and spliceosome formation
Lysine SET domain	Suv39H1, Suv39H2	H3-K9	Heterochromatin formation, silencing
	G9a	H3-K9, H3-K27	Early embryogenesis role, transcriptional repression
	ASH1	H3-K4, -K9, H4-K20	Establishment of epigenetic, active transcription patterns
	Set1	H3-K4	Silencing
	Set2	H3-K36	Silencing, transcription
	Set7	H4-K20	Development, silent chromatin. Involved in aging
	Set9	H3-K4	Transcriptional activation
	ESC-E(z) SETDB1	H3-K27	Polycomb-mediated silencing
Dot	Dot1	H3-K79	Silencing-mediated by the corepressor KAP-1 Silencing by precluding Sir binding to bulk chromatin

### Annexe 4. Mise en évidence de la phosphorylation de H2AJ.



## **Annexe 5. Matériels et méthodes**

### **Culture cellulaire**

Les expériences furent menées sur des lignées de fibroblastes humains embryonnaires immortalisés WI38hTERT. Ces cellules expriment la télomérase holoenzyme hTert (human telomerase reverse transcriptase).

Les cellules furent cultivées à 37°C à 5% d'Oxygène et 5% de CO<sub>2</sub> en MEM contenant des acides aminés non essentiels (1%), du Sodium-pyruvate (1%), du N-glutamine (1%), 10% de sérum bovin foetal et 50 U/ml de streptomycine-pénicilline.

### **Induction Senescence**

L'induction de sénescence fut réalisée par traitement à l'Étoposide à 20 µM induisant une sénescence par dommages à l'ADN (SenETO). On parlera de sénescence courte quand la durée d'exposition à l'étoposide est de 5 jours (eSenETO) ou de sénescence profonde pour 15 ou 21 jours (dSenETO).

### **Immunofluorescence**

Les cellules furent fixées au formaldéhyde 3,7% ou au méthanol 100% pendant respectivement 10 min ou 30 secondes. Les deux méthodes sont équivalentes au vu des anticorps utilisés mais la fixation au méthanol permet d'évacuer une partie du cytoplasme et donc d'une partie de la RFP présente (la RFP permettant le contrôle de la transfection des lignées sh) permettant ainsi d'utiliser une coloration dans le rouge (594 nm) sans bruit de fond conséquent.

Les Anticorps utilisés furent :

- des anticorps de souris anti-gH2AX dilué au 1/1000
- des anticorps de lapin anti-H2AJ dilué au 1/1000
- des anticorps de souris ou lapin anti-53BP1 dilué au 1/1000
- Anticorps secondaires anti-lapin/anti-souris Alexa 488 nm, 594 nm dilué au 1/1000

Incubés à température ambiante pendant 1h.

Les cellules sont finalement traitées au DAPI pour visualiser la chromatine.

### **Traitement SA-B-Gal**

Les cellules sont incubées toute une nuit à 37°C avec un tampon SA-B-Gal (40 mM acide citrique+Sodium phosphate pH 6 ; 1 mg/ml X-gal ; 5 mM potassium ferricyanide ; 5 mM potassium ferrocyanide ; 150 mM NaCl ; 2 mM MgCl<sub>2</sub>), lavées en PBS et observées au microscope en lumière visible.

### **Microscopie**

Les images de microscopie sont obtenues à partir d'un microscope inversé à fluorescence LEICA DMIRE2 avec un objectif à immersion dans l'huile à 63x/1.4, d'une caméra à haute résolution SnapCool™ HQ2 et du logiciel MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis (Universal Imaging Corporation Ltd.). Certaines images d'immunofluorescence furent obtenues grâce à un système de microscopie à haut contenu Operetta® et analysés par le logiciel Harmony® de Perkin-Elmer..

**QRT-PCR**

1 µg d'ADN est rétro-transcrit en utilisant des primers hexamériques aléatoires ou oligo(dT)<sub>18</sub> d'après le protocole de Roche. Les PCR temps-réel ont été réalisées en utilisant le réactif SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) sur un appareil BioRad IQ5® pour vérifier la bonne déplétion du shRNA H2AJ ainsi que l'expression de plusieurs gènes connus pour s'exprimer en senescence. L'expression du gène GAPDH est utilisée comme contrôle de normalisation.

Les primers utilisés pour la Q-PCR sont :

Target	Direction	Sequence
IL6	for	AAATTCGGTACATCCTCGACGGCA
IL6	rev	AGTGCCTCTTTGCTGCTTTCACAC
IL8	for	AGCCTTCCTGATTTCTGCAGCTCT
IL8	rev	AATTTCTGTGTTGGCGCAGTGTGG
GAPDH	for	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG
GAPDH	rev	GGGGTCATTGATGGCAACAATA
CXCL5	for	AGCTGCGTTGCGTTTGTTCAC
CXCL5	rev	TGGCGAACACTTGCAGATTAC
CXCL6	for	AGAGCTGCGTTGCACTTGTT
CXCL6	rev	GCAGTTTACCAATCGTTTTGGGG
COL17A1	for	TTACCCGCCATGCGTATGAAG
COL17A1	rev	CAGTCGAACTCGAATTTCACTCT
IL1 - Beta	for	TTCGACACATGGGATAACGAGG
IL1 - Beta	rev	TTTTTGCTGTGAGTCCCGGAG
CXCL1	for	AACAGCCACCAGTGAGCTTC
CXCL1	rev	GAAAGCTTGCCTCAATCCTG
CXCL2	for	GCTTCTCCTTCCTTCTGGT
CXCL2	rev	GGGCAGAAAGCTTGTCTCAA
CXCL3	for	ACCCTGCAGGAAGTGCAAT
CXCL3	rev	ATCCCCCATGGTTCAGAAA
p21	for	CACTCAGAGGAGGCGCCATGTCA
p21	rev	CCCAGGCGAAGTCACCCTCCA
CCL3	for	AGTTCTCTGCATCACTTGCTG
CCL3	rev	CGGCTTCGCTTGGTTAGGAA
CCL2	for	CAGCCAGATGCAATCAATGCC
CCL2	rev	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
H2AJ-CDS	for	TCGGGTGCGGTACGTTGCATTC
H2AJ-CDS	rev	GGAGCGGGATTTGGCCTTTGCT
H2AJ-5'end	for	AGCAAAGGCCAAATCCCGCTCC
H2AJ-5'end	rev	CAGCTCCAGGATCTCCGCCGTA
p16	for	CCCAACGCACCGAATAGTTA
p16	rev	GGTCGGGTGAGAGTGCC

**Extraction ARN**

L'ARN est extrait à partir du kit Macherey-Nagel Nucleospin® RNA XS. L'ARN est ensuite quantifié grâce à un Nanodrop 2000 (ThermoScientific®).



**Western Blot :**

Les extraits cellulaires totaux ont migré par électrophorèse dans des gels de SDS-polyacrylamide à 15% puis ont été transféré sur membranes de nitrocellulose. Les membranes furent bloquées et incubées avec des anticorps en utilisant le système d'imagerie infrarouge Odyssey Li-Cor en suivant le protocole du fabricant. Les anticorps utilisés anti-H2AJ et anti-H3 (Abcam ab1791) ont été utilisés à une dilution de 1/1000 durant une incubation de 1h à température ambiante. Les anticorps secondaires anti-lapin igG DyLight 800/680 (thermoFisher SA5-10036) ont été utilisés à une dilution de 1/10000 durant 1h à température ambiante.

**Traitements chimiques :**

Les traitements par du Sodium Butyrate le furent à une concentration de 4 mM avec un unique traitement à t=0 sans changement pendant toute l'expérience (144h maximum). Les traitements par du poly(I :C) le furent à une concentration de 50µg/ml avec un unique traitement 4, 5, 4, 6, 8 et 24h avant de récupérer les cellules traitées. Les traitements par de la Rapamycine le furent à des concentrations de 50, 100 et 200 nM, concentration maintenue dans le milieu pendant les dix jours d'expériences. Les traitements par du SB203580 (Sigma Aldritch S8307) le furent à une concentration de 10 µM cinq jours avant d'induire la sénescence et est maintenues dans le milieu pendant les 10 jours de sénescence en changeant tous les jours le milieu. Changer tous les jours le milieu permet de maintenir une concentration relativement stable d'inhibiteur tout en évitant les effets off-target que l'on peut avoir à plus haute concentration.

**Titre :** Caractérisation fonctionnelle d'un nouveau variant d'histone impliqué dans la sénescence des cellules humaines induite par des dommages persistants à l'ADN, et son rôle potentiel comme biomarqueur de stress lors du vieillissement

**Mots clés :** épigénétique, sénescence, vieillissement.

Dans les cellules de mammifères, la sénescence cellulaire a été définie comme une réponse au stress. Elle est caractérisée par un arrêt du cycle cellulaire stable, la transformation morphologique, une sécrétion de facteurs pro-inflammatoires appelée SASP et l'altération de la structure de la chromatine. Ce phénotype peut être induite par différents stimuli. A l'origine, la perte des télomères ou un dysfonctionnement a été montré pour déclencher le début de la sénescence. Cependant, l'état de sénescence peut également résulter de conditions de culture inadéquates, l'induction oncogène ou stress génotoxiques. Le travail dans le laboratoire se concentre sur les mécanismes régissant l'apparition et le maintien de la sénescence et sur la recherche de nouveaux marqueurs de sénescence. Des résultats récents ont identifié des modifications de la chromatine et régulations épigénétiques pendant la sénescence cellulaire, tels que les modifications post-traductionnelles des histones et des changements dans la composition de l'histone variantes de nucléosomes. La spectrométrie de masse a révélé l'accumulation d'un variant de l'histone spécifique dans l'ADN endommagé induite par la sénescence. Cette variante, H2A.J, représente 1% de la teneur en histone H2A lors de la prolifération, mais atteint 20% des espèces de H2A lors de la sénescence. Le but de mon travail de thèse est de déterminer la fonction de ce variant d'histone, le mécanisme menant à son accumulation et son mode d'action. Nous avons produit des lignées de cellules de fibroblastes humains stables exprimant des shRNAs ciblant le gène H2A.J. L'analyses de biopuces et de l'ARN-séquençage ont montré que les fibroblastes H2AJ appauvries ont un transcriptome altérée. En particulier, ces cellules présentent une dérèpression considérablement retardé dans la sénescence de plusieurs gènes codant pour des cytokines et des chimiokines clés. Ce résultat indique que l'accumulation de H2A.J dans la sénescence est important pour l'expression efficace du phénotype SASP. Enfin, l'accumulation de cellules sénescents dans les tissus âgés a souvent été déduite en utilisant des marqueurs de substitution tels que les dommages à l'ADN ou de l'activité accrue SA-B-galactosidase. Nos données suggèrent que l'accumulation H2AJ peut être un nouveau biomarqueur in vivo de vieillissement pour certains types de cellules.

**Title :** Functional characterization of a novel histone variant implicated in the senescence of human cells induced by persistent DNA damage, and its potential role as a stress biomarker during aging

**Keywords :** epigenetics, senescence, aging.

In mammalian cells, cellular senescence has been defined as a stress response. It is characterized by a stable cell cycle arrest, morphological transformation, a secretion of pro-inflammatory factors termed the SASP (senescence associated secretory phenotype) and the alteration of the chromatin structure. This phenotype can be induced by various stimuli. Originally, telomere loss or dysfunction was shown to trigger the onset of senescence. However, the senescence state can also result from inadequate culture conditions, oncogene induction or genotoxic stresses. Work in the lab focuses on mechanisms governing the onset and maintenance of senescence and on the search for new markers of senescence. Recent results identified chromatin modifications and epigenetic regulations during cellular senescence, such as post-translational modifications of histones and changes in the histone variants composition of nucleosomes. Mass spectrometry revealed the accumulation of a specific histone variant in DNA-damage induced senescence. This variant, H2A.J, makes up to 1% of the H2A histone content during proliferation, but reaches 20% of H2A species during deep senescence. The goal of my thesis work is to determine the function of this histone variant, the mechanism leading to its accumulation and its mode of action. We produced stable human fibroblast cell lines expressing shRNAs silencing the H2A.J gene. Microarray and RNA-sequencing analyses have shown that H2AJ-depleted fibroblasts have an altered transcriptome. In particular, such cells show a greatly delayed derepression in senescence of several SASP genes coding for some key cytokines and chemokines. This result indicates that accumulation of H2A.J in senescence is important for efficient expression of the SASP phenotype. Finally, the accumulation of senescent cells in aged tissues has often been inferred using surrogate markers. Our data suggest that H2AJ accumulation may be a novel in-vivo biomarker of aging for certain cell types.